

**ANÁLISE DO VALOR DA EXPRESSÃO GÊNICA
DO GENE CD 133 E DO GENE BAP1 COMO
FATOR PROGNÓSTICO NO CARCINOMA
DE CÉLULAS RENAIIS**

DEUSDEDIT CORTEZ VIEIRA DA SILVA NETO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Stênio de Cássio Zequi

Co-Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro

São Paulo

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Silva Neto, Deusdedit Cortez Vieira da

Análise do valor da expressão gênica dos genes CD133 e BAP1 como fator prognóstico no carcinoma de células renais / Deusdedit Cortez Vieira da Silva Neto - São Paulo, 2014.

128p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Stênio de Cássio Zequi

Descritores: 1. CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIAS. 2. PROGNÓSTICO. 3. EXPRESSÃO GÊNICA. 4. MARCADORES BIOLÓGICOS DE TUMOR. 5. ANTÍGENO CD133. 6. MONTAGEM E DESMONTAGEM DA CROMATINA.

DEDICATÓRIA

A Alice, mulher da minha vida. Nosso amor e união nos tornam mais fortes para enfrentar os desafios da vida.

Ao meu primogênito e amigão Nicollas. Maior fonte de estímulo para que eu faça tudo melhor em minha vida.

Ao meu filho Lourenço Neto. Ainda no ventre da mãe já nos traz alegria imensurável.

A minha mãe Wanda. Fonte inesgotável de carinho e fé. “Meu amor”, como nos chamamos carinhosamente.

Ao meu pai Lourenço. Meu maior exemplo. Não dou um passo em minha vida sem pensar como ele faria. Pai herói e “grande técnico” dos filhos.

Aos meus irmãos Luciana e Vitor. Amigos e confidentes. Para eles, tudo! E para suas famílias também. Meus cunhados: Nathalia e Pedro e principalmente para o chamego do dindo, Maria Eduarda.

Aos meus padrinhos Remédios e Alberto. Sempre os tive como segunda mãe e segundo pai. Tenho certeza que vibram com minhas vitórias e sofrem comigo nos momentos difíceis.

Aos meus entes queridos (in memorian): Meus avós maternos Maria e Almir, meus avós paternos Cleonice e Deusdedit e minha querida Juju. Onde estiverem, espero que estejam orgulhosos de mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus o dom da vida.

À família que ganhei ao conquistar Alice como companheira. Meus sogros: Irene e Mario, meus cunhados: Cristiane e Rodrigo, meus co-cunhados: Greicy (que vai nos dar uma menininha) e Raphael; e meus lindos sobrinhos: Julia e Nathan. Obrigado por ajudarem na criação do Nick e por tornarem nossa vida mais alegre.

Ao Prof. Dr. Stenio de Cássio Zequi, meu orientador e mestre. Médico urologista, cirurgião e pesquisador incansável. Sua energia e exemplo sempre me motivaram a buscar o meu melhor nesta jornada. Quero ter o privilégio de continuar nossa amizade com muita produção científica ao seu lado.

A Prof. Dra. Dirce Carraro, minha co-orientadora, coordenadora do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do CIPE, toda sua orientação e a disponibilidade de seu laboratório, equipe e material necessários para o bom andamento dos experimentos deste trabalho.

Ao Dr. Walter da Costa a sua amizade, dedicação e apoio em todos os momentos. Principal incentivador para o meu início na pesquisa em carcinoma de células renais.

A Dra. Elisa Napolitano, pesquisadora do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do CIPE, a sua valiosa ajuda e a orientação nas bancadas do laboratório.

Ao Dr. Gustavo Guimarães, chefe do serviço de Urologia do Departamento de Cirurgia Pélvica, a oportunidade oferecida e a sabedoria compartilhada.

Ao Prof. Dr. Ademar Lopes, diretor do Departamento de Cirurgia Pélvica do AC Cancer Center, todo apoio e colaboração.

Ao Prof. Dr. Fernando Soares, presidente do Conselho de Pós Graduação do AC Cancer Center, todo apoio e colaboração.

À Dra. Isabela Werneck, patologista do Departamento de Anatomia patológica do AC Cancer Center, a sua sempre constante disponibilidade para ajudar neste e em outros projetos.

A Dra. Vilma Martins a sua colaboração e e seu espírito agregador entre as equipes de pesquisa do CIPE / AC Cancer Center.

Aos urologistas do Serviço de Urologia do AC Cancer Center Dr Wilson Bachega, Dr. Carlos Sacomanni, Dr Rodrigo Madeira Campos, Dr. Renato Almeida, Dr Tiago, Dr Ricardo Favaretto, Dr Bruno Benigno a aceitação e o acolhimento em seu convívio durante os anos da pós graduação.

À enfermeira Thais Safranov, toda sua ajuda e competência na organização do banco de dados do serviço.

Aos colegas de pós graduação Dr. Daniel Beltrame, Dr Fabrício Novaes, Dra Mariana Alves, Dra Stephania Bezerra, Dr Giuliano Aita, Dr Augusto Caparica, Dr Eduardo e Dr Samuel Spagnul a experiência compartilhada e a ajuda mútua nos bancos das disciplinas cursadas.

Ao Dr. Roni Fernandes, a sua amizade e parceria fundamentais em vários campos: consultório, Santa Casa SP e SBU SP. Mestre com quem aprendi, e continuo aprendendo, a encarar os desafios cirúrgicos que a Urologia nos impõe. Admirável por sua inesgotável energia produtiva e sempre constante disponibilidade em ajudar.

Ao Dr Gustavo Cuck, a sua amizade fraternal e nossas longas conversas sobre o que realmente importa na vida. Seu companheirismo e colaboração foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À Dra Isabel Feitosa, a sua amizade e parceria fundamental no consultório particular. Sempre uma voz de estímulo para que eu seguisse em frente com o Mestrado.

Ao Dr. Silvio Pires, urologista e exímio cirurgião, a sua amizade, ajuda e valiosas orientações desde o início da minha carreira urológica até os dias atuais.

Aos Dr. Marco Caldas, Dr Cesar Benemond, Dr Alvaro Bosco e Dr Maurício Akira as amizades e companheirismos dentro e fora do NuHFASP.

Ao Dr Jose Roberto Guérios. Professor da UFPR, minha faculdade na graduação. Com ele entrei pela primeira vez em um centro cirúrgico. Não bastasse o papel de mestre, me inseriu em sua família para que não me sentisse só nos primeiros anos fora da casa dos meus pais. Ganhei uma família paranaense que vive no meu coração.

Ao acadêmico de Medicina José Grespan Guérios a ajuda no levantamento de dados deste trabalho. Espero que continue comigo trilhando o caminho da ciência e da Urologia.

Ao Hospital de Aeronáutica de São Paulo, da Força Aérea Brasileira, na figura de seu diretor, Cel. Ricardo Kanashiro e do seu Chefe de Divisão Médica, Cel. Sidnei Toledo, toda compreensão e suporte neste período do Mestrado.

Ao Maj. Rogério a amizade, apoio e a torcida para o sucesso desta missão.

Aos mestres Prof. Dr. Marjo Perez e Dr. Moacir Fucs todo apoio e oportunidade e toda confiança depositada em minha pessoa desde da época de residência na Santa Casa de SP.

À todos meus preceptores de residência médica em Urologia Dr. Lívio Beneduzzi, Dr. Celso Oliveira, Dr. Ricardo De La Roca, Dr. Christian Fuhro, Dr. Márcio Rosa Pagan, Dr. Dalmo de Barros, Dr. Luiz Gustavo Toledo, Dr. Marcos Bróglia e Dr Antonio João todo ensinamento e orientação recebidos. À todos os amigos de Residência Médica: Dr. Fernando Korkes, Dr. Luiz Guidoni, Dr Arthur Moreno, Dr. Andre Costa, Dr. Ravendra Moniz, Dr. Hallisson Castro, Dr. Moacir Rafael, Dr. Mauricio Akira e Dr Rui Mascarenhas os anos de convívio harmonioso e salutar, mesmo com muito trabalho para todos.

À todos meus colegas de faculdade. Em especial Dra Lillian Kumagai, Dr. Simon Bardoe e Dr Willian Kondo a nossa convivência mais intensa durante estágio internacional.

Aos amigos do Colégio Militar de Brasília que estão próximos até hoje: Fernando Silva, Gustavo Ferreira, Luis Felipe, Pedro Borges, Tiago Queiroga e Wagner Elpídio.

À todos os meu professores dos bancos escolares até a pós graduação todo o ensinamento partilhado, alicerce para minhas carreiras profissional e acadêmica.

À Sra. Suely Francisco, bibliotecária do AC Cancer Center, sua especial atenção e orientação no processo de levantamento bibliográfico e diagramação deste estudo.

Às Sras. Luciana Pitombeira, Vanuza Rodrigues e Ana Maria Kuninari e ao Sr Reinaldo da Pós- Graduação do AC Cancer Center a ajuda e colaboração recebidas.

Às Sras. Rúbia e Tamiris a atenção e colaboração no CEP.

À todos os membros do Centro Médico Berrini o ambiente de trabalho tranquilo e harmonioso proporcionado.

À instituição AC Cancer Center toda sua estrutura de excelência e o estímulo à pesquisa em nosso país.

À instituição Força Aérea Brasileira o apoio nesta missão e o fortalecimento da minha noção de dever para com a pátria.

À instituição Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, base de todo meu aprendizado cirúrgico e assistencial e ambiente harmonioso para os que chegam sedentos por conhecimento.

À instituição Universidade Federal do Paraná, instituição secular no ensino da arte médica e da qual me orgulho de ter feito parte de sua história.

À instituição Colégio Militar de Brasília, onde, além de conhecimento, sedimentei meus princípios de lealdade, hierarquia e disciplina.

RESUMO

Cortez Neto DVS. **Análise do valor da expressão gênica dos genes CD133 e BAP1 como fator prognóstico no carcinoma de células renais.** São Paulo; 2014. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: Apesar dos recentes avanços no diagnóstico e tratamento do CCR, trata-se ainda de neoplasia de apresentação e curso clínico imprevisíveis. Os autores avaliaram, em 88 pacientes, os níveis de expressão do RNA mensageiro (mRNA) dos genes CD 133 (marcador de células tronco), e do BAP1 (envolvido na remodelação de cromatina) e seus respectivos valores prognóstico em CCR. **Casística e Métodos:** Dados epidemiológicos, clínicos e patológicos foram coletados. A expressão gênica foi avaliada utilizando-se técnica de RT-qPCR. A medida da expressão do mRNA foi avaliada como variável contínua, sem estratificações. A análise estatística foi realizada com o teste de Mann-Whitney para grupos não paramétricos e não pareados. Os níveis de expressão dos biomarcadores foram comparados com fatores clínicos e patológicos e, em seguida, foram avaliados seus impactos prognósticos nas taxas de sobrevida global (SG), sobrevida câncer específica (SCE) e sobrevida livre de doença (SLD) em 5 anos. **Resultados:** Foi observada associação entre a hipoexpressão do gene BAP1 e variáveis patológicas desfavoráveis, como invasão da gordura peri-renal e do seio renal ($p=0,001$), estádios patológicos 3 e 4 ($p= 0,033$) e com tumores maiores que 4 cm ($p= 0,001$). A hipoexpressão do gene CD133 se associou à invasão da adrenal ($p= 0,046$). A expressão do mRNA de ambos os genes não influenciou significativamente as curvas de SG, SCE e SLD em 5 anos. **Conclusão:** Corroborando estudos utilizando outras técnicas biomoleculares, como sequenciamento e imunohistoquímica, demonstramos a associação do gene BAP1 com fatores anatomopatológicos de mau prognóstico. Porém, os parâmetros clínicos e patológicos clássicos permaneceram como fatores preditivos mais significativos em CCR.

SUMMARY

Cortez Neto DVS. [Value analysis of gene expression of CD133 and BAP1 genes as prognostic factor in renal cell carcinoma]. São Paulo; 2014. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Despite recent advances in diagnosis and treatment of RCC, this neoplasia remains of unpredictable presentation and clinical course. In 88 patients, the authors evaluated the expression and the prognostic role of messenger RNA (mRNA) of two genes: CD 133, membrane marker of stem cells, and BAP1, involved in chromatin remodeling. **Material and Methods:** Epidemiological, clinical and pathological data were collected. The degree of gene expression using RT-qPCR were evaluated. The measurement of mRNA expression was assessed as a continuous variable, without stratification. Statistical analysis was performed with the Mann - Whitney test for nonparametric and unpaired groups. Both mRNA expression levels were compared with clinical and pathological factors and had assessed their prognostic impact in in five years overall survival (OS), cancer specific survival (CSS) and disease free survival (DFS). **Results:** An association was observed between hipoexpression of BAP1 gene and anatomical and pathological variables of poor prognosis as: invasion of perinephric and renal sinus fat ($p = 0.001$), patients with worse pathological stage 3 and 4 ($p = 0.033$) and patients with higher than 4 cm ($p = 0.001$) tumors. In turn, the hipoexpression of CD133 gene was associated with invasion of the adrenal gland ($p = 0.046$), a pathological variable of poor prognosis. The mRNA expression of both genes had no impact on the curves of OS, CSS and DFS in 5 years in the cohort presented. **Conclusion:** Corroborating other studies using biomolecular techniques such as sequencing and immunohistochemistry, our study demonstrated the association of hipoexpression of BAP1 gene with anatomical and pathological factors of poor prognosis. However, the classical clinical and pathological parameters remains as the most significant predictors in CCRcc.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura molecular do CD133, demonstrando grupo amino-terminal extracelular, cinco domínios hidrofóbicos transmembrana, duas alças citoplasmáticas e um domínio carboxi-terminal citoplasmático.....	18
Figura 2	Estrutura do gene BAP 1.....	24
Figura 3	Confirmação da ausência de DNA genômico nas amostras de RNA tratadas com DNase pela avaliação em gel de agarose 1% dos produtos da PCR.....	34
Figura 4A	Curva de dissociação para padronização da concentração de <i>primers</i> para amplificação de fragmento referente ao gene <i>PROM1</i>	37
Figura 4B	Curva de dissociação para padronização da concentração de <i>primers</i> para amplificação de fragmento referente ao gene <i>BAP1</i>	37
Figura 5	Curva padrão para obtenção da eficiência de amplificação dos iniciadores.....	38
Figura 6	Escolha dos genes normalizadores mais estáveis pela análise no software GeNorm.....	40
Figura 7	Comparação dos valores de expressão do CD133 entre amostras neoplásicas e não neoplásicas.....	53
Figura 8	Comparação dos valores de expressão do BAP1 entre amostras neoplásicas e não neoplásicas.....	58

Figura 9	Curva de sobrevida global em 60 meses para os 88 pacientes portadores de CCRcc.....	64
Figura 10	Curva de sobrevida global em 60 meses para os 88 pacientes portadores de CCRcc estratificados em valores de expressão gênica do BAP 1 acima e abaixo da mediana.....	67
Figura 11	Curva de sobrevida global em 60 meses para os 88 pacientes portadores de CCRcc estratificados pela expressão do mRNA do CD133 acima ou abaixo do percentil 75.....	68
Figura 12	Curva de sobrevida global em 60 meses para os 77 pacientes portadores de CCRcc não metastáticos ao diagnóstico.....	69
Figura 13	Curva de sobrevida global em 60 meses para os 77 pacientes portadores de CCRcc não metastático estratificados em valores de expressão gênica do BAP 1 acima e abaixo da mediana.....	72
Figura 14	Curva de sobrevida global em 60 meses para os 77 pacientes portadores de CCRcc não metastático estratificados pela expressão do mRNA do CD133 acima ou abaixo do percentil 75..	73
Figura 15	Curva de sobrevida câncer específica em 60 meses para os 88 pacientes portadores de CCRcc.....	75
Figura 16	Curva de sobrevida câncer específica em 60 meses para os 88 pacientes portadores de CCRcc estratificados em valores de expressão gênica do CD 133 acima e abaixo do percentil 75.....	78
Figura 17	Curva de sobrevida câncer específica em 60 meses para os 88 pacientes portadores de CCRcc estratificados em valores de expressão gênica do BAP 1 acima e abaixo da mediana.....	79

Figura 18	Curva de sobrevida câncer específica em 60 meses dos 77 pacientes com CCRcc não metastático.....	81
Figura 19	Curva de sobrevida câncer específica em 60 meses para os 77 pacientes portadores de CCRcc não metastático estratificados em valores de expressão gênica do BAP 1 acima e abaixo da mediana.....	84
Figura 20	Curva de sobrevida câncer específica em 60 meses para os 77 pacientes portadores de CCRcc não metastático estratificados em valores de expressão gênica do CD 133 acima e abaixo do percentil 75.....	85
Figura 21	Curva de sobrevida livre de doença em 60 meses para os 77 pacientes portadores de CCRcc.....	87
Figura 22	Curva de sobrevida livre de doença em 60 meses para os 77 pacientes portadores de CCRcc estratificados em valores de expressão gênica do BAP 1 acima e abaixo da mediana.....	90
Figura 23	Curva de sobrevida livre de doença em 60 meses para os 77 pacientes portadores de CCRcc, conforme expressão gênica do CD133 estratificada pelo percentil 75.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variáveis epidemiológicas de 88 pacientes portadores de CCRcc do A.C.Camargo Cancer Center.....	48
Tabela 2	Variáveis clínicas de 88 pacientes portadores de CCRcc do A.C.Camargo Cancer Center.....	49
Tabela 3	Variáveis terapêuticas de 88 pacientes portadores de CCRcc do A.C.Camargo Cancer Center.....	50
Tabela 4	Variáveis anatomopatológicas de 88 pacientes portadores de CCRcc do A.C.Camargo Cancer Center.....	51
Tabela 5	Desfecho clínico após tratamento do tumor primário e situação clínica aos 5 anos do estudo de 88 pacientes portadores de CCRcc do AC Camargo Cancer Center.....	52
Tabela 6	Expressão do CD 133 segundo variáveis clínicas e epidemiológicas dos 88 pacientes com CCRcc.....	54
Tabela 7	Expressão de CD 133 segundo variáveis anatomopatológicas dos 88 pacientes com CCRcc.....	55
Tabela 8	Expressão do CD 133 segundo variáveis clínicas e epidemiológicas dos 77 pacientes com CCRcc não metastático ao diagnóstico.....	56
Tabela 9	Expressão de CD 133 segundo variáveis anatomopatológicas dos 77 pacientes com CCRcc não metastático ao diagnóstico.....	57

Tabela 10	Expressão do BAP1 segundo variáveis clínicas e epidemiológicas dos 88 pacientes com CCRcc.....	59
Tabela 11	Expressão do CD 133 segundo variáveis clínicas e epidemiológicas dos 77 pacientes com CCRcc não metastático ao diagnóstico.....	60
Tabela 12	Expressão do BAP1 segundo variáveis clínicas e epidemiológicas dos 77 pacientes com CCRcc não metastático ao diagnóstico.....	61
Tabela 13	Expressão do BAP1 segundo variáveis anatomopatológicas dos 77 pacientes com CCRcc não metastático ao diagnóstico.....	62
Tabela 14	Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 anos de acordo com variáveis clínicas e demográficas em 88 pacientes portadores de CCRcc.....	65
Tabela 15	Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas de 88 pacientes com CCRcc.....	66
Tabela 16	Comparação de médias dos valores de expressão do gene CD133 entre os grupos referentes à sobrevida global em 5 anos para os 88 pacientes.....	68
Tabela 17	Comparação de médias dos valores de expressão do gene BAP1 entre os grupos referentes à sobrevida global em 5 anos para os 88 pacientes.....	69
Tabela 18	Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 anos de acordo com variáveis clínicas e demográficas em 77 pacientes portadores de CCRcc não metastático ao diagnóstico.....	70

Tabela 19	Probabilidade acumulada de sobrevida em 5 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas de 77 pacientes com CCRcc não metastático.....	71
Tabela 20	Comparação de médias dos valores de expressão do gene CD133 entre os grupos referentes à sobrevida global em 5 anos para os 77 pacientes.....	74
Tabela 21	Comparação de médias dos valores de expressão do gene BAP1 entre os grupos referentes à sobrevida global em 5 anos para os 77 pacientes.....	74
Tabela 22	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com variáveis clínicas em 88 pacientes portadores de CCRcc.....	76
Tabela 23	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas em 88 pacientes portadores de CCRcc.....	77
Tabela 24	Comparação de médias dos valores de expressão do gene CD133 entre os grupos referentes à sobrevida câncer específica em 5 anos para os 88 pacientes.....	80
Tabela 25	Comparação de médias dos valores de expressão do gene BAP1 entre os grupos referentes à sobrevida câncer específica em 5 anos para os 88 pacientes.....	80
Tabela 26	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com variáveis clínicas em 77 pacientes portadores de CCRcc não metastático.....	82

Tabela 27	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas em 77 pacientes portadores de CCRcc não metastático.....	83
Tabela 28	Comparação de médias dos valores de expressão do gene CD133 entre os grupos referentes à sobrevida câncer específica em 5 anos para os 77 pacientes.....	86
Tabela 29	Comparação de médias dos valores de expressão do gene BAP1 entre os grupos referentes à sobrevida câncer específica em 5 anos para os 77 pacientes.....	86
Tabela 30	Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença em 5 anos de acordo com variáveis clínicas e demográficas em 77 pacientes portadores de CCRcc não metastáticos ao diagnóstico.....	88
Tabela 31	Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença em 5 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas em 77 pacientes portadores de CCRcc não metastáticos ao diagnóstico.....	89
Tabela 32	Comparação de médias dos valores de expressão do gene CD133 entre os grupos referentes à sobrevida livre de doença em 5 anos para os 77 pacientes.....	92
Tabela 33	Comparação de médias dos valores de expressão do gene BAP1 entre os grupos referentes à sobrevida livre de doença em 5 anos para os 77 pacientes.....	92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Tipos histológicos e respectivas alterações citogenéticas de carcinomas de células renais.....	5
Quadro 2	Sequência dos iniciadores e tamanho de fragmento que amplificam.....	35
Quadro 3	Eficiência de amplificação dos genes avaliados no estudo.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS	American Cancer Society
ACTB	Beta-actin human gene
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ASA	American Society of Anesthesiologists
BAP1	BRCA1 associated protein-1 ubiquitin carboxy-terminal hydrolase
BRCA1	breast cancer 1 gene
CCR	Carcinoma Células Renais
CCRcc	Carcinoma Células Renais subtipo células claras
CD133	Prominina humana 1
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid
CSS	Cancer Specific Survival
CTT	Células Tronco Tumerais
DFS	Disease Free Survival
DHL	Desidrogenase Láctica
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECOG	Eastern Oncology Cooperative Group
ENCARE	Estudo Nacional sobre Cancer Renal
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene
HCF1	host cell factor 1
HIF	Hypoxia Induced Factor
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene
IHQ	Imunohistoquímica
ILM	Invasão Linfática Microscópica
IRA	Insuficiência Renal Aguda
IRC	Insuficiência Renal Crônica
IVM	Invasão Vascular Microscópica
KDM5C	lysine K specific demetilase 5C
KPS	Karnofsky Performance Status
MMP2	Metaloproteinase 2

MMP9	Metaloproteinase 9
mRNA	messenger Ribonucleic Nuclear Acid
MSKCC	Memorial Sloan Kettering Cancer Center
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NLSs	nuclear localization signals
NP	Nefrectomia Parcial
NR	Nefrectomia Radical
OS	Overall Survival
PBRM1	Polybromo 1
PMR	Pequenas Massas Renais
RT-qPCR	Reverse transcriptase quantitative polimerase chain reaction
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatístico
SCE	Sobrevida Câncer Específica
SETD2	SET domain containing 2
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SPSS	Statistical Package for Social Science
SSIGN	Stage, Size, Grade, and Necrosis score
TNM	Tumor Node Metastases
UICC	Union for International Cancer Control
UISS	UCLA Integrated Staging System
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	Von Hippel Lindau

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Razões do Estudo	1
1.2	Revisão de Literatura	3
1.2.1	Epidemiologia	3
1.2.2	Classificação Histológica.....	4
1.2.3	Tratamento	5
1.3	Fatores Prognósticos	7
1.3.1	Fatores Clínicos, Anatômicos e Histopatológicos	7
1.3.2	Fatores Biomoleculares.....	11
1.4	Células Tronco	14
1.5	O gene CD13.....	16
1.6	Os Genes de Remodelação de Cromatina	22
1.7	O Gene BAP1.....	23
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	Objetivo Principal	28
2.2	Objetivos Secundários.....	28
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	29
3.1	CrITÉrios de Inclusão	29
3.2	CrITÉrios de Exclusão	29
3.3	Metodologia	30
3.3.1	Diagnóstico e Estadiamento.....	31
3.3.2	Procedimento Cirúrgico	32
3.3.3	Seguimento dos Pacientes.....	32
3.4	Técnica de RT-qPCR	33
3.4.1	Extração do RNA total, Tratamento com DNase e Síntese de cDNA	33
3.4.2	Desenho dos Iniciadores	34
3.4.3	Ensaio de RT-qPCR	35

3.5	Estatística	41
3.6	Análise de Risco e Aspectos Éticos	44
3.7	Casuística	45
4	RESULTADOS	53
4.1	Expressão Gênica do CD133	53
4.1.1	Pacientes sem metástases ao diagnóstico.....	55
4.2	Expressão Gênica do BAP1	58
4.2.1	Pacientes sem metástases ao diagnóstico.....	60
4.3	Análise de Sobrevida	63
4.3.1	Sobrevida Global (SG).....	63
4.3.2	Pacientes sem metástases ao diagnóstico.....	69
4.3.3	Sobrevida Câncer Específica (SCE)	74
4.3.4	Pacientes sem Metástase ao Diagnóstico	80
4.3.5	Sobrevida Livre de Doença (SLD).....	86
4.3.6	Análises Multivariadas.....	92
5	DISCUSSÃO.....	94
5.1	Aspectos Gerais.....	94
5.2	Expressão do CD133.....	96
5.3	Expressão do BAP1	102
6	CONCLUSÕES	113
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114

ANEXOS

Anexo 1 Ficha de levantamento de dados

Anexo 2 Estadiamento TMN (2010 – 7ª edição)

Anexo 3 Carta de aprovação da Comissão de Ética e Pesquisa do
A.C.Camargo Cancer Center (CEP)

1 INTRODUÇÃO

1.1 RAZÕES DO ESTUDO

O carcinoma de células renais (CCR) é responsável por 3% das neoplasias malignas do adulto e representa um dos cânceres urológicos mais letais. Trinta por cento dos pacientes tem metástases ao diagnóstico e 30 a 50% desenvolverão metástases após tratamento do tumor primário (KANAOKA et al. 2009). As razões para seu mau prognóstico para as doenças metastáticas são explicadas pela apresentação clínica tardia, assim como sua resistência à quimioterapia convencional, e respostas ainda insatisfatórias às terapias de alvo molecular, o que torna a forma metastática uma doença incurável (KANAOKA et al. 2009; EICHELBERG et al. 2009).

Devido ao aumento do diagnóstico precoce e incidental das massas renais, a maioria dos pacientes com CCR atualmente não apresentam sintomas significativos da doença. A tríade clássica de hematuria, dor e massa palpável em flanco, comumente descrita no passado, atualmente aparece em menos de 10% dos casos, geralmente indicando doença avançada (NARDI et al. 2010).

Quando detectado precocemente, CCR é curável por cirurgia, apresentando baixo risco de recorrência. Os tumores localizados (pT1-2) podem ser curados com cirurgia exclusiva. Recentemente, a tradicional nefrectomia radical tem sido substituída pela nefrectomia parcial (NP). A ressecção parcial é considerada atualmente padrão ouro no tratamento dos tumores de localização intrarrenal que tenham indicação para uma cirurgia poupadora de néfrons (FICARRA et al. 2009).

O tamanho do tumor isoladamente não é capaz de predizer seu comportamento. A agressividade e a velocidade de crescimento do tumor renal são heterogêneas e os padrões que podem definir este crescimento ainda não são bem estabelecidos (LAM et al. 2005).

O aumento dos diagnósticos incidentais e o envelhecimento da população fazem da observação vigilante uma opção para os pacientes com pequenas massas renais (PMR) (CAIRNS et al. 2011). Esta proposta terapêutica também pode evitar os riscos de uma cirurgia em pacientes com CCR associado à múltiplas comorbidades clínicas com alto risco anestésico. Além da observação vigilante, novas técnicas ablativas renais minimamente invasivas, como a crioterapia ou radiofrequência, estão disponíveis para tumores menores ou para pacientes de alto risco cirúrgico anestésico.

Atualmente, a escolha por um tratamento expectante ou uma técnica minimamente invasiva é baseada nas características clínicas do paciente e em características do próprio tumor, tais como: tamanho, extensão, velocidade de crescimento e dados de anatomia patológica obtidos através de biópsias percutâneas (CAIRNS et al. 2011). Por outro lado, portadores de neoplasias localmente avançadas ou metastáticas necessitarão de abordagem terapêutica agressiva e multidisciplinar.

Porém, mesmo nomogramas e modelos prognósticos, baseados em fatores clínicos e patológicos já bem estabelecidos na literatura, ainda carecem de aprimoramento. Observam-se importantes variações dos papéis de cada nomograma de acordo com a instituição onde foram desenvolvidos. Na maioria das vezes, a

acurácia preditiva destes modelos oscila entre 65% a 80% (KATTAN et al. 2001; PANTUCK et al. 2001).

Frente à tantas opções terapêuticas, buscamos na atualidade novos fatores prognósticos que contribuam com informações sobre o comportamento do CCR e, conseqüentemente, contribuam nas tomada de decisões terapêuticas frente às mais diversas situações clínicas. A resposta para esta busca pode estar no campo da biologia molecular. Várias linhas de pesquisas recentes focam em genes e proteínas pertencentes à vias envolvidas no aparecimento e crescimento de tumores. Marcadores de células tronco tumorais, vias de angiogênese, genes responsáveis por alterações epigenéticas e microRNA são algumas destas linhas de pesquisa.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Epidemiologia

O CCR é responsável por 3% de todas as neoplasias malignas. Segundo dados norte-americanos estimou-se que em 2014 seriam diagnosticados cerca de 63.920 novos casos e ocorreriam 13.860 mortes em decorrência da neoplasia naquele país (American Cancer Society-ACS 2014). No Brasil, sua incidência varia de 7 a 10 casos/100.000 habitantes, com maior predomínio em regiões mais industrializadas (WUNSCH-FILHO 2002). Ainda em nosso país, recente estudo epidemiológico demonstrou que em 73% dos CCR o diagnóstico é realizado através da ultrassonografia, e apenas 5,3% dos pacientes apresentam a “tríade clássica”: massa palpável, hematúria e dor (NARDI et al. 2010).

Trata-se da sétima neoplasia mais comum em homens e a nona mais comum

em mulheres. É mais frequente no sexo masculino numa proporção de 2:1 em relação ao sexo feminino, ocorrendo, predominantemente, entre a sexta e sétima décadas de vida (GUPTA et al. 2008).

Os fatores de risco mais comuns são: história familiar de CCR, tabagismo, índice de massa corpórea elevado, hipertensão arterial, uso de diuréticos e medicações anti-hipertensivas, dieta pobre em vegetais e frutas, insuficiência renal crônica, esclerose tuberosa e doença cística renal adquirida, além de síndromes de CCR familiar ou de síndromes de alto risco para CCR, como as Síndromes de von Hippel Lindau e Birt-Hogg-Dubbé e Síndrome de carcinoma renal papilífero, entre outras. Cabe lembrar que os casos esporádicos representam até 95% do total enquanto que 2 a 5% estão relacionados a CCR hereditários e familiares (LIPWORTH et al. 2006).

Devido a maior realização rotineira de estudos de imagem, em especial a ultrassonografia, nota-se aumento do número de casos diagnosticados incidentalmente, elevando o percentual de neoplasias em estágio inicial. Apesar desta migração do diagnóstico para estadios mais precoces, não se observa um impacto direto na diminuição da mortalidade pela doença (WOLDRICH et al. 2008). Em nossa instituição, os tamanhos medianos do CCR ao diagnóstico, em meados da década de 1990 foram quase 3,0 cm menores do que na metade da década de 1980 (9,0 versus 6,7 cm, respectivamente) (ZEQUI 2000).

1.2.2 Classificação histológica

O termo carcinoma de células renais designa as neoplasias parenquimatosas renais de origem epitelial com potencial maligno. O Quadro 1 apresenta os tipos

histológicos de CCR e suas respectivas prevalências e alterações citogenéticas.

Quadro 1 - Tipos histológicos e respectivas alterações citogenéticas de carcinomas de células renais

Tipo histológico	Prevalência	Alterações citogenéticas
Células claras	75%	-3p, +5q22, -6q, -8p, -9p, -14q
Papilífero	10%	+3q, +7, +8, +12, +16, +17, +20, -Y
Cromóforo	5%	-1, -2, -6, -10, -17, -21, hipoploidia
Ductos coletores (Bellini)	1%	-1q, -6p, -8p, -13q, -21q, -3p
Não classificados	4% - 6%	Desconhecido
Multilocular Cístico	Raro	Mutação do gene VHL
Medular	Raro	Perda do cromossomo 22
Carcinoma Tubulocístico	Raro	Trissomia do cromossomo 17
Translocação Xp11	Raro	t(X;1)(p11.2;q21), t(X;17)(p11.2;q25)
Mucinoso tubular	Raro	-1, -4, -6, -8, -13, -14 +7, +11, +16, +17
Pós-Neuroblastoma	Raro	Desequilíbrio alélico 20q13
Tireóide folicular carcinoma-like	Raro	+ 7q36, +8q24, +12, +16, +17p11-q11, 17
Doença renal terminal	Raro	Ganhos de cromossomos 7 e 17

Fonte: LOPES-BELTRAN et al. (2009)

É importante destacar que cada um dos tipos histológicos decorre de alterações citogenéticas e sítios epiteliais de origem distintos, acarretando em aspectos morfológicos diferentes. Assim sendo, apresentam história natural, agressividade e resposta a tratamentos variáveis, configurando o CCR não como uma doença única, mas como uma associação de neoplasias malignas distintas, que afetam o mesmo órgão, o rim (TELOKEN et al. 2009).

1.2.3 Tratamento

A base do tratamento do CCR é a cirurgia. São empregadas, basicamente, duas possibilidades cirúrgicas, a nefrectomia radical (NR) e a nefrectomia parcial

(NP). A primeira, descrita inicialmente por ROBSON et al. em 1969 tornou-se por muitos anos o tratamento padrão para os tumores considerados operáveis. O procedimento envolve a completa remoção do rim, cápsula de Gerota, ureter proximal e glândula supra-renal ipsilateral (BECKER et al. 2009).

Inicialmente, a NP foi empregada apenas de modo imperativo para portadores de insuficiência renal estabelecida ou iminente, tumores bilaterais, rins únicos e síndromes familiares de CCR nos quais as chances de recidiva tumoral são muito elevadas.

Os bons resultados obtidos com a NP, permitiram extrapolar a indicação eletiva da NP para pacientes com tumores de até 4,0cm e com rim contralateral normal. Apresenta como principal vantagem a preservação de parênquima renal associada à menores taxas de insuficiência renal crônica. Atinge elevado controle tumoral local e resultados oncológicos a longo prazo comparáveis ao procedimento radical (MARGULIS et al. 2009; BECKER et al. 2009).

Recentemente, alguns autores advogam a expansão do diâmetro tumoral de 4,0cm para 7,0 cm em casos selecionados e de topografia favorável para a realização da ressecção parcial (CAMPBELL et al. 2007).

Procedimentos minimamente invasivos, como crioablação e radiofrequência, têm sido utilizados em tumores pequenos e de topografia favorável, ambos aplicados por via percutânea ou laparoscópica. Na crioablação, a laparoscopia tem sido preferida por apresentar como vantagem a possibilidade de afastamento de órgãos vizinhos e a administração segura da energia térmica. As limitações para o uso dessas técnicas incluem a elevada taxa de recorrência local e dificuldade no acompanhamento radiográfico do sucesso da terapia instituída. Além disso, existem

poucos estudos em literatura mostrando sua real eficácia oncológica a longo prazo (GOEL e KAOUK 2008).

Para casos de pacientes com alto risco cirúrgico ou idade avançada e portadores de neoplasias iniciais de até 4 cm existe ainda a possibilidade de conduta expectante, através de vigilância ativa. Em meta-análise contendo 300 pacientes, os autores descreveram que a média de crescimento tumoral foi de 0,28cm por ano e somente 1% de todos os tumores desenvolveram metástases em seguimento médio de três anos (CHAWLA et al. 2006). Outros estudos sobre pequenas massas renais, até 4 cm, mostram que existe uma chance de 12 % de benignidade nestas massas e o risco de metástases pode chegar até 8% dos casos quando o tamanho esta entre 3 e 4 cm (KLATTE et al. 2008).

Para a doença metastática, a associação da NR, quando possível, com imunoterapia ou terapia com alvos moleculares é a opção de escolha. Em casos de metástase única é possível sua ressecção cirúrgica. Em pacientes portadores de múltiplas metástases, o tratamento deve ser individualizado. Drogas de alvo molecular como os inibidores de VEGF e inibidores de mTOR vêm mostrando resultados superiores a imunoterapia no que diz respeito a maior sobrevida global e menor taxa de efeitos colaterais (MOTZER et al. 2008; ESCUDIER et al. 2009).

1.3 FATORES PROGNÓSTICOS

1.3.1 Fatores clínicos, anatômicos e histopatológicos

Podemos dividir os fatores prognósticos em clínicos e patológicos. Os fatores clínicos são aqueles relacionados ao paciente em si. Compostos pelo estágio clínico,

seus sinais e sintomas, *status performance* e, por fim, pelos parâmetros laboratoriais como: hemoglobina, calcemia, provas inflamatórias e dados hematimétricos (MOTZER et al. 2008).

Os fatores patológicos são aqueles inerentes ao próprio tumor, como: estágio patológico, tamanho, grau de diferenciação, arranjo arquitetural, tipo histológico, extensão loco regional ou a distância, necrose e demais achados anatomopatológicos (CAMPBELL et al. 2007).

Dentre todos, os fatores prognósticos mais utilizados são o estágio clínico, o grau histológico de malignidade, o envolvimento linfonodal e a presença de metástases à distância (ROBSON et al. 1969; FUHRMAN et al. 1982).

Introduzido em 1959, o *Tumour-Node-Metastasis* (TNM) é o sistema prognóstico mais amplamente utilizado no CCR. FRANK et al. (2005) descreveu a validação da versão de 2002 *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) do TNM em estudo de coorte incluindo 2746 pacientes. O mesmo estudo demonstra superioridade de tal versão em relação a classificação prévia de 1997. O TNM se encontra atualmente na sua sétima edição e é, sem dúvida, o sistema prognóstico mais estudado e submetido a frequentes revisões pela própria AJCC, constituindo ferramenta importante na estratificação de pacientes portadores de CCR (EDGE et al. 2010).

O sistema TNM inclui, numa mesma ferramenta, três variáveis de grande importância prognóstica. O tamanho do tumor é fator isolado de sobrevida (DELAHUNT et al. 2002). As taxas de sobrevida câncer específica em 5 anos de pacientes com envolvimento linfonodal variam de 11% a 30%. E os pacientes portadores de metástases ao diagnóstico apresentam prognóstico reservado, com

sobrevida média de 6 a 10 meses (BLOM et al. 2009).

Também em nossa instituição, verificamos que paciente estadiados como pT3, que é um estadiamento que engloba tanto pacientes com invasão do tecido adiposo perirrenal (pT3a), quanto pacientes com acometimento venoso (pT3b-c), podem evoluir de forma diferente. Pacientes que apresentaram ambas as invasões (venosa e adiposa) configuraram o subgrupo de pior prognóstico (em comparação aos pacientes com invasão venosa ou adiposa isolada), com as piores taxas de sobrevida ($p=0,009$) e com 2,6 vezes mais chances de morte específica e 2,5 vezes mais chances de progressão ($p=0,04$) (DA COSTA et al. 2012a e b). Talvez nas próximas edições do sistema TNM, esses pacientes não devessem mais ser estadiados conjuntamente, mas numa nova categoria, que contemplasse esse acometimento concomitante (DA COSTA et al. 2012 a e b).

A graduação histológica de FUHRMAN et al. (1982) se baseia em características nucleares como: o tamanho do núcleo e nucléolos, a presença de irregularidades nucleares e a proeminência dos nucléolos. Em estudo utilizando análise multivariada, TSUI et al. (2000) reportaram que o grau de Fuhrman e o estágio clínico se apresentam como os fatores prognósticos mais relevantes

Os sistemas de classificação de Karnofsky e *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) (são os mais comumente aplicados para determinação de performance clínica em pacientes portadores de CCR (KARNOFSKY e BURCHENAL 1950). O papel prognóstico do ECOG foi recentemente confirmado em amplo estudo multicêntrico em pacientes submetidos a nefrectomia para doença localizada e metastática (PATARD et al. 2004). A classificação de performance de Karnofsky se mostrou fator preditivo independente de sobrevida para pacientes com

CCR metastático submetidos à terapias de primeira e segunda linha (MOTZER et al. 2002, 2004).

De maneira inédita, demonstramos, numa série de 145 casos de nossa instituição, que o emprego da Classificação da *American Society of Anesthesiology* pode ser uma ferramenta prognóstica adicional no CCR, apresentando impacto na análise uni e multivariada das taxas de sobrevida global, sobrevida câncer específica e sobrevida livre de doença ($p < 0,001$), tanto em pacientes com metástases, como naqueles sem metástases ao diagnóstico. Pacientes ASA 3 atingiram as menores taxas de sobrevida, tiveram menos tumores incidentais ($p = 0,043$) que os demais e apresentaram dez vezes mais metástases que os ASA1 e o dobro de metástases dos ASA2 ($p < 0,001$) (DE CASSIO ZEQUI et al. 2010).

Em nossa instituição, o estadiamento clínico, o alto grau de Fuhrman, reduzidos níveis de KPS e a ocorrência de metástases ou progressão foram fatores preditivos de óbito (ZEQUI 2008).

A análise de fatores isolados é pouco acurada, apresentam vieses e nem sempre são reprodutíveis. Diversos autores desenvolveram modelos preditivos integrados, conhecidos como nomogramas, utilizando-se de parâmetros anatômicos, demográficos, histopatológicos e clínicos. Tais modelos passaram a ser aplicados para melhor estratificação de risco de pacientes portadores de CCR e apresentam, em geral, acurácia superior à fatores prognósticos isolados. Porém, observam-se ainda importantes variações dos papéis de cada fator prognóstico, de acordo com a instituição onde tais nomogramas foram desenvolvidos e aplicados. Na maioria das vezes, a acurácia preditiva destes modelos oscila entre 65% a 80% (KATTAN et al. 2001; PANTUCK et al. 2001).

Dentre estes nomogramas de aplicação clínica destacam-se o do grupo da *Mayo Clinic* (FRANK et al. 2002) e o *UISS*, utilizado pelo grupo da Universidade da Califórnia (PANTUCK et al. 2001) para predizer evolução pós operatória de tumores renais operados. O modelo preditivo do *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (MSKCC) utiliza variáveis como tempo de recorrência após nefrectomia, anemia, calcemia, desidrogenase láctica (DHL) e *Karnofsky Performance Status* para predizer a resposta terapêutica do tumor à tratamentos sistêmicos para a doença metastática (EGGENER et al. 2006).

O aprimoramento destes modelos prognósticos pode ser alcançado através de marcadores biomoleculares que possam refinar a capacidade de predizer o comportamento de tais tumores e que apresentem real impacto na detecção das taxas de sobrevida global (SG), risco de metástases e recorrência tumoral.

1.3.2 Fatores biomoleculares

O entendimento do papel do gene de Von Hippel Lindau (VHL) e suas vias fisiopatológicas nas síndromes hereditárias como a Síndrome de Von Hippel Lindau, na qual o CCRcc é muito prevalente, possibilitou sua aplicação nos casos de Carcinoma de células renais tipo células claras (CCR cc) esporádico.

O *VHL* é um gene supressor tumoral localizado no cromossomo 3p que se encontra mutado e desativado em até 70% dos casos de CCRcc esporádico, resultando em produção deficiente de isoformas protéicas como pVHL19 e pVHL30. Uma das conseqüências de tal deficiência protéica é o acúmulo do Fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1 *Hypoxia Inducible Factor 1*) mesmo na ausência de condições de hipóxia tecidual (EICHELBURG et al. 2009). A inativação do *VHL* é o evento

primário mais prevalente na patogênese do CCRcc, contudo, sua perda isolada de função é insuficiente para o surgimento do CCRcc.

O papel prognóstico do *VHL* ainda é controverso (YAO et al. 2002; SCHRAML et al. 2002; RINI 2006) relatou taxa de resposta à terapia antiangiogênica de 48% nos pacientes com mutação do *VHL* versus 35% naqueles sem mutação. Vários estudos indicam que a perda da função do *VHL* não apresenta valor prognóstico e/ou preditivo (RANKIN et al. 2006). Recentemente nosso grupo investigou o gene e a proteína VHL e não detectou valor prognóstico (ALVES et al. 2014)

O papel do *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) é hoje um dos aspectos mais estudados no tratamento do CCR. Diversas drogas de potencial antiangiogênico como sunitinib e sorafenib figuram como opções de primeira e segunda linha terapêutica. Seu papel como possível marcador prognóstico é extensivamente pesquisado. Sua produção se encontra elevada nos casos de CCR com alterações de *VHL* e hiperexpressão de HIF-1. Está associado a maior agressividade tumoral, recorrência tumoral e pior SG (JACOBSEN et al. 2004; EICHELBERG et al. 2009). Em casuística desta instituição, a hiperexpressão ou hipoexpressão imunohistoquímica do VEGF não teve impacto prognóstico nas taxas de SG e SLD (ZEQUI 2008).

A via de sinalização do *Mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) se mostra alterada em diversas neoplasias. Constitui a segunda linha mais estudada de terapias de alvo molecular no CCR, com comprovada eficácia de drogas como o temsirolimus e o everolimus (MOTZER et al. 2008). Literatura sobre o possível papel prognóstico do mTOR como marcador molecular ainda é escassa. No entanto, a hiperexpressão

da proteína ribossômica S6 (pS6), alvo terapêutico de tais drogas, está presente em casos de CCR de grau e estágio avançados e é associada a pior evolução clínica (PANTUCK et al. 2007).

De maneira geral, a hiperexpressão do p53 é evento incomum no CCR e se apresenta mais frequentemente em metástases do que no tumor primário. Nota-se, predominantemente, em CCR não células claras, especificamente em carcinomas papilíferos. Está associada a menores taxas de SLD e SG (ZIGEUNER et al. 2004).

O marcador de proliferação celular MIB-1 / Ki-67 é citado como fator prognóstico de pior evolução em pacientes portadores de CCR. Em análise multivariada é descrito como preditivo de menor SG e maior recorrência tumoral (RIOUX-LECLERCQ et al. 2000; BUI et al. 2004). Em estudo com 55 pacientes de nossa instituição, este marcador apresentou baixa expressão e não teve valor prognóstico (ZEQUI 2000).

As metaloproteinases da matriz extracelular MMP-2 e MMP-9 estão presentes em inúmeras neoplasias e estão envolvidas em mecanismos de expansão tumoral e promoção de metástases. Apresentam alta expressão, predominantemente em CCR não células claras e se correlacionam com agressividade tumoral e menor SG (KALLAKURY et al. 2001). Em nossa casuística, embora a alta expressão de MMP2 e MMP 9 tenham se associado a tumores de alto grau, a expressão de ambas não teve valor prognóstico (ZEQUI 2008).

1.4 CÉLULAS TRONCO

Na mesma linha de pesquisa sobre novos possíveis marcadores biomoleculares em CCR, o estudo de células tronco parece apontar resultados promissores, tornando-se foco de pesquisas em várias áreas médicas.

Trata-se de células pluripotentes e dotadas de grande potencial clonogênico, envolvidas nos mecanismos de diferenciação e renovação celular de diversos tecidos. O mecanismo de diferenciação possibilita às células-tronco produzirem células progenitoras e células maduras envolvidas na gênese, manutenção e regeneração tecidual após estresse ou dano (WU 2008).

A renovação celular é a capacidade de produzir novas células-tronco com as mesmas características da célula mãe, de elevada pluripotencialidade. Em tecidos normais, esse processo de replicação possibilita à célula-tronco receber sinais da matriz extracelular e se dividir, dando origem à uma ou mais células-tronco. Essa expansão é, entretanto, restrita visando à prevenção de crescimento tecidual descontrolado (MORRISON e KIMBLE 2006).

São descritos três tipos de células-tronco: embrionária, germinativa e somática ou adulta. A célula tronco embrionária é originada durante o período que se limita a sexta divisão do óvulo fecundado. Dela derivam todos os tecidos e órgãos do organismo humano. Já a célula-tronco germinativa é aquela responsável pela produção de óvulos e espermatozóides nas gônadas feminina e masculina, respectivamente. Por último, existem as células-tronco somáticas, cujo potencial de proliferação e diferenciação é limitado em comparação às anteriores e estão envolvidas na produção de células maduras responsáveis pela renovação tecidual

(SELL et al. 2004).

Os diversos tipos de células-tronco não somente apresentam potenciais diferentes como também se proliferam de formas distintas. As células-tronco podem se dividir simetricamente, de tal maneira que cada célula filha mantém o potencial da célula mãe; ou assimetricamente, quando uma célula filha mantém essas propriedades e a outra inicia o mecanismo de diferenciação celular, em processo denominado determinação. As células-tronco embrionárias se dividem simetricamente. As células filhas mantêm a capacidade de totipotencialidade. A partir do momento em que se dá o processo de formação das camadas germinativas (endoderma, mesoderma e ectoderma), o mecanismo de determinação se inicia e as células passam a se proliferar assimetricamente (SELL et al. 2004).

No adulto, as células-tronco responsáveis pela renovação celular perdem sua totipotencialidade e passam a apresentar capacidade restrita de formação de diferentes células e tecidos, sendo então denominadas multipotentes. Essas células se dividem assimetricamente promovendo a formação de células progenitoras, as quais apresentam a capacidade de se dividir e de se diferenciar em diversos estágios, desempenhando importante papel na renovação tecidual (BONGSO e RICHARDS 2004).

Como mencionado previamente, as células-tronco adultas perdem sua totipotencialidade. A exceção a essa regra são as células germinativas. Essa linhagem celular é a única que mantém a expressão de Oct4, um importante fator de transcrição embrionária crítico para a manutenção de pluripotencialidade, ausente nos demais tecidos periféricos adultos. Alguns tumores de células germinativas, como o carcinoma embrionário e o teratoma, são capazes de produzir células

diferenciadas de praticamente todos os órgãos adultos e tecidos placentários (PESCE et al. 1998; YOSHIMIZU et al. 1999).

1.5 O GENE CD133

Em 2005, um grupo de pesquisadores italianos demonstrou a presença de células progenitoras no córtex renal humano, capazes de induzir a formação de estruturas epiteliais tubulares quando injetadas em camundongos imunodeficientes. Essas células tinham como característica a expressão do antígeno CD133 na membrana celular e apresentavam capacidade de renovação celular e diferenciação em células epiteliais e endoteliais (BUSSOLATI et al. 2005).

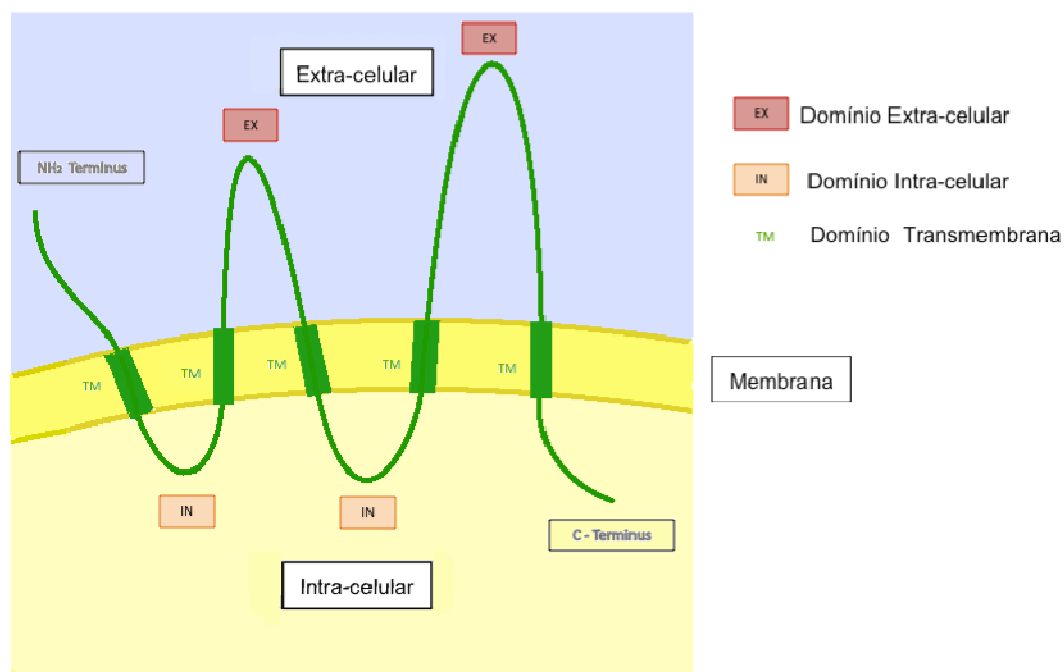
Posteriormente, novo estudo demonstrou a presença de células progenitoras multipotentes presentes na cápsula de Bowman de rins adultos de pacientes submetidos a nefrectomias. As células isoladas expressavam os marcadores CD133 e CD24 e quando injetadas em camundongos portadores de insuficiência renal aguda (IRA) induzida promoveram a regeneração de estruturas tubulares de diferentes regiões do rim. Notaram ainda melhora morfológica e fisiológica do dano tecidual ocasionado pela insuficiência renal (SAGRINATI et al. 2006).

Já em 2009, estudo experimental isolou população de células-tronco mesenquimais no glomérulo renal humano após retirada da cápsula de Bowman. Elas apresentaram, *in vitro*, capacidade de formação de tecidos mesenquimais como adipócitos, osteócitos e condrócitos. Tinham como característica a expressão de CD146, porém a não expressão de CD133 (CD133 - / CD146 +), ao contrário dos achados nos estudos anteriores, sugerindo origem embrionária diferente (BRUNO et

al. 2009).

Num rim normal, já está bem estabelecido que as células CD 133 + exibem propriedades de células tronco, tais como: auto-renovação, multi potencialidade e importante papel na regeneração tecidual renal. Porém, o significado da expressão do CD 133 nas patologias renais malignas necessitava de futuras investigações (KIM et al. 2011).

A glicoproteína de membrana CD133 foi a primeira proteína da família das pentaspaninas a ser identificada em células humanas por Yin et al. em 1997, citado por MIZRAK et al. (2008, p.3). Ela é produzida a partir do gene de mesmo nome localizado no cromossomo 4. Apresenta tamanho de 115 Kd e caracteriza-se por expressão predominante nas regiões de protrusão da membrana plasmática como os microvilos epiteliais (Figura 1). Foi originalmente classificada como marcador de células primitivas hematopoiéticas e neurais. Devido justamente a essa característica, despertou interesse acadêmico quanto ao seu potencial de possível marcador de células-tronco adultas.



Fonte: Adaptada de WU e WU (2009).

Figura 1 - Estrutura molecular do CD133, demonstrando grupo amino-terminal extracelular, cinco domínios hidrofóbicos transmembrana, duas alças citoplasmáticas e um domínio carboxi-terminal citoplasmático.

Como citado, postula-se que as CTT se originem de células-tronco somáticas ou de descendentes celulares próximas a elas como células progenitoras. Esse fato gerou interesse sobre o papel desse marcador em diversos tipos de neoplasias. Tal antígeno foi, posteriormente, detectado em diversos tipos de neoplasias hematopoiéticas como síndrome mielodisplásica e leucemia linfóide crônica e aguda (MAW et al. 2000; MIZRAK et al. 2008).

Estudos descrevendo suas propriedades morfológicas e bioquímicas sugerem que o CD133 desempenhe papel importante na fisiologia e morfogênese das protrusões da membrana celular durante o processo de migração da célula (MAW et al. 2000; RÖPER et al. 2000; CORBEIL et al. 2001).

Apresenta-se predominantemente expresso na superfície apical de células-tronco somáticas neuroendoteliais e em diversos outros tipos de epitélio, incluindo o rim, onde se observa no túbulo proximal, porém não está presente no túbulo distal e células do sistema coletor (WEIGMANN et al. 1997).

Corroborando com essa observação, estudo de 2004, com casuística reduzida (n=12), demonstrou a expressão desse antígeno em células tumorais de carcinoma de células claras e carcinoma papilífero de rim, neoplasias derivadas do túbulo proximal. Não se notou, entretanto, expressão em casos de carcinoma cromóforo e de ductos coletores (FLOREK et al. 2005).

Ainda sobre o papel das células CD133+ na oncogênese renal, KIM et al. (2011) demonstrou que, apesar de não poder ser confirmado como um marcador de células tronco tumorais, o CD 133 se mostrou um marcador prognóstico favorável. Sua hiperexpressão imunohistoquímica esteve associada à tumores mais diferenciados e não metastáticos. Devido ao pouco tempo de acompanhamento, a análise da curva de sobrevida livre de doença foi prejudicada. Porém, todos os casos de morte relacionada ao CCR apresentavam baixa expressão do marcador CD 133.

Em recente dissertação de Mestrado em Oncologia, de um membro do nosso grupo, pela Fundação Antônio Prudente-SP, foi demonstrado em 142 pacientes com CCR que a baixa expressão imunohistoquímica do marcador CD 133 é evento desfavorável, se associando a ocorrência de invasão vascular microscópica e a redução de todas as taxas de sobrevida estudadas (SG, SCE e SLD) na análise univariada, sendo aceito para publicação no *World Journal of Urology* (DA COSTA 2011). Estes achados em câncer renal mostram resultados conflitantes com o padrão de expressão tumoral do CD 133 em casos de tumores em outros órgãos sólidos,

afinal, nos estudos dos outros órgãos, era a hiperexpressão da proteína CD 133 que estava relacionada à fatores de pior prognóstico.

Dentre todos os métodos de biologia molecular empregados, a imunohistoquímica é o mais amplamente utilizada nas pesquisas atuais. Apesar das vantagens do seu baixo custo e sua relativamente simples realização, a IHQ pode apresentar algumas falhas técnicas decorrentes do processo de conservação e parafinização do material analisado (fatores pré-analíticos), do processo de recuperação antigênica, dos sistemas de leitura e de erros na escolha dos anticorpos (BUSSOLATI et al. 2005).

Além das falhas técnicas inerentes ao método imunohistoquímico, KEMPER et al. (2010) demonstrou a presença do RNA mensageiro do CD 133 em células tumorais diferenciadas de carcinoma de cólon que não apresentavam a expressão imunohistoquímica da proteína CD 133 na superfície celular. Os autores sugerem que uma mudança no padrão de glicosilação de epítomos específicos levaria uma alteração na expressão imunohistoquímica da proteína.

A expressão imunohistoquímica da proteína CD 133, é dependente do reconhecimento dos epítomo AC 133 por parte do anticorpo marcado AC 133. Para que isto ocorra, é necessário que o epítomo esteja glicosilado, caso contrário, mesmo com a presença da proteína CD 133, não há a ligação do anticorpo ao epítomo e, consequentemente, a expressão imunohistoquímica será negativa (BIDLINGMAIER et al. 2008).

O estado de glicosilação de uma célula e de suas proteínas transmembranas mudam de acordo com seu grau de diferenciação e transformação maligna (CORBEIL et al. 2000). Portanto, a expressão do epítomo AC 133 não deve ser

considerada sinônimo da real presença da proteína CD 133.

No processo de validação de um biomarcador tumoral, o "ponto-chave" é a validação da metodologia aplicada para a análise do material (MARCHIÒ et al. 2011). Para tanto, a análise de um mesmo marcador através de duas técnicas biomoleculares diferentes aumenta a confiabilidade dos achados prognósticos inferidos a partir de sua expressão molecular.

Portanto, uma complementação do estudo do papel do CD 133 como marcador tumoral no CCR seria através da análise e quantificação de seu RNA mensageiro. Sabe-se que o metabolismo de RNA mensageiros (mRNA) é um processo regulado por diversas vias de sinalização, com envolvimento de proteínas e micro RNAs (miRNA) e é fundamental no controle da expressão gênica. A importância deste nível de regulação é evidente em uma variedade de doenças, onde a perda da regulação pós-transcricional do gene contribui diretamente para a hiperexpressão de muitos genes envolvidos com fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, e proto-oncogenes (SANDUJA et al. 2010).

Dentre várias técnicas possíveis, a reação de *real time* RT-qPCR (*Reverse transcriptase quantitative polimerase chain reaction*) é um método rotineiramente utilizado para a investigação da expressão dos transcritos de um determinado gene. Em particular, o RT-qPCR é utilizado para confirmar resultados de outras técnicas biomoleculares e para a quantificação de transcritos pouco abundantes ou transcritos com grande variabilidade entre um grupo de interesse (PAGE et al. 2011).

1.6 OS GENES DE REMODELAÇÃO DE CROMATINA

Na busca por genes supressores tumorais envolvidos na gênese do CCR, DALGLIESH (2010) confeccionou a sequencia exômica de 101 casos de CCR e percebeu uma significativa presença de mutações novas em genes envolvidos na remodelação de cromatina. Dentre os genes mutados podemos citar: o **SETD2** (SET domain containing 2), o **KDM5C** (lisyne K specific demetilase 5C), o **BAP1** (BRCA1 associated protein-1 ubiquitin carboxy-terminal hydrolase) e o **PBRM1** (Polybromo 1).

Trabalhos subsequentes também indicavam uma alta frequência de mutações truncadas destes mesmos genes de remodelação de cromatina. Em uma série de casos de CCR, VARELA et al. (2011) identificou a mutação no *PBRM1* em 41% dos CCRcc, definindo este gene como a segunda mutação mais comum no CCRcc, atrás apenas do *VHL*. Em outra série de CCR, GUO et al. (2012) encontrou as seguintes frequencias de mutações: *VHL* (27%), *PBRM1* (21%), *KDM5C* (9%), *BAP1* (8%) e *SETD2* (4%).

Um aspecto torna este achado particularmente interessante. Três dos 4 genes relatados (*PBRM1*, *SETD2* e *BAP1*) estão localizados no braço curto do cromossomo 3 (locus 3p21), o mesmo braço do *VHL* (locus 3p25), mostrando que uma perda de um dos alelos do braço 3p poderia resultar na perda de função de 4 genes com possíveis ligações funcionais entre si (TOMA et al. 2008).

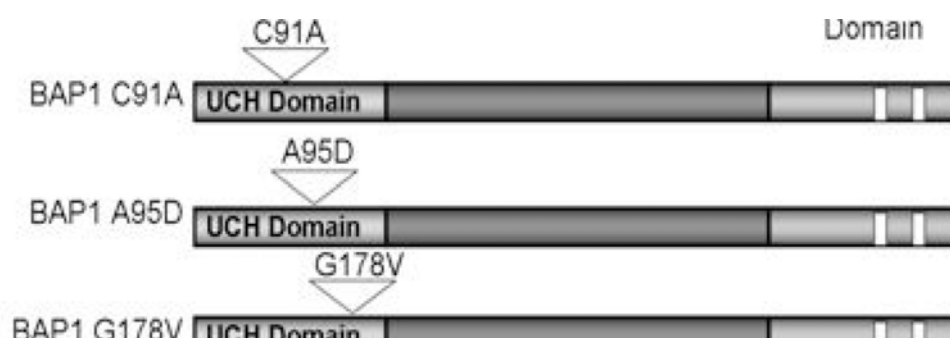
Um recente estudo filogenético da heterogeneidade nos CCRcc sugeriu que as mutações dos genes moduladores de cromatina seriam eventos secundários e contribuiriam para o surgimento de fenótipos invasivos e metastáticos desta

neoplasia (GERLINGER et al. 2012). Considerando que a mutação/perda de função do *VHL*, um evento quase universal na carcinogênese do CCR, tem baixos poderes prognóstico e preditivo, as alterações dos genes de remodelação de cromatina podem ser encaradas como potenciais novos marcadores prognósticos e preditivos no CCRcc.

1.7 O *BAP1*

Incluso neste achado de mutações relacionadas ao CCR, o BAP1 (BRCA1 associated protein) é uma enzima de deubiquitinação pertencente ao sistema proteassômico de ubiquitinação. Está localizada no núcleo celular, com um domínio C-terminal ubiquitina hidrolase (UCH) e dois domínios sinalizadores da localização nuclear (nuclear localization signals - NLSs). (Figura 2)

O primeiro domínio é responsável pela atividade de deubiquitinação da proteína BAP1, enquanto o segundo é responsável pela localização do BAP1 no núcleo celular. Mutações inativadoras em qualquer um destes domínios estão associadas ao processo de tumorigênese. Seu gene está localizado no braço curto do cromossomo 3 (3p21.3). Este locus é reconhecidamente alvo de mutações do tipo missense. Além disso, deleções do 3p são muito comuns em diversos tipos de cancer, tais como: carcinoma pulmonar de pequenas células e não pequenas células, carcinomas de mama e carcinomas de células renais (ANGELONI et al. 2007).



Fonte: VENTII et al. (2008).

Figura 2 - Estrutura do gene BAP 1.

Originalmente, o BAP1 foi identificado como uma enzima capaz de interagir com a proteína do gene de suscetibilidade ao câncer de mama, o BRCA1 (JENSEN et al. 1998). Seu papel como supressor tumoral da via do BRCA1 é conhecido e exemplificado em estudos com células tumorais de mama in vitro (JENSEN et al. 1998). Como a proteína BRCA1 humana é uma ubiquitina ligase, a primeira hipótese era o BRCA1 como substrato da atividade de deubiquitinação do BAP1. Esta hipótese foi posteriormente rejeitada por estudos demonstrando que a ação do BAP1 é independente do substrato proteico do BRCA1 (BUCHHAGEN et al. 1994).

VENTII et al. (2008) conseguiu demonstrar que todos os alelos mutantes do *BAP1* produziam proteínas com menor atividade de deubiquitinação. Além disso, a proteína produzida pelo alelo selvagem do BAP1 era irreversivelmente inativada e marcada por um conhecido inibidor de enzimas de deubiquitinação, o Ub-VS. Por sua vez, proteínas produzidas por alelos mutantes não eram marcadas por este inibidor, provando que o sítio ativo estava alterado nos produtos dos alelos mutantes.

Este mesmo grupo conseguiu, pela primeira vez, reunir fortes evidências sobre as características necessárias para classificar o *BAP1* como um gene supressor tumoral: estar mutado no câncer, ter sua capacidade de inibir crescimento celular

inativada por mutações associadas ao câncer e, ser capaz de voltar a inibir o crescimento celular após a restauração da proteína selvagem em células tumorais mutadas (VENTII et al. 2008).

O sistema proteossômico de ubiquitinação é parte integrante das principais funções celulares, incluindo: ciclo celular, tradução e reparo de DNA (MANNI et al. 2005). Mutações nos componentes deste sistema de ubiquitinação podem aumentar o efeito de oncogenes ou diminuir a função de genes supressores tumorais. Por ser parte deste sistema, o BAP1 tem função de supressor tumoral na regulação do ciclo celular, através da indução de apoptose, necrose ou ambos (VENTII et al. 2008).

Dentre os principais mecanismos do BAP1 no controle do ciclo celular estão sua interação com o HCF1 (host cell factor 1) (MACHIDA et al. 2009) e sua capacidade de realizar a deubiquitinação da histona monoubiquitinada H2Aub1 (SCHEUERMANN et al. 2010).

Dentre os dois mecanismos, o mais importante e determinante no controle do ciclo celular é a ligação com o HCF1. O HCF1 serve como apoio para vários complexos de remodelação de cromatina (KRISTIE et al. 2010). É capaz de se ligar a múltiplos fatores de transcrição para o recrutamento de várias enzimas de modificação de histonas como metiltransferases, demetilases, deacetilases e acetiltransferases (SMITH et al. 2005; LIANG et al. 2009). Estudos de imunoprecipitação em extrato de células cancerosas renais demonstraram que, na maioria das células, o BAP1 está ligado ao HCF1 (YU et al. 2010).

Estes achados demonstram o *BAP 1* como um gene supressor tumoral no CCRcc, funcionando de acordo com a teoria "two-hit tumor supressor". A perda inicial do braço pequeno do cromossomo 3 pode inativar vários genes ligados à

supressão tumoral no CCRcc, incluindo o *VHL* e o *BAP1*. A maneira de inativação do segundo alelo do *BAP1* é específica de cada órgão ou tecido. Nos mesoteliomas, por exemplo, ambos os alelos devem ser inativados por mutações pontuais ou inserções (TESTA et al. 2011). No CCRcc, esta perda do 3p leva à um estado celular de vulnerabilidade para a perda do segundo alelo do *BAP1*.

As implicações clínicas da perda da função do *BAP1* nos tumores ainda carecem de exploração. Sabe-se que, no melanoma uveal, esta perda do *BAP1* apresenta correlação com fenótipos tumorais de alto grau e com o desenvolvimento com metástases (HARBOUR et al. 2010).

Em um dos primeiros estudos translacionais estudando o desfecho clínico de 185 espécimes de pacientes portadores de CCRcc analisados por sequenciamento genico, HAKIMI et al. (2013) demonstraram associação entre as mutações do *BAP1* com tumores de maior grau nuclear de Fuhrman e associação com uma pior sobrevida cancer-específica nestes pacientes.

Em outro estudo multicentrico recente, os autores encontraram uma taxa de mutação de 15% para o *BAP1* no CCRcc. Conjuntamente, perceberam a ocorrência de mutações exclusivas entre dois importantes genes na carcinogênese do CCR: o *BAP1* e o *PBRM1* (BRUGAROLAS et al. 2013). Este achado de mutações exclusivas entre eles já havia sido reportado anteriormente (PEÑA LLOPIS et al. 2012; HAKIMI et al. 2013).

Utilizando duas amostras distintas de pacientes com CCRcc, os autores classificaram os tumores em mutados para o *BAP1* e mutados para o *PBRM1*. Comparando os dois grupos entre si, foi possível perceber uma clara distinção entre os grupos, com a mutação *BAP1* associada à marcadores de pior prognóstico como:

maior grau nuclear, presença de necrose tumoral e avanço patológico no estágio T. Além disso, o grupo com a mutação *BAP1* apresentou pior sobrevida global, estatisticamente significativa, em ambos os grupos de pacientes. Por sua vez, a mutação exclusiva de *PBRM1* pareceu associada a tumores mais favoráveis. Por fim, nos raros casos onde ambas as mutações estavam presentes, o padrão sarcomatóide na anatomia patológica estava sempre presente (HAKIMI et al. 2013).

A análise da expressão gênica, a partir de sequenciamento, possibilita a distinção entre as expressões dos dois grupos, com grupos distintos de genes expressos em cada um deles. De maneira geral, os genes expressos nos tumores com mutação *BAP1* estavam implicados em fatores de crescimento, enquanto os genes expressos no grupo com *PBRM1* mutado eram relacionados com a arquitetura tissular e citoesqueleto (HAKIMI et al. 2013).

O CCRcc é caracterizado por mutações do *VHL*, porém a inativação deste gene sozinha não é suficiente para a iniciação da tumorigênese.

A perda do do braço curto do cromossomo 3 deixa apenas um alelo do *BAP1* e do *PBRM1*. Mutações nos alelos remanescentes destes genes podem ajudar o processo de tumorigênese do carcinoma renal desde o seu início, agindo como mutações tronco, presente em todas as células tumorais (GERLINGER et al. 2012). A diferença de agressividade de cada tumor pode ser estabelecida a partir do grupo de gene que encontra-se mutado, abrindo caminho para um modelo de classificação biomolecular dos CCRcc. Além disso, por serem mutações tronco, podendo estar presentes em todas as células tumorais desde o início do processo tumoral, estas mutações apresentam grande potencial como alvo de terapias direcionadas nos próximos anos (SIVANAND et al. 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Estudar a expressão do RNA mensageiro dos genes *CD133* e *BAP1* no tumor primário de pacientes portadores de CCRcc submetidos à tratamento cirúrgico e correlacioná-la como fator prognóstico para a doença.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Avaliar a expressão do mRNA do *CD 133* e do *BAP1* no CCRcc e também no tecido renal não neoplásico;

Analisar o impacto de seus níveis de expressão nas taxas de SG, SCE e SLD e tentar correlacioná-los com variáveis clínicas e anatomopatológicas com valor prognóstico reconhecido.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

A população do estudo foi definida pelos seguintes critérios:

3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- CCR subtipo células claras (CCRcc), comprovado histologicamente;
- Tratamento cirúrgico exclusivo, realizado no Hospital AC Camargo.

3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes tratados em outros serviços;
- Pacientes submetidos a outros tratamentos para o CCR previamente à cirurgia;
- Pacientes com carcinoma de células renais que não sejam do subtipo células claras;
- Prontuários com dados incompletos ou faltantes;
- Pacientes que tenham abandonado o seguimento por um período superior ao dobro daquele solicitado para seu retorno, desde que não se consiga informações ao seu respeito através de contato telefônico ou por escrito.

3.3 METODOLOGIA

Foram selecionados os prontuários do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) e o material em arquivo anatomopatológico e no banco de tumores de pacientes portadores de ccCCR, disponíveis no Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center, tratados inicialmente por cirurgia pelo Núcleo de Urologia do Departamento de Cirurgia Pélvica do A.C. Camargo Cancer Center, entre 2000 e 2010. Por se tratar de um projeto piloto, com prazo determinando para término (Mestrado *strictu sensu*) e com disponibilidade de material para análise máxima de 100 casos; selecionamos todos 88 pacientes que dispunham de alíquotas de RNA já extraídas para pronta análise no Biobanco da instituição.

Os dados coletados destes 88 pacientes portadores de carcinoma de rim foram registrados em uma ficha de levantamento de dados previamente definida (**Anexo 1**). As variáveis consideradas foram: idade, sexo, cor, estado geral (*ECOG status*), sintomatologia, tabagismo, tempo de evolução, presença de síndromes familiares, lateralidade de lesão, tempo de evolução, níveis de hemoglobina pré e pós-operatórios, tipo de cirurgia, data da cirurgia, complicações pré-operatórias precoces e tardias, estadiamento pelo TNM AJCC/UICC 2010 (Sétima edição), graduação de Fuhrman, tamanho da lesão em centímetros (maior diâmetro no exame anatomopatológico), topografia, tipo histológico pelo Consenso de 2002 (DELAHUNT e EBLE 2004), arranjo arquitetural tissular, invasão de órgãos adjacentes, multifocalidade, invasão vascular microscópica (IVM), acometimento linfonodal, presença de necrose tumoral, evolução pós-operatória, tempo de seguimento, presença de metástases e data de sua detecção, tratamento das

metástases, situação clínica ao final do estudo, realização de transfusão, além da expressão gênica dos genes *CD133* e *BAP1*.

Foram estudados os respectivos materiais devidamente arquivados em parafina no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo da Fundação Antônio Prudente de São Paulo que foram passíveis de confirmação diagnóstica.

Os mRNA foram extraídos dos espécimes cirúrgicos congelados correspondentes de cada caso para posterior confecção do DNA complementar (cDNA) dos genes *CD133* e *BAP1*.

Concomitantemente, foi realizada análise de tecido não neoplásico (distando mais de 1,0 cm do tumor) obtido dos espécimes cirúrgicos congelados. Apenas 09 pacientes tinham material não neoplásico disponíveis para comparação entre os graus de expressão dos referidos marcadores em CCRcc entre tecido neoplásico e não neoplásico.

3.3.1 Diagnóstico e Estadiamento

Todos os pacientes foram avaliados inicialmente por exame clínico geral. Os pacientes foram indagados quanto a presença de sinais e sintomas relacionados à neoplasia renal. Utilizou-se a Tomografia Computadorizada de Abdômen como método de imagem padrão para confirmação diagnóstica.

O estadiamento clínico foi realizado pelo sistema TNM AJCC/UICC 2010 (Sétima edição), (**Anexos 2**). As metástases pulmonares foram investigadas através de radiografias de tórax realizadas nas incidências pósterio-anterior e perfil. Quando se observou lesões pulmonares suspeitas ou duvidosas, utilizou-se a tomografia

computadorizada de tórax para confirmação de possíveis focos tumorais metastáticos. Cintilografia óssea foi solicitada apenas nos casos de suspeita clínica de metástases ósseas (sintomatologia, alteração laboratorial sugestiva ou doença metastática em múltiplos sítios). A investigação do sistema nervoso central só foi realizada em casos de suspeita clínica deste acometimento.

3.3.2 Procedimento Cirúrgico

Todos os pacientes foram tratados por cirurgia. O tipo de cirurgia realizada variou de acordo com a extensão do tumor e preferência do cirurgião. Os procedimentos realizados foram: nefrectomia radical convencional ou por técnica vídeo-laparoscópica, nefrectomia parcial convencional ou por técnica vídeo-laparoscópica. Nos casos submetidos a ressecções parciais, foi observada margem cirúrgica macroscópica mínima e, em casos selecionados, utilizou-se técnica anatomopatológica de congelação para exclusão de neoplasia residual.

3.3.3 Seguimento dos pacientes

O acompanhamento dos pacientes foi realizado em consultas ambulatoriais. As consultas foram realizadas trimestralmente no primeiro e segundo anos. Do segundo ao terceiro ano de seguimento estas consultas passaram a ser semestrais, e após o terceiro ano, realizadas anualmente.

Em todas as consultas, era realizado exame físico sistemático. Exames laboratoriais e de imagem foram utilizados rotineiramente durante o acompanhamento clínico. Em casos suspeitos de recidiva local ou sistêmica, utilizou-se a tomografia computadorizada para confirmação diagnóstica.

Os pacientes foram classificados a partir do seguimento em:

- a) vivos sem câncer;
- b) vivos com câncer;
- c) mortos pelo câncer ou por complicação do tratamento, incluindo óbito pós-operatório (até 30 dias pós-cirurgia);
- d) mortos por outras causas;
- e) perdidos de seguimento.

3.4 TÉCNICA DE RT-QPCR

3.4.1 Extração do RNA total, tratamento com DNase e síntese de cDNA

A extração de RNA total das amostras de tecido congelado foi realizada pelo Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center utilizando o método TRIzol (Life Technologies) ou RNeasy Mini Kit (Qiagen). A concentração do RNA foi obtida pela leitura no equipamento de espectrofotometria NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e a integridade do RNA foi avaliada por eletroforese capilar, utilizando o RNA 6000 Nano (Agilent) no equipamento 2100 Bioanalyzer (Agilent).

Inicialmente, foi realizado tratamento para degradação de DNA genômico contaminante, a partir de 2ug de RNA total utilizando 1 unidade da enzima DNaseI [TURBO DNA-free™ Kit (Ambion®)], por 30 min a 37⁰C, seguindo as recomendações do fabricante. Para checar a eficiência do tratamento e ausência de DNA genômico nas amostras, foi realizada uma reação de PCR com iniciadores localizados nos íntrons do gene *GAPDH* (iniciador *forward*: GCTCCCACCTTTCTCATCC e iniciador *reverse*: CTGCAGCGTACTCCCCAC), a

partir de 200 ng do RNA total tratado das amostras, utilizando a enzima *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen®), segundo as recomendações do fabricante. A eficiência do tratamento foi constatada pela ausência de amplificação do fragmento de 147 pb em gel de agarose 1% (figura 03) confirmando ausência de moléculas de DNA genômico nas amostras. Como controle positivo da reação foi utilizado 200 ng de DNA genômico purificado a partir de linhagem celular.



Figura 3 - Confirmação da ausência de DNA genômico nas amostras de RNA tratadas com DNase pela avaliação em gel de agarose 1% dos produtos da PCR. Exemplo de ausência de amplificação do fragmento de 147pb em 22 amostras (1 a 22) confirmando a eficiência do tratamento de degradação do DNA genômico. Na posição C está a amplificação do fragmento de 147pb a partir de uma amostra de DNA genômico utilizada como controle positivo da reação de amplificação. M – Marcador de peso molecular 100pb.

Em seguida foi realizada a síntese do cDNA pela transcrição reversa de 1µg de RNA com oligonucleotídeo Oligo dT-18 e a enzima *Superscript III* (Invitrogen®), em volume final de 20µl, seguindo as recomendações do fabricante.

3.4.2 Desenho dos iniciadores

Os iniciadores *forward* e *reverse* foram desenhados em 2 exons adjacentes para evitar possíveis resultados artefatuais resultantes de contaminação genômica e seguiram os seguintes critérios: temperatura de anelamento próxima a 60°C;

composição de bases pirimidinas C e G cerca de 60%; tamanho do oligonucleotídeo de aproximadamente 20 pb e tamanho de fragmento amplificado de aproximadamente 100 pb. A sequência dos iniciadores desenhados para os dois genes de interesse e para os 3 genes normalizadores estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - Sequência dos iniciadores e tamanho de fragmento que amplificam.

Gene	Iniciador Foward	Iniciador Reverse	Tamanho do fragmento
<i>BAP1</i>	5' GACCCACAACACTACGATGAG 3'	5' CACGGAGATGTTCTGCTC 3'	94pb
<i>CD 133</i>	5' CCTGTTATGACAAGCCCATC 3'	5' CCTTGTAGACCCAGAACTAC 3'	114pb
<i>ACTB</i>	5' GCACCCAGCACAATGAAG 3'	5' CTTGCTGATCCACATCTGC 3'	117pb
<i>GAPDH</i>	5' GAAGGTGAAGGTCGGA 3'	5' GGGTCATTGATGGCAAC 3'	102pb
<i>HPRT1</i>	5' CCCACGAAGTGTGGATATAAGC 3'	5' GGGCATATCCTACAACAACTTGTC 3'	74 pb

3.4.3 Ensaios de RT-qPCR

As reações de RT-qPCR foram realizadas no aparelho *ABI Prism® 7500 fast Sequence Detection System* (Life Technologies) em um volume final de 20µl, contendo 10µl de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies), 100nM a 400nM de cada iniciador e cDNA convertido a partir de 10ng de RNA total, nas condições universais de ciclagem, sugeridas pelo fornecedor. Ao final da amplificação, foi realizada uma etapa de curva de dissociação, por um aumento gradual na temperatura, de 60°C para 95°C a 0,2°C por segundo, com a contínua aquisição da fluorescência para confirmação da especificidade da amplificação. As reações foram realizadas em duplicatas em placas de 96 wells - MicroAmp® Optical (Applied Biosystems).

As reações foram realizadas em duplicata e foram aceitas diferenças máximas de 0,7 Cq (*Ciclo de quantificação* – ciclo no qual é detectada a fluorescência) entre

as duplicatas. Para cada gene, foram montadas 2 placas de 96 wells com as amostras tumorais e uma placa com as amostras não neoplásicas. Em cada placa, foi também inserida uma amostra calibradora (cDNA de linhagem celular HEK293). Ao se calcular o valor de expressão de cada amostra relativo ao valor de expressão da amostra calibradora, é possível comparar valores de expressão de amostras avaliadas em placas diferentes.

A Padronização

Foram testadas inicialmente três concentrações finais de iniciadores (800nM, 400nM e 200nM), seguindo recomendações do fornecedor do equipamento. Para os genes normalizadores, foi estabelecida a concentração de 200nM e para o gene *PROM1* a concentração de 400nM (Figura 2). No entanto, para o gene *BAP1*, em todas as 3 condições testadas foi observado formação de dímeros de *primers*, pela detecção de dois picos na curva de dissociação (Figura 4A). Foram então realizados testes com diferentes concentrações do iniciador *forward* e iniciador reverso, e estabelecida a condição em que a concentração final do *primer forward* foi de 200nM e a do *primer reverso* 100nM (Figura 4B).

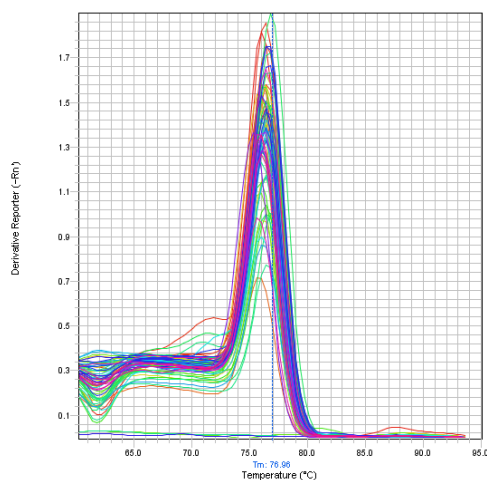


Figura 4A - Curva de dissociação para padronização da concentração de *primers* para amplificação de fragmento referente ao gene *PROM1*.

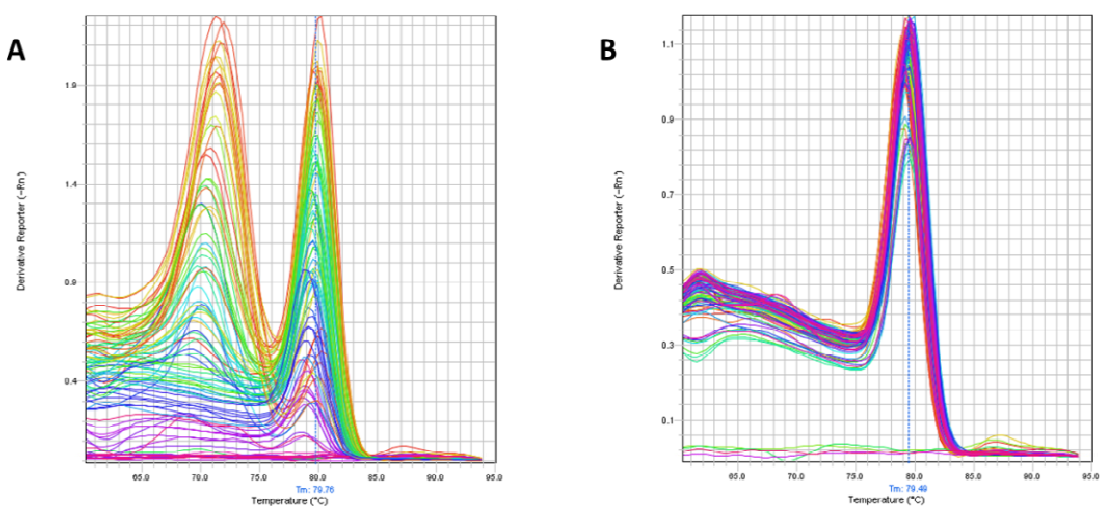


Figura 4B - Curva de dissociação para padronização da concentração de *primers* para amplificação de fragmento referente ao gene *BAP1*. A – Curva de dissociação das concentrações de 800nM, 400nM e 200nM resultaram em dois picos. O pico próximo a temperatura de 80°C resulta da amplificação do fragmento de interesse, enquanto que o pico próximo a 70°C é sugestivo da ocorrência de dímeros de *primers*. B - Curva de dissociação das concentrações de 200nM para o *primer forward* e 100nM para o *primer reverso* resultou em um único pico próximo a temperatura de 80°C, indicando amplificação específica do fragmento de interesse.

B Eficiência de amplificação dos iniciadores

Para o cálculo da eficiência dos iniciadores foram realizadas, para cada par de iniciador, reações em duplicata utilizando cinco diluições seriadas de cDNA (100ng; 20ng; 4ng; 0,8ng e 0,16ng). A partir dos resultados da reação foi construído um gráfico (curva padrão) que relaciona os C_q s com o valor das quantidades de cDNA em logaritmo de base 10 (Figura 5).

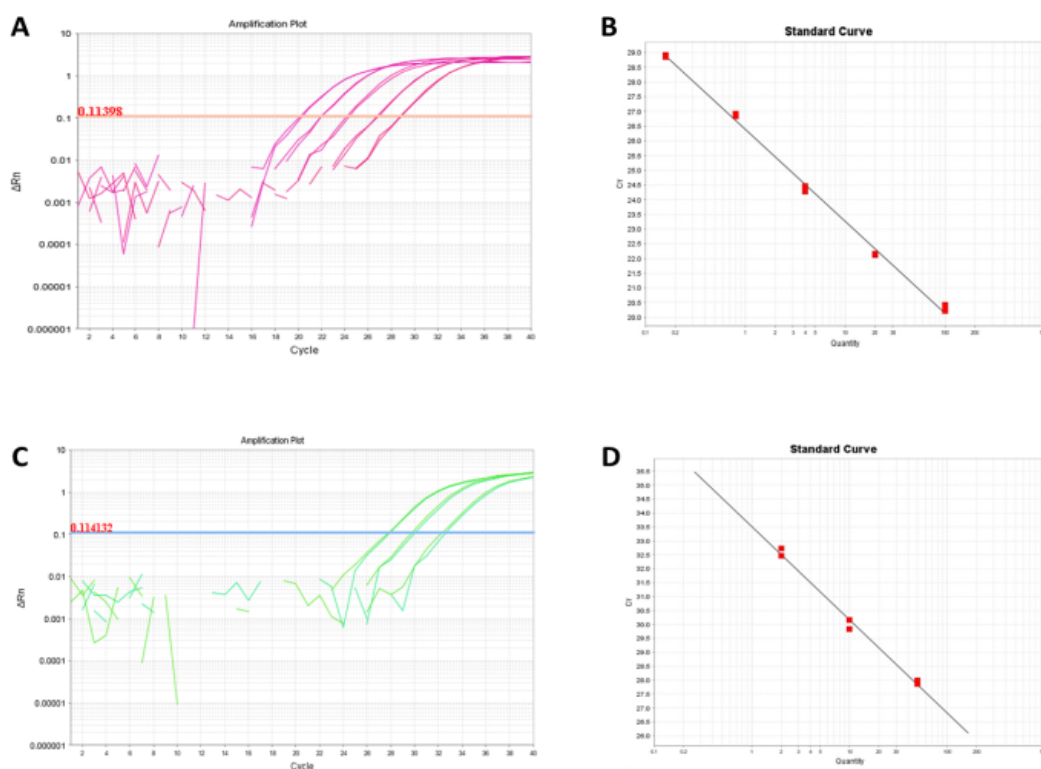


Figura 5 - Curva padrão para obtenção da eficiência de amplificação dos iniciadores.

A – Curva de amplificação do gene *PROM1*. B – Curva padrão do gene *PROM1*. C – Curva de amplificação do gene *BAP1*. D – Curva padrão do gene *BAP1*. No eixo x estão descritas as quantidades de cDNA utilizadas (logaritmo de base 10) e no eixo y estão os valores de C_q correspondentes.

O valor correspondente ao coeficiente angular (*slope*) da equação da reta da curva padrão ($y = ax + b$) foi utilizado na seguinte fórmula matemática:

Eficiência: $10^{(-1/\text{slope})} - 1$.

A eficiência obtida para cada gene está descrito no Quadro 3

Quadro 3 - Eficiência de amplificação dos genes avaliados no estudo.

Gene	Eficiência
<i>BAP1</i>	1,08
<i>CD 133</i>	0,99
<i>ACTB</i>	0,80
<i>GAPDH</i>	1,00
<i>HPRT1</i>	0,80

C Escolha dos Genes Normalizadores

Para definir qual(is) o(s) melhores genes normalizadores foi utilizado o software GeNorm (Vandesompele et al., 2002). Dentre os 3 genes testados como normalizadores, os genes *ACTB* e *HPRT* foram selecionados como mais estáveis na população de amostras utilizadas no estudo (Figura 6).

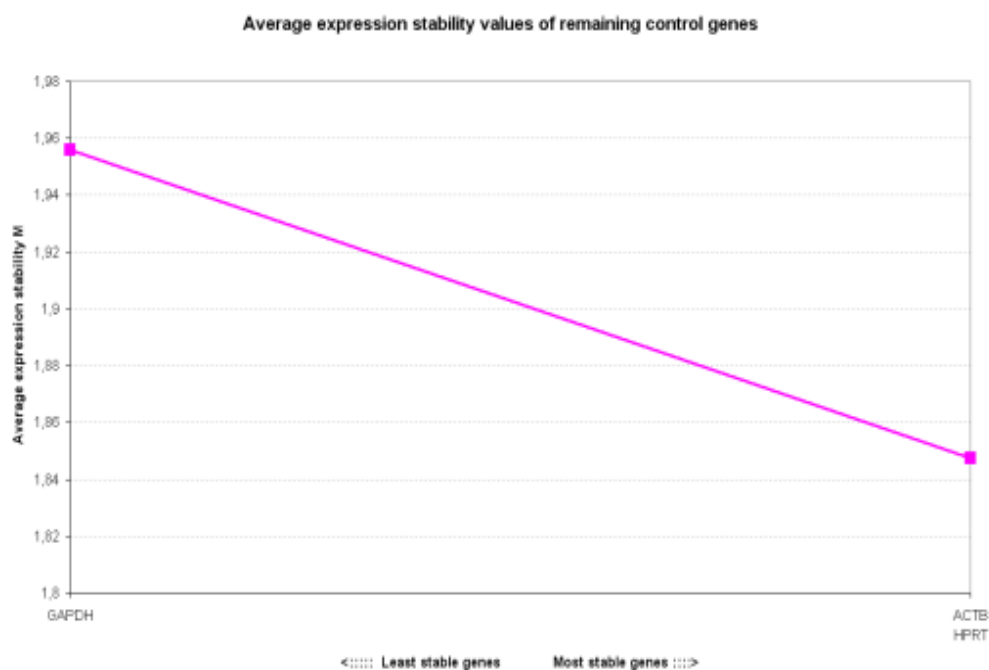


Figura 6 - Escolha dos genes normalizadores mais estáveis pela análise no software GeNorm. Dentre os três genes testados, os genes ACTB e HPRT apresentaram maior estabilidade entre as amostras do estudo e foram utilizados para normalização dos dados de expressão gênica.

D Quantificação Relativa

Para o cálculo do valor de expressão relativa foi utilizado o método proposto por PFAFFL (2001) que considera o valor de eficiência de cada par de iniciador no cálculo. Primeiramente, para obter o valor de expressão de cada amostra em relação a amostra calibradora foi utilizado o valor de média dos *C_q*s das duplicatas, na seguinte fórmula matemática:

$$Z = (1 + \text{Eficiência gene})^{(Ct \text{ amostra calibradora} - Ct \text{ amostra teste})}$$

Em seguida, para normalização do valor de expressão de cada amostra, o valor de Z obtido para o gene alvo foi dividido pela média dos valores de Z obtidos para os genes normalizadores *ACTB* e *GAPDH*:

$$Q = Z_{\text{alvo}} / \text{média } Z_{\text{ACTB e GAPDH}}$$

Por fim, foi realizada análise de expressão comparativa entre as amostras tumorais e as amostras não neoplásicas. O valor de expressão Q de cada amostra tumoral foi então dividido pela média dos valores Q das 9 amostras não neoplásicas:

$$E = Q_{\text{tumor}} / \text{média } Q_{\text{não-neoplásicas}}$$

3.5 ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos prontuários foram registrados em uma ficha de levantamento padronizada (**Anexo 1**) e foram digitados e arquivados em um banco de dados com o auxílio do programa *Excel 7.0 for Windows*. Para a análise estatística utilizou-se o software *Windows Statistical Package for Social Science* (SPSS), versão 21.0. As distribuições das variáveis clínicas, anatomopatológicas e variáveis referentes ao tratamento foram apresentadas na forma de tabelas de contingência. A mensuração das variáveis quantitativas foi expressa pelas médias e seus respectivos desvios-padrão.

Para cada variável patológica foram criados dois grupos distintos: bom prognóstico e mau prognóstico, de acordo com os padrões definidos pela literatura

atual. Como exemplo, a variável grau de Furhman foi dividida em grupo Grau 1 e 2 X grupo Grau 3 e 4. A comparação entre os valores de expressão gênica entre os dois grupos de cada variável foi feita utilizando-se o teste estatístico de Mann-Whitney, já que se tratava de variáveis contínuas e de grupos não pareados e não paramétricos. □ Estas comparações foram feitas para os valores de expressão de ambos os genes, CD133 e BAP1, em separado.

Para estudar as análises de SG, SCE e SLD utilizou-se o estimador de KAPLAN e MEIER (1958) como ferramenta para estimar a probabilidade de um paciente com CCRcc estar vivo ou, então, não apresentar recidiva até o instante de tempo considerado. Através da representação gráfica desse estimador, conseguimos visualizar, para uma determinada variável, qual categoria de pacientes apresenta maior probabilidade de não morrer por CCRcc ou não apresentar recidiva de CCRcc ao longo do tempo, por exemplo. Quanto mais superior for a curva referente à uma determinada categoria, maior será a probabilidade de os pacientes dessa categoria estarem vivos ou sem recidiva do CCRcc até o instante de tempo considerado. Para a comparação das curvas estimadas para cada categoria dentro de uma determinada variável utilizou-se o teste não-paramétrico de *LogRank*. Os valores p correspondentes aos testes são apresentados na legenda da figura de cada gráfico. O nível de significância adotado foi o de 5%.

Para a análise dos três tipos de curvas de sobrevida, os pacientes foram estratificados em grupos a partir da variável expressão do mRNA do genes CD 133 e BAP1. Os grupos foram definidos utilizando-se os valores da mediana, dos tercís e dos quartis de todos os valores de expressão gênica da amostra para cada gene em separado. As curvas de sobrevida foram realizadas para todos os grupos formados.

Em seguida optamos pela medida de tendência central com menor probabilidade de ocorrência ao acaso e com menores valores de p. Assim, para o gene BAP1 foi optado pela apresentação da estratificação de grupos pela mediana. Para o gene CD 133 a separação de grupos pelo valor do percentil 75 foi a forma escolhida para apresentação das curvas de SG, SCE e SLD.

Ainda sobre a análise de sobrevidas, foram realizadas comparações de médias dos valores de expressão do mRNA dos genes CD 133 e BAP1 entre os seguintes grupos: indivíduos vivos X indivíduos mortos (sobrevida global); indivíduos vivos/mortos por outras causas X indivíduos mortos por câncer (sobrevida câncer específica) e indivíduos com recidiva x indivíduos sem recidivas (sobrevida livre de doença). Para a análise da SLD, foram excluídos os paciente metastáticos ao diagnóstico, visto que permaneciam com a moléstia após a cirurgia.. Por se tratar de grupos não pareados e não paramétricos, as comparações foram feitas com o teste de Mann-Whitney para variáveis contínuas.

Pacientes considerados perdidos de seguimento na data da última informação contribuíram para a curva de sobrevida até tal data, sendo então considerados sob censura.

Todos os testes estatísticos aqui descritos foram realizados para a amostra inicial com 88 pacientes.

Uma vez que acreditamos que talvez pacientes com metástases a distância apresentem interações desconhecidas entre a lesão primária e a metástases, que em teoria poderiam ser biologicamente diferente daqueles com tumores localizados ou localmente avançados, optamos por investigar um grupo de pacientes teoricamente mais homogêneo e empregamos os testes estatísticos também para o grupo de 77

pacientes sem metástases (obtidos após a exclusão dos 11 indivíduos que apresentavam metástases no momento do diagnóstico).

Os valores referentes a dados de frequência e taxas de sobrevida foram simplificados com técnicas de arredondamento padronizadas com eliminação de casas decimais. Já para os valores da expressão gênica dos genes estudados foi considerada até a quinta casa decimal. A significância estatística foi determinada para um valor de $p < 0,05$.

3.6 ANÁLISE DE RISCOS E ASPECTOS ÉTICOS

Por se tratar de estudo retrospectivo, não houve a interferência direta no tratamento dos pacientes, nem a alteração da estratégia de seguimento pós-operatório ou a introdução de qualquer modificação terapêutica, ou aplicação de qualquer medicação ou método que tenha gerado danos, benefícios, ou outras consequências a qualquer paciente.

Desta forma, não foi necessária a adoção de consentimento pós-informado. Foram utilizados dados de prontuários e espécimes cirúrgicos congelados no banco de tecidos do AC Cancer Center. O uso do tecido congelado não acarretou prejuízo aos pacientes, pois, a terapêutica julgada necessária para os mesmos já havia sido instituída e sempre foi mantido material residual no bloco.

O projeto foi avaliado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital do Câncer (CEP) e foi aprovado em 23/04/2013. Está protocolado na referida comissão sob o número 1712/2012. (**Anexo 3**)

3.7 CASUÍSTICA

As Tabelas 1 a 5 apresentam as características epidemiológicas, clínicas e patológicas e de estadiamento dos pacientes.

Havia 51 homens (58%) e 37 mulheres (42%). Dentre eles, 86,2% eram brancos e 13,8% não brancos. A idade variou entre 26 e 82 anos, com média de 54,7 anos. O tempo de evolução médio entre as queixas iniciais e o diagnóstico foi de 1,3 meses (variando de 0 a 24 meses). Do total, apenas 9 (10%) pacientes tinham menos de 40 anos e mais da metade tinha entre 45 e 59 anos no momento do diagnóstico. Tabagismo foi observado em 29 (33%) pacientes com dados incompletos para o cálculo do *pack year*. Cinquenta e cinco pacientes (62,5%) apresentaram-se com tumor incidental e 33 (37,5%) com algum sintoma relacionado à neoplasia. Os sintomas mais comumente observados foram dor lombar e hematúria. A tríade clássica esteve presente em apenas dois (2,2%) pacientes. Onze pacientes (12,5%) apresentavam doença metastática ao diagnóstico e somente 6 (6,8%) deles apresentavam histórico familiar de neoplasia renal (Tabela 1).

Quanto à classificação de risco anestésico (ASA), notou-se que somente 13 (14,8%) pacientes eram ASA 1, sendo que a maioria apresentava co-morbidades no momento do diagnóstico.

Observou-se que os níveis de hemoglobina dos pacientes tiveram média de 13,5g/dL e desvio-padrão de 2, sendo que 15 (18,8%) dos pacientes apresentavam valores abaixo de 11 g/dl. (Tabela 2).

A nefrectomia radical foi realizada em 56 (63,6%) pacientes, enquanto que ressecções parciais ou enucleações ocorreram em 32 (36,4%). A transfusão

sanguínea foi necessária em 12 (16,2%) casos. Quanto às complicações, verificou-se que em 11 (14,9%) pacientes ocorreram precocemente (até 30 dias), sendo as mais frequentes a insuficiência renal aguda e hemorragias. Complicações tardias acometeram 08 doentes, todos com insuficiência renal crônica (Tabela 3).

O maior diâmetro tumoral variou de 1,8 a 24,0cm, com média de 6,6 cm e mediana de 5,5 cm, sendo que em 62 (70,5%) casos as lesões eram menores do que 7,0cm. A lateralidade tumoral foi semelhante, 44 casos para cada lado, sendo predominantes as lesões de pólo renal superior (36,4%) (Tabela 2). Em 07 (8%) pacientes houve invasão da veia renal. Invasão de gordura perirrenal ocorreu em 23 (26,1%) pacientes, da pelve renal e ureter em 04 (4,5%) e da glândula adrenal ipsilateral em 06 (6,8%) casos.

Quanto à análise microscópica, observou-se predominância de tumores de baixo grau (graus 1 e 2 de Fuhrman), com 59 casos (67,1%), enquanto que os tumores de alto grau (graus 3 e 4 de Fuhrman) ocorreram em 29 pacientes (32,9%). Em 25 (28,4%) casos observou-se a presença de necrose tumoral. Dezesete (19,3%) pacientes apresentaram invasão vascular microscópica (IVM) e 11 (12,5%) invasão linfática microscópica (ILM) (Tabela 4). A margem cirúrgica microscópica encontrava-se comprometida em 8 (9,1%) casos (Tabela 6).

A presença de acometimento linfonodal (pN1-2) foi observada em 5 (5,7%) casos. Em nenhum dos 32 casos submetidos a nefrectomia parcial a linfadenectomia foi realizada, pois, por princípio, considerou-se que não existia o acometimento linfonodal e todos foram considerados como pNx.

Dentre os 56 pacientes submetidos a nefrectomia radical, houve 16 (8,2%) casos em que se observou ressecção de 8 ou mais linfonodos, sendo a

linfadenectomia considerada “adequada” (de acordo com a sétima e última edição do TNM da UICC/2010) e 53 (60%) casos em que não se alcançou esse valor de linfonodos e a linfadenectomia foi considerada “inadequada”, seguindo o mesmo critério.

A distribuição dos estadiamentos clínicos 1,2,3 E 4 do TNM/AJCC 2010 ocorreu, respectivamente, em 49 (55,7%), 12 (13,6%), 19 (21,6%) e 8 (9,1%) pacientes (Tabela 4).

Falhas aos cinco anos ocorreram em 26 (29,5%) pacientes, sendo 15 recorrências e 11 progressões (entre os pacientes metastáticos ao diagnóstico) (Tabela 5).

O tipo de recorrência mais comum foi a local associada à metástase pulmonar com 6 casos (6,8%), seguido das metástases isoladas em pulmão, osso e fígado, todas com 3 casos cada. Oitenta e cinco por cento dos casos de recidiva/progressão receberam algum tipo de tratamento. A terapia com inibidores de tirosina quinase foi utilizada em 13 pacientes (48%) e 12 pacientes (44,4%) foram submetidos à metastasectomia.

Ocorreram 13 óbitos (14,7%), dos quais 12 (13,6%) pelo câncer. Ao final do seguimento, havia 62 (70,4%) pacientes vivos e sem doença, 10 (11,3%) pacientes vivos e com doença e 3 (3,4%) perdidos no seguimento (Tabela 5).

Tabela 1 – Variáveis epidemiológicas de 88 pacientes portadores de CCRcc do AC Camargo Cancer Center.

Variável	Categorias	N	%
Idade	<40 anos	9	10.2
	41-60 anos	56	63.6
	>61 anos	23	26.1
Raça	Não Brancos	9	10.2
	Brancos	56	63.7
	Ignorados	23	26.1
Sexo	Masculino	51	58
	Feminino	37	42
Tumor incidental	Não	39	44.3
	Sim	49	55.7
Sintomas	Não	55	62.5
	Hematúria	12	13.6
	Dor lombar	10	11.4
	Emagrecimento	5	5.7
	Febre	1	1.1
	Massa palpável	1	1.1
	Dois sintomas	1	1.1
	Tríade	2	2.2
	Outros	1	1.1
	Não	82	93.2
História familiar	Sim	6	6.8
Tabagismo	Não	59	67
	Sim	29	33
Metástase ao diagnóstico	Não	77	87.5
	Sim	11	12.5
TOTAL		88	100 %

Tabela 2 – Variáveis clínicas de 88 pacientes portadores de CCRcc do AC Camargo Cancer Center.

Variáveis	Categorias	N	%
ECOG	0	42	47.7
	1	23	26.1
	2	3	3.4
	Ignorados	20	22.8
ASA	I	13	14.8
	II	60	62.2
	III	15	17
	IV	0	0
Hemoglobina	<11	15	17
	>11	65	73.9
	Ignorado	8	9.1
Lateralidade	Direito	44	50
	Esquerdo	44	50
Diâmetro tumoral	Até 7 cm	62	70.5
	> 7 cm	26	29.5
Topografia	Pólo superior	32	36.4
	Pólo médio	17	19.3
	Pólo inferior	19	21.6
	Mais de 1 pólo	20	22.7
TOTAL		88	100%

Tabela 3 – Variáveis terapêuticas de 88 pacientes portadores de CCRcc do AC Camargo Cancer Center.

Variáveis	Categorias	N	%
Tipo cirurgia	Nefrec. Radical	56	63.6
	Nefrec. Parcial	32	36.4
Tempo cirúrgico	< 180 min	29	32.9
	> 180 min	36	40.9
	Ignorado	23	26.2
	Não	62	70.4
Transfusão sanguínea	Sim	12	13.6
	Ignorado	14	16
	< 7 dias	57	64.7
Tempo internação	> 7 dias	13	14.7
	Ignorado	18	20.6
Margens Cirúrgicas microscópicas	Livres	80	90.9
	Comprometidas	8	9.1
	Não	63	71.6
	IRA	8	9.1
Complicações precoces	Tromboembólicas	1	1.1
	Hemorragias	2	2.2
	Dados incompletos	14	16
	Não	65	73.9
Complicações tardias	IRC	8	9
	Dados incompletos	15	17.1
TOTAL		88	100

Tabela 4 – Variáveis anatomopatológicas de 88 pacientes portadores de CCRcc do AC Camargo Cancer Center.

Variáveis	Categorias	N	%
Grau de Fuhrman	1	8	9.1
	2	51	58
	3	20	22.7
	4	9	10.2
Invasão de Veia Renal	Não	81	92
	Sim	7	8
Invasão Gordura perirrenal	Não	65	73.9
	Sim	23	26.1
Invasão da gordura seio renal	Não	68	77.3
	Sim	20	22.7
Invasão de pelve/ureter	Não	84	95.5
	Sim	4	4.5
IVM	Não	71	80.7
	Sim	17	19.3
ILM	Não	77	87.5
	Sim	11	12.5
Necrose tumoral	Não	63	71.6
	Sim	25	28.4
Componente sarcomatóide	Não	86	97.7
	Sim	2	2.3
Adrenal	Não retirada	53	66.2
	Livre neoplasia	29	33
	Com neoplasia	6	6.8
pN	pN0	83	94.3
	pN1 ou 2	5	5.7
Estadio Patológico	I	49	55.7
	II	12	13.6
	III	19	21.6
	IV	8	9.1
TOTAL		88	100

Tabela 5 – Desfecho clínico após tratamento do tumor primário e situação clínica aos 5 anos do estudo de 88 pacientes portadores de CCRcc do AC Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	N	%
Falha (Recorrência ou progressão)	Não	62	70.5
	Falha	15	17
	Progressão	11	12.5
Situação clínica ao término do estudo	Vivo sem doença	62	70.5
	Vivo com doença	14	14.8
	Morto outras causas	1	1.1
	Morto por câncer	12	13.6
TOTAL		88	100

4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO GÊNICA DO CD133

Os valores das amostras neoplásicas para o gene CD133 variaram de 0,00017 até 10,89995.

Do total de 88 pacientes portadores de CCRcc, 72 pacientes tiveram expressão gênica de CD133 menor que a média das amostras não neoplásicas. A média de expressão nas amostras neoplásicas foi 0,91146, com desvio padrão de 2,15537. E foi significativamente menor que a média das amostras não neoplásicas ($p= 0.0052$), conforme Figura 7.

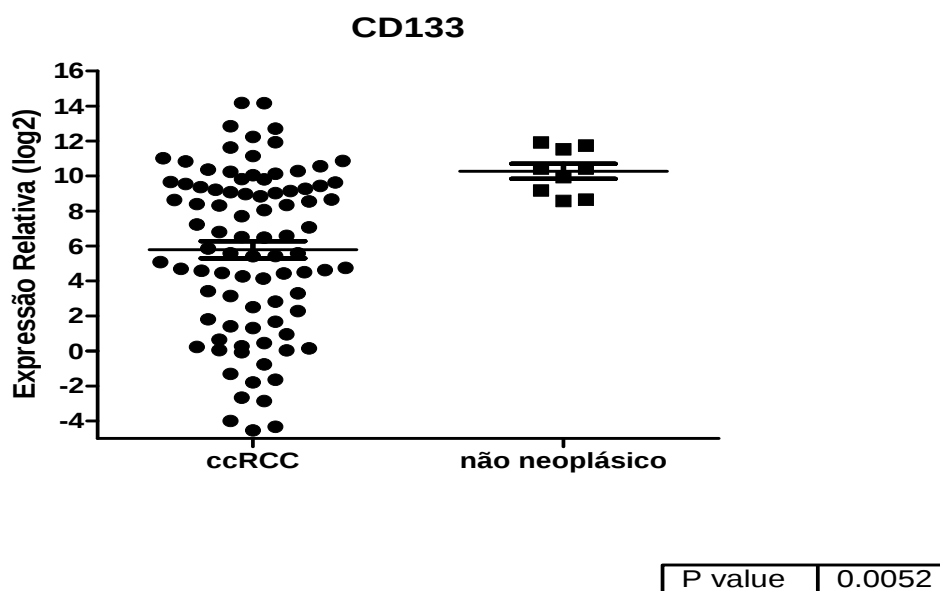


Figura 7 - Comparação dos valores de expressão do CD133 entre amostras neoplásicas e não neoplásicas.

Na correlação com variáveis clínicas e epidemiológicas, o CD133 apresentou associação nas variáveis sexo e presença de metástase ao diagnóstico (Tabela 9). Os valores da expressão gênica do CD 133 foram maiores nos homens em relação as mulheres ($p=0,018$). E a expressão gênica do CD133 foi significativamente menor nos pacientes com metástases ao diagnóstico em relação aos não metastáticos ($p=0,035$).

Tabela 6 – Expressão do CD 133 segundo variáveis clínicas e epidemiológicas dos 88 pacientes com CCRcc.

Variável	Categoria	Médias	p
SEXO	Masculino	1.144622255	0.018
	Feminino	0.590090098	
RAÇA	Branco	0.97366882	0.79
	Não branco	0.310256594	
FUMO	Não	1.016763472	0.926
	Sim	0.6972422	
ASA	1 E 2	1.036032376	0.695
	3 E 4	0.492557729	
META DIAGN	Não	1.028508631	0.035
	Sim	0.092173097	
SINTOMAS	Não	0.740652284	0.662
	Sim	1.209700781	

Na correlação com as variáveis anatomopatológicas, a expressão do CD 133 não apresentou nenhuma associação estatisticamente significativa, conforme mostra a Tabela 7.

Tabela 7 - Expressão de CD 133 segundo variáveis anatomopatológicas dos 88 pacientes com CCRcc.

Variável	Grupos	n	Média	p
GRAU DE FUHRMAN	1 e 2	59	0.82385	0.912
	3 e 4	29	1.08971	
INVASÃO GORDURA DO SEIO RENAL	Não	68	0.88530	0.467
	Sim	20	1.00040	
INVASÃO GORDURA PERIRRENAL	Não	65	0.91654	0.321
	Sim	23	0.89710	
INVASÃO DE VEIA RENAL	Não	81	0.96493	0.638
	Sim	07	0.29280	
INVASÃO PELVE/URETER	Não	84	0.93828	0.398
	Sim	04	0.34825	
IVM	Não	71	0.95579	0.251
	Sim	17	0.72634	
ILM	Não	77	0.85314	0.286
	Sim	11	1.31972	
NECROSE TUMORAL	Não	63	0.96630	0.557
	Sim	25	0.77328	
COMPONENTE SARCOMATÓIDE	Não	86	0.83868	0.604
	Sim	02	4.04088	
ADRENAL	Não	**	1.00163	0.408
	Sim	**	0.45854	
pT	1 e 2	64	0.85282	0.547
	3 e 4	24	1.06785	
LINFONODO	Não	83	0.94223	0.465
	Sim	05	0.40075	
ESTADIO	1 e 2	61	0.88717	0.606
	3 e 4	27	0.96634	

4.1.1 Pacientes sem metástases ao diagnóstico

Na análise apenas dos pacientes sem metástases ao diagnóstico, foi observada associação da expressão do CD 133 com as variáveis sexo e ECOG agrupado. Os valores da expressão gênica do CD 133 foram maiores em homens do que em mulheres ($p=0.011$) e em pacientes com ECOG 0 quando comparados com ECOG 1

ou 2 ($p=0.045$) Tabela 8.

Tabela 8 – Expressão do CD 133 segundo variáveis clínicas e epidemiológicas dos 77 pacientes com CCRcc não metastático ao diagnóstico.

VARIÁVEL	CATEGORIA	N	MÉDIAS	p
Raça	Branca	49	1.10362	0.790
	Não branca	7	0.398839	
	Ignorados	21	-	
Sexo	Masculino	43	1.34171	0.011
	Feminino	34	0.63238	
ASA	1 e 2	67	1.07719	0.347
	3 e 4	09	0.77986	
	0	42	1.03667	
ECOG	1 e 2	20	0.79963	0.045
	Ignorados	15	-	
Tabagismo	Não fumante	51	1.16215	0.804
	Fumante	26	0.76635	

Quando comparado frente às variáveis anatomopatológicas, foi observada associação entre maior expressão de CD133 e o acometimento da glândula adrenal ($p=0,007$). (Tabela 9).

Tabela 9 - Expressão de CD 133 segundo variáveis anatomopatológicas dos 77 pacientes com CCRcc não metastático ao diagnóstico.

VARIÁVEL	GRUPOS	n	MÉDIA DE CD 133	p
GRAU DE FUHRMAN	1 E 2	57	0.852431348	0.436
	3 E 4	20	1.530328888	
INVASÃO GORDURA DO SEIO RENAL	NAO	64	0.93539882	0.796
	SIM	13	1.486895394	
INVASÃO GORDURA PERIRRENAL	NAO	61	0.971151185	0.514
	SIM	16	1.247183893	
INVASÃO DE VEIA RENAL	NAO	74	0.93539882	0.796
	SIM	3	1.486895394	
INVASÃO PELVE/URETER	NAO	75	1.041280523	0.722
	SIM	2	0.549562692	
IVM	NAO	67	1.00649104	1
	SIM	10	1.176026488	
ILM	NAO	70	0.932172776	0.076
	SIM	7	1.99186718	
NECROSE TUMORAL	NAO	58	1.037190848	0.741
	SIM	19	1.00200502	
COMPONENTE SARCOMATÓIDE	NAO	76	0.935838745	0.104
	SIM	1	8.07142	
ADRENAL	NAO	74	0.887649841	0.007
	SIM	3	4.503025463	
pT	1 e 2	61	0.890336966	0.87
	3 e 4	16	1.555288103	
LINFONODO	NAO	76	1.027583997	0.39
	SIM	1	1.098780798	
ESTADIO	1 e 2	59	0.917228449	0.923
	3 e 4	18	1.393260339	

4.2 EXPRESSÃO GÊNICA DO BAP1

Os valores das amostras neoplásicas para o gene BAP1 variaram de 0,06048 a 2,92110.

Do total de 88 pacientes portadores de CCRcc, 78 pacientes tiveram expressão gênica de BAP1 menor que a média das amostras não neoplásicas (Figura 8). A média de expressão das amostras neoplásicas foi 0,57867 com desvio padrão de 0,50098. A média das amostras neoplásicas foi significativamente menor do que as amostras não neoplásicas ($p=0.0034$)

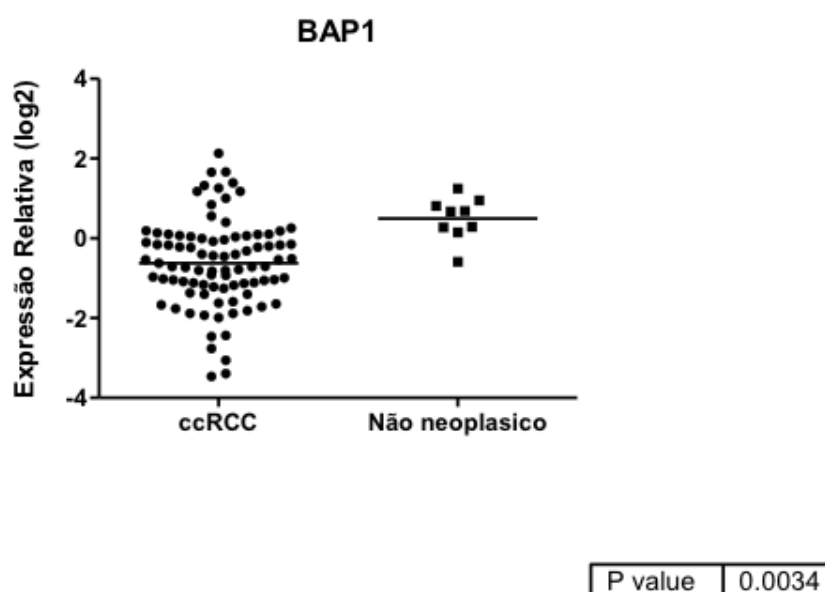


Figura 8 - Comparação dos valores de expressão do BAP1 entre amostras neoplásicas e não neoplásicas.

A expressão do BAP 1 se associou a classificação de ASA (Tabela 10). Os valores da expressão gênica do BAP 1 foram maiores nos pacientes classificados como ASA 3 e 4 ($p=0,029$).

Tabela 10 – Expressão do BAP1 segundo variáveis clínicas e epidemiológicas dos 88 pacientes com CCRcc.

Variável	Categoria	Médias	p
SEXO	MASC	0.65826462	0.059
	FEM	0.468964517	
RAÇA	BRANCO	0.606575938	0.761
	NÃO BRANCO	0.745493077	
FUMO	NÃO	0.521689814	0.157
	SIM	0.694602885	
ASA	1 E 2	0.544508444	0.029
	3 E 4	0.774423788	
METÁSTASE AO	NAO	0.578080113	0.152
DIAGNÓSTICO	SIM	0.582819454	
SINTOMAS	NAO	0.592183868	0.612
	SIM	0.566431221	

Na análise dos 88 pacientes do estudo, a expressão do BAP 1 não mostrou associação com nenhuma variável anatomopatológica (Tabela 11)

Tabela 11 - Expressão de BAP 1 segundo variáveis anatomopatológicas dos 88 pacientes com CCRcc.

Variável	Grupos	n	Média	p
TAMANHO	< 4 cm	29	0.67300	0.641
	> 4 cm	59	0.54999	
GRAU DE FUHRMAN	1 e 2	59	0.57423	0.437
	3 e 4	29	0.58770	
INVASÃO GORDURA DO SEIO RENAL	Não	68	0.60090	0.339
	Sim	20	0.50306	
INVASÃO GORDURA PERIRRENAL	Não	65	0.57487	0.375
	Sim	23	0.58940	
INVASÃO DE VEIA RENAL	Não	81	0.59334	0.445
	Sim	07	0.40889	
INVASÃO Pelve/URETER	Não	84	0.59285	0.134
	Sim	04	0.28093	
IVM	Não	71	0.60025	0.812
	Sim	17	0.48852	
ILM	Não	77	0.58975	0.757
	Sim	11	0.50110	
NECROSE TUMORAL	Não	63	0.59746	0.930
	Sim	25	0.53131	
COMPONENTE SARCOMATÓIDE	Não	86	0.58172	0.815
	Sim	02	0.44753	
ADRENAL	Não	82	0.55077	0.866
	Sim	06	0.64126	
pT	1 e 2	64	0.61199	0.220
	3 e 4	24	0.48980	
LINFONODO	Não	83	0.58543	0.978
	Sim	05	0.46653	
ESTADIO	1 e 2	61	0.61867	0.256
	3 e 4	27	0.48828	

4.2.1 Pacientes sem metástases ao diagnóstico

No grupo de pacientes não metastáticos, a expressão do BAP1 não apresentou associação com nenhuma das variáveis clínicas ou epidemiológicas, conforme mostra Tabela 12.

Tabela 12 - Expressão do BAP1 segundo variáveis clínicas e epidemiológicas dos 77 pacientes com CCRcc não metastático ao diagnóstico.

Variável	Categoria	n	Médias	p
Raça	Branca	49	0.82284	0.576
	Não branca	7	0.60024	
	Ignorados	21	-	
Sexo	Masculino	43	0.66458	0.117
	Feminino	34	0.46867	
ASA	1 e 2	67	0.54169	0.073
	3 e 4	09	0.87821	
	Ignorados	01	-	
ECOG	0	42	0.54723	0.952
	1 e 2	20	0.59431	
	Ignorados	15	-	
Tabagismo	Não fumante	51	0.52552	0.281
	Fumante	26	0.68116	

Tabela 13 - Expressão do BAP1 segundo variáveis anatomopatológicas dos 77 pacientes com CCRcc não metastático ao diagnóstico.

VARIÁVEL	Categorias		MÉDIA BAP1	DE p
TAMANHO	< 4cm	29	0.63700696	0.003
	> 4 cm	48	0.542478477	
GRAU DE FUHRMAN	1 E 2	57	0.567089465	0.634
	3 E 4	20	0.60940346	
INVASÃO GORDURA SEIO RENAL	NAO	64	0.608811081	0.001
	SIM	13	0.426789193	
INVASAO GORD PERIRRENAL	NAO	61	0.581459068	0.001
	SIM	16	0.565197848	
INVASÃO DE VEIA RENAL	NAO	74	0.590093408	0.168
	SIM	3	0.281752177	
INVASAO PELVE/URETER	NAO	75	0.588132109	0.175
	SIM	2	0.201130289	
INVASÃO VASCULAR	NAO	67	0.601975405	0.122
	SIM	10	0.417981658	
INVASÃO LINFÁTICA	NAO	70	0.587621983	0.535
	SIM	7	0.48266142	
NECROSE	NAO	58	0.600967823	0.603
	SIM	19	0.508212367	
SARCOMATOIDE	NAO	76	0.584393604	0.104
	SIM	1	0.098254794	
ADRENAL	NAO	74	0.583598848	0.865
	SIM	3	0.441951319	
pT	1 e 2	61	0.614988559	0.033
	3 e 4	16	0.437366663	
LINFONODO	NAO	76	0.581189338	0.831
	SIM	1	0.341779026	
ESTADIO PATOLÓGICO	1 e 2	59	0.622675948	0.033
AGRUPADO	3 e 4	18	0.431904897	

Na amostra dos 77 pacientes não metastáticos ao diagnóstico, quando comparado frente às variáveis anatomopatológicas, foi observada associação entre o valor da expressão de BAP1 com tamanho tumoral ($p=0,003$), presença de invasão de gordura perirrenal e do seio renal ($p=0,001$ e $p=0,001$, respectivamente) e com o estadio patológico ($p=0,033$). Em todas essas associações, a hipoexpressão gênica do BAP1 estava relacionada à fatores de mau prognóstico: tamanho tumoral >4 cm, invasão de gordura (pT3) e estadio patológico agrupado 3 e 4 (Tabela 13)

4.3 ANÁLISE DE SOBREVIDA

4.3.1 Sobrevida Global (SG)

Durante o seguimento, ocorreram 13 óbitos. A SG em 60 meses foi de 85,2%, conforme demonstrado na Figura 9.

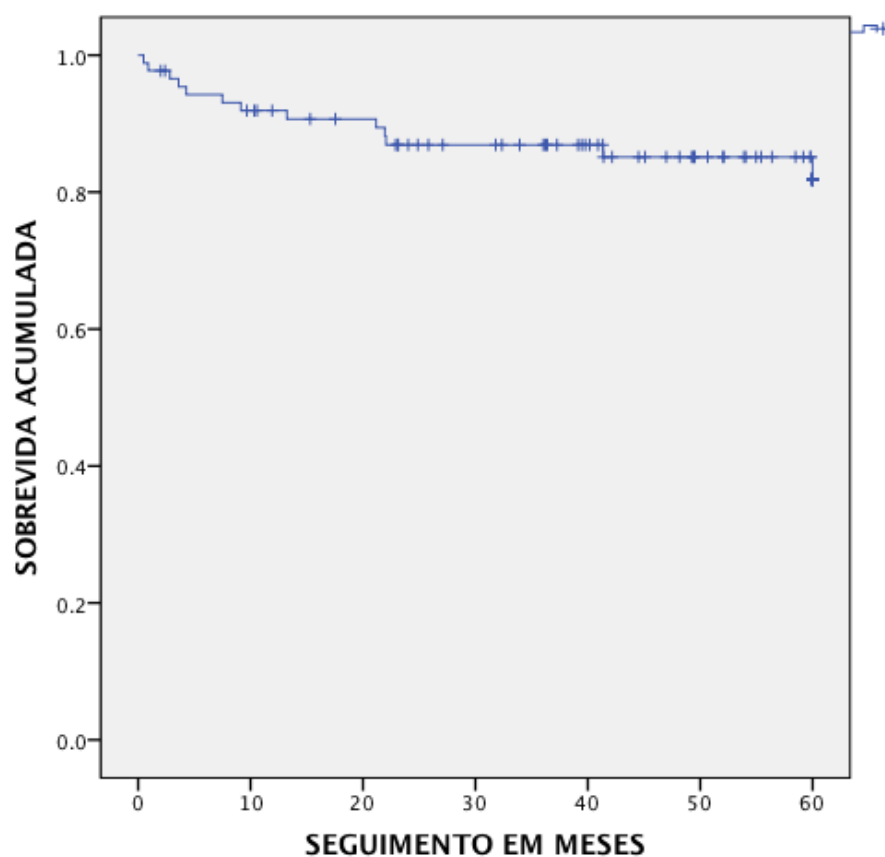


Figura 9 - Curva de sobrevida global em 60 meses para os 88 pacientes portadores de CCRcc (85.2%).

As variáveis clínicas e demográficas que influenciaram a SG em 5 anos foram: presença de sintomas ao diagnóstico ($p=0,009$) e presença de metástases ao diagnóstico ($p<0,001$), conforme ilustra a Tabela 14.

Tabela 14 – Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 anos de acordo com variáveis clínicas e demográficas em 88 pacientes portadores de CCRcc.

Variável	Categoria	N	SG em 5 anos (%)	p (log rank)
Raça	Branco	7	100	0.473
	Não branco	49	93.9	
Sexo	Masculino	43	90.7	0.618
	Feminino	34	94.1	
Tabagismo	Não fumante	51	92.2	0.891
	Fumante	26	92.3	
ECOG	0	41	92.7	0.624
	1 e 2	20	100	
ASA	1 e 2	67	91	0.317
	3 e 4	9	100	
Sintomas	Não	53	98.1	0.009
	Sim	24	79.2	
Metástase ao diagnóstico	Não	77	92.2	<0.001
	Sim	11	36.4	

Todas as variáveis anatomopatológicas analisadas tiveram influencia na SG em 5 anos ($p<0.05$), conforme ilustra a Tabela 15.

Tabela 15 - Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas de 88 pacientes com CCRcc.

Variável	Grupos	n	SG em 5 a (%)	p
Grau de Fuhrman	1 e 2	59	94.9	<0.001
	3 e 4	29	65.5	
Invasão Veia Renal	Não	81	87.7	0.010
	Sim	07	57.1	
Invasão Gordura Perirrenal	Não	65	95.4	<0.001
	Sim	23	56.5	
Invasão gordura seio renal	Não	68	95.6	<0.001
	Sim	20	50	
Invasão de Pelve Renal	Não	84	88.1	<0.001
	Sim	04	25	
IVM	Não	71	93	<0.001
	Sim	17	52.9	
ILM	Não	77	89.6	0.001
	Sim	11	54.5	
Necrose tumoral	Não	63	92.1	0.005
	Sim	25	68	
Componente Sarcomatóide	Não	86	87.2	<0.001
	Sim	02	0	
Adrenal	Não retirada	53	92.5	<0.001
	Retirada sem neoplasia	29	82.8	
	Retirada com neoplasia	06	33.3	
	Não	83	88.8	
pN	Sim	05	40	0.001
	1 e 2	61	96.7	
Estadio Patológico Agrupado	3 e 4	27	59.3	<0.001

Nenhuma estratificação em grupos (mediana, quartis, tercís) da expressão gênica do BAP1 apresentou impacto nas curvas de sobrevida global em 5 anos dos 88 pacientes do estudo. A curva a partir da mediana está representada na Figura 10 (p=0.774).

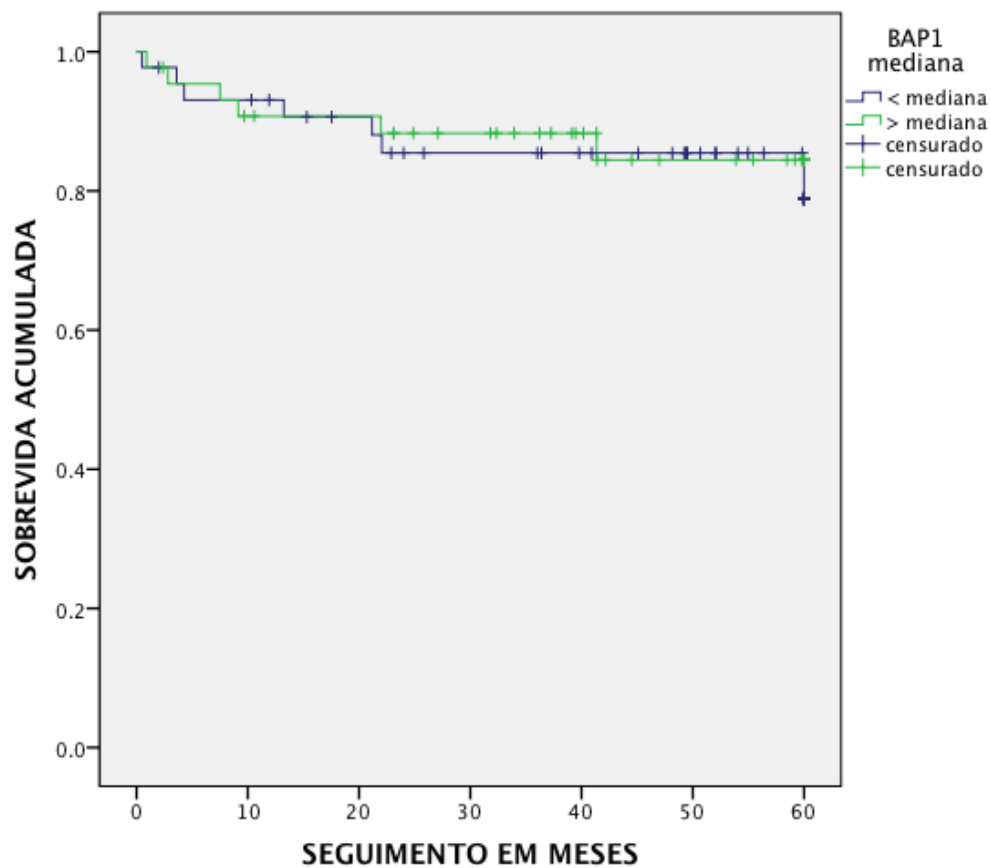


Figura 10 - Curva de sobrevida global em 60 meses para os 88 pacientes portadores de CCRcc estratificados em valores de expressão gênica do BAP 1 acima e abaixo da mediana ($p=0.774$)

Também não houve impacto da expressão gênica do CD 133 nas curvas de sobrevida global em 5 anos em todas as estratificações por grupos utilizadas. A estratificação pelo valor do percentil 75 está exemplificada na Figura 11.

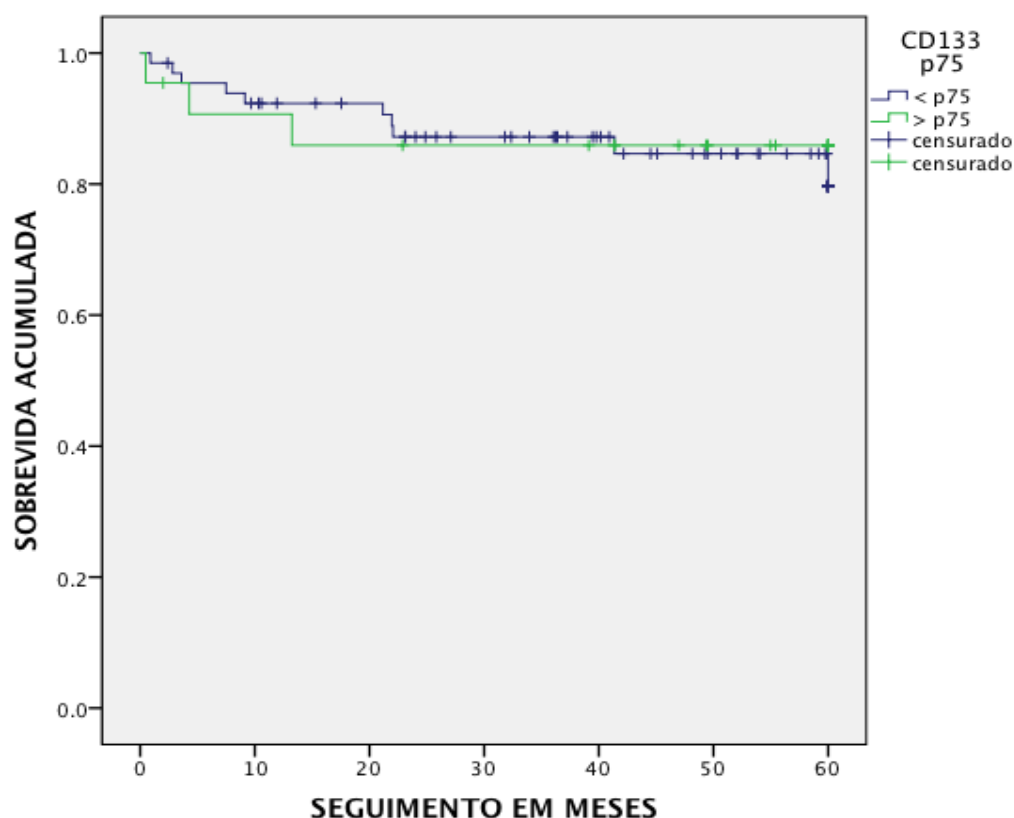


Figura 11 - Curva de sobrevida global em 60 meses para os 88 pacientes portadores de CCRcc estratificados pela expressão do mRNA do CD133 acima ou abaixo do percentil 75 ($p=0.823$).

A comparação dos valores de expressão do mRNA do CD133 e do BAP1 entre os grupos de **indivíduos vivos X indivíduos mortos** não mostrou diferença estatística e estão apresentadas na Tabelas 16 e 17.

Tabela 16 - Comparação de médias dos valores de expressão do gene CD133 entre os grupos referentes à sobrevida global em 5 anos para os 88 pacientes.

Grupos	n	Média CD133	p
Vivos	73	0.82665	0.203
Mortos	15	1.58534	

Tabela 17 - Comparação de médias dos valores de expressão do gene BAP1 entre os grupos referentes à sobrevida global em 5 anos para os 88 pacientes.

Grupos	n	Média BAP1	p
Vivos	73	0.59545	0.980
Mortos	15	0.51594	

4.3.2 Pacientes sem metástases ao diagnóstico

Entre os pacientes não metastáticos ao diagnóstico, a sobrevida global em 60 meses foi de 92,2%, conforme mostra a Figura 12.

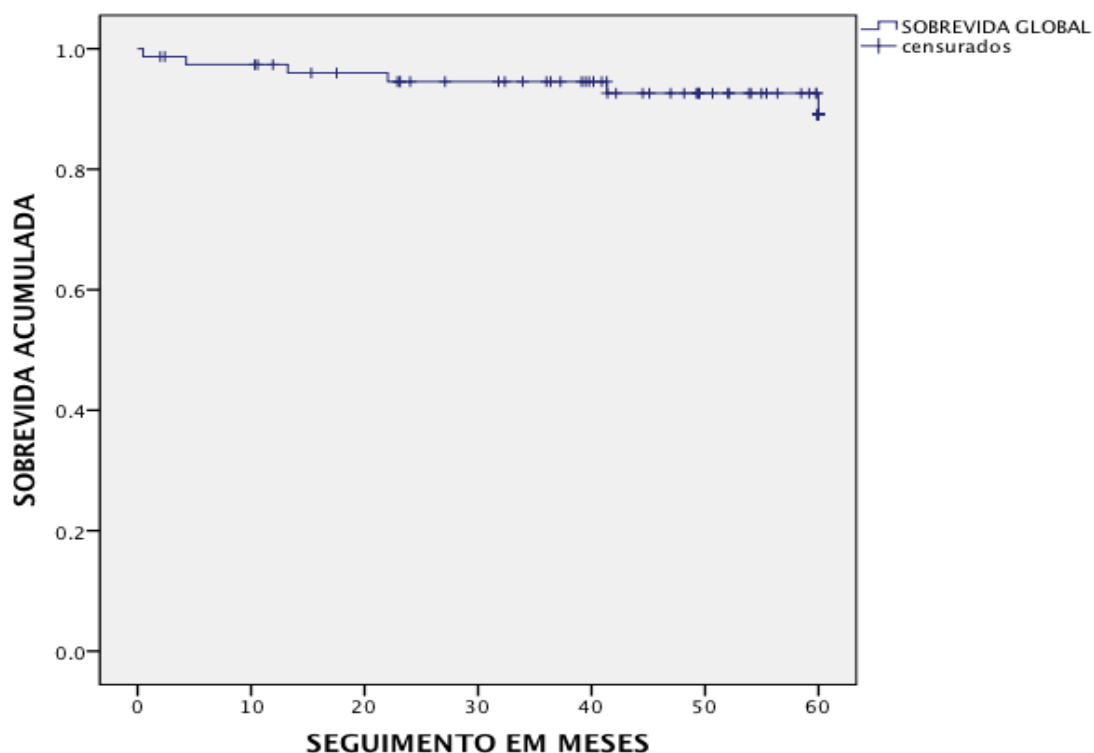


Figura 12 – Curva de sobrevida global em 60 meses para os 77 pacientes portadores de CCRcc não metastáticos ao diagnóstico (92.2%).

Dentre as variáveis clínicas e epidemiológicas, apenas a presença de sintomas ao diagnóstico apresentou impacto na sobrevida global em 5 anos ($p=0.009$), conforme Tabela 18.

Tabela 18 – Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 anos de acordo com variáveis clínicas e demográficas em 77 pacientes portadores de CCRcc não metastático ao diagnóstico.

Variável	Categoria	N	SG em 5 anos (%)	p (log rank)
Raça	Branco	7	100	0.473
	Não branco	49	93.6	
	Ignorados	21	-	
Sexo	Masculino	43	90.7	0.618
	Feminino	34	94.1	
	Não fumante	51	92.2	0.891
Tabagismo	Fumante	26	92.3	
	Ignorados	00	-	
ECOG	0	41	92.9	0.219
	1 e 2	20	100	
	Ignorados	16	-	
ASA	1 e 2	67	91	0.317
	3 e 4	9	100	
	Ignorados	12	-	0.009
Sintomas	Não	53	98.1	
	Sim	24	79.2	
	Ignorados	11	-	

Já dentre as variáveis anatomopatológicas que apresentaram impacto na SG, destacam-se: graduação 3 e 4 de Fuhrman ($p<0,001$), presença de invasão de gordura perirrenal ($p<0,001$), invasão de gordura de seio renal ($p<0,001$), invasão de pelve e ureter (0,041), presença de componente sarcomatóide ($<0,001$) e estadio patológico avançado 3 e 4 ($p=0,001$), conforme Tabela 19.

Tabela 19 - Probabilidade acumulada de sobrevida em 5 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas de 77 pacientes com CCRcc não metastático

Variáveis	Categorias	N	SG em 5 anos %	p (log rank)
Grau de Fuhrman	1 e 2	57	96.5	0.003
	3 e 4	20	80	
Invasão de Veia Renal	Não	74	91.9	0.641
	Sim	3	100	
Invasão Gordura perirrenal	Não	61	98.4	<0.001
	Sim	16	68.8	
Invasão da gordura seio renal	Não	64	98.4	<0.001
	Sim	13	61.5	
Invasão de pelve/ureter	Não	75	93.3	0.041
	Sim	2	50	
IVH	Não	67	94	0.147
	Sim	10	80	
ILM	Não	70	92.9	0.559
	Sim	7	85.7	
Necrose tumoral	Não	58	93.1	0.656
	Sim	19	89.5	
Componente sarcomatóide	Não	76	93.4	<0.001
	Sim	1	0	
Adrenal	Sem neoplasia	74	93.2	0.149
	Com neoplasia	3	66.7	
pN	N0	76	92.1	0.752
	N1 ou 2	1	100	
Estadio Patológico Agrupado	I e II	59	98.3	0.001
	III e IV	18	72.2	

Entre os 77 pacientes não metastáticos ao diagnóstico, o grupo com menor expressão de BAP1 (valores abaixo da mediana) teve menor sobrevida global em 5 anos, porém sem atingir a significância estatística ($p=0.095$) Figura 13.

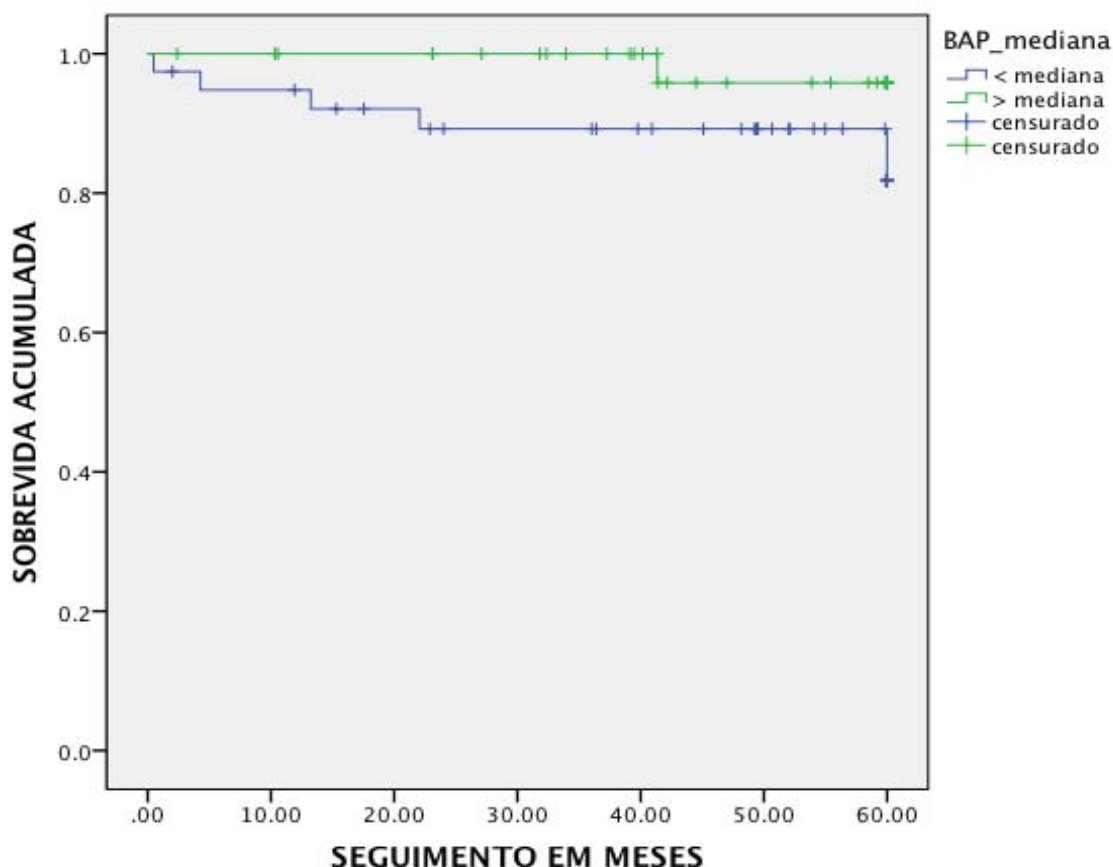


Figura 13 - Curva de sobrevida global em 60 meses para os 77 pacientes portadores de CCRcc não metastático estratificados em valores de expressão gênica do BAP 1 acima e abaixo da mediana ($p=0.095$).

Já as curvas de SG em 5 anos do gene CD 133 mostraram que quanto maior a expressão gênica, pior a sobrevida. Mas nenhuma estratificação por grupo atingiu a significância estatística. A figura 14 abaixo mostra a curva de SG em 5 anos para grupos estratificados pelo percentil 75 ($p=0.154$).

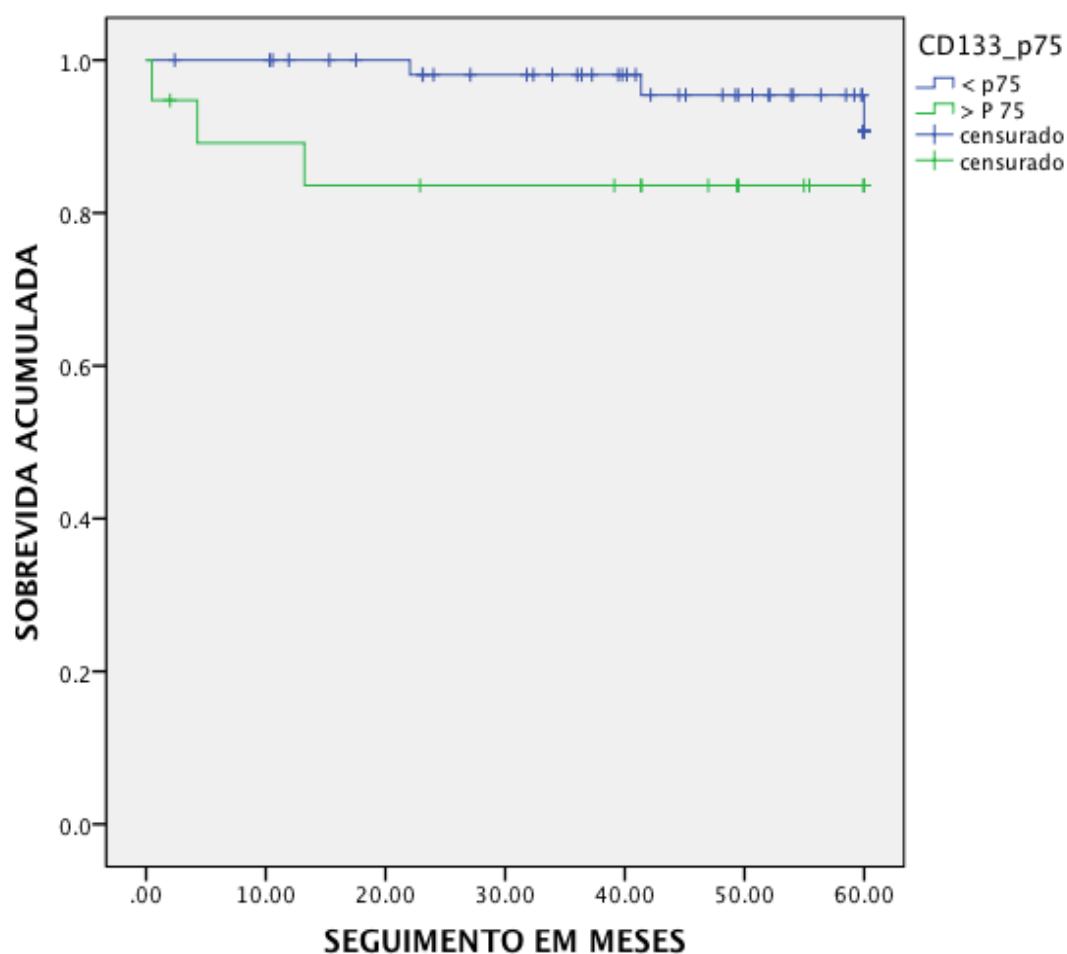


Figura 14 - Curva de sobrevida global em 60 meses para os 77 pacientes portadores de CCRcc não metastático estratificados pela expressão do mRNA do CD133 acima ou abaixo do percentil 75 ($p=0.154$).

Entre os pacientes não metastáticos, a comparação dos valores de expressão do mRNA do CD133 e do BAP1 entre os grupos de **indivíduos vivos X indivíduos mortos** não mostrou diferença estatística e estão apresentadas na Tabela 20 e 21.

Tabela 20 - Comparação de médias dos valores de expressão do gene CD133 entre os grupos referentes à sobrevida global em 5 anos para os 77 pacientes.

Grupos	n	Média CD133	p
Vivos	71	0.84531	0.214
Mortos	06	3.33696	

Tabela 21 - Comparação de médias dos valores de expressão do gene BAP1 entre os grupos referentes à sobrevida global em 5 anos para os 77 pacientes.

Grupos	n	Média BAP1	p
Vivos	71	0.59376	0.163
Mortos	06	0.47124	

4.3.3 Sobrevida Câncer Específica (SCE)

Considerando-se toda a amostra com 88 pacientes, foram 12 mortes por câncer, com sobrevida câncer específica de 86,4% em cinco anos (Figura 15).

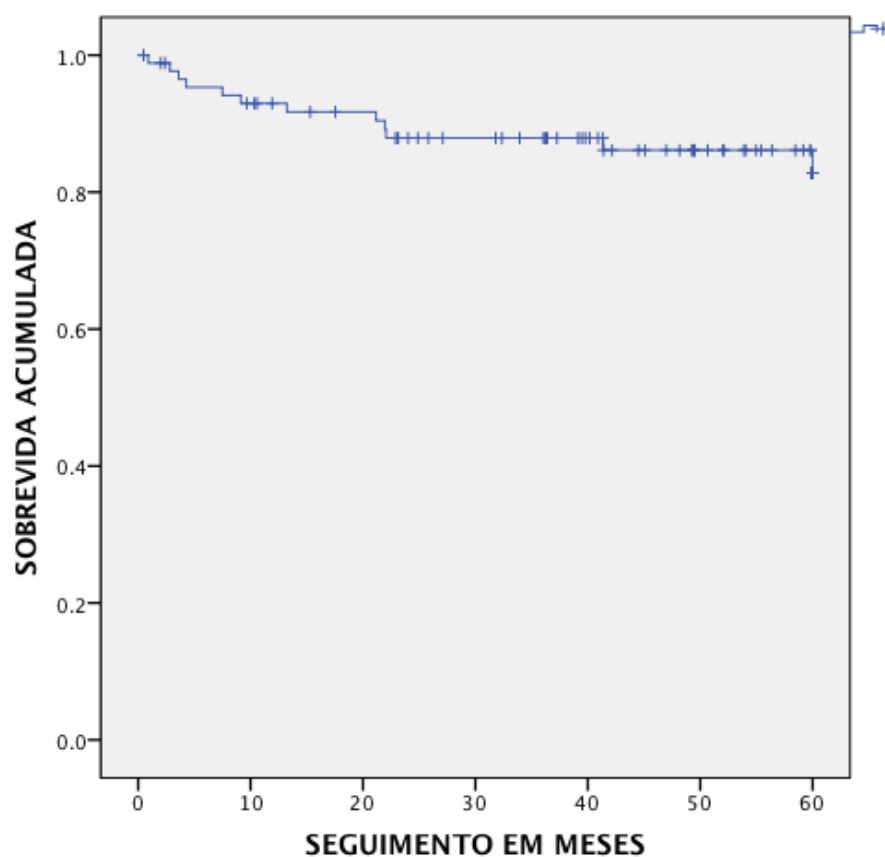


Figura 15 - Curva de sobrevida câncer específica em 60 meses para os 88 pacientes portadores de CCRcc (86.4%).

Dentre as variáveis clínicas e demográficas, as que influenciaram significativamente a SCE foram: presença de sintomas ao diagnóstico ($p=0,027$) e presença de metástase ao diagnóstico ($p<0,001$), conforme Tabela 22.

Tabela 22 - Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com variáveis clínicas em 88 pacientes portadores de CCRcc.

Variável	Categoria	N	SCE em 5 anos (%)	p (log rank)
Raça	Branco	7	100	0.473
	Não branco	49	93.9	
	Ignorados	32	-	
Sexo	Masculino	51	90.7	0.293
	Feminino	37	97.1	
	Não fumante	51	94.1	
Tabagismo	Fumante	26	92.3	0.613
	Ignorados	11	-	
	0	41	92.7	
ECOG	1 e 2	20	100	0.451
	Ignorados	27	-	
	1 e 2	67	92.5	
ASA	3 e 4	9	100	0.351
	Ignorados		-	
	Não	53	98.1	
Sintomas	Sim	24	83.3	0.027
	Ignorados		-	
	Não	77	93.5	
Metástase ao diagnóstico	Sim	11	36.4	<0.001

Assim como na sobrevida global, todos os fatores anatomopatológicos analisados (Tabela 23) apresentaram impacto ($p < 0.05$) na SCE em 5 anos.

Tabela 23 - Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas em 88 pacientes portadores de CCRcc.

Variável	Grupos	n	SCE em 5 a (%)	p
Grau de Fuhrman	1 e 2	59	96.6	<0.001
	3 e 4	29	65.5	
Invasão Veia Renal	Não	81	88.9	0.005
	Sim	07	57.1	
Invasão Gordura Perirrenal	Não	65	96.9	<0.001
	Sim	23	56.5	
Invasão gordura seio renal	Não	68	97.1	<0.001
	Sim	20	50	
Invasão de Pelve Renal	Não	84	89.3	<0.001
	Sim	04	25	
IVM	Não	71	94.4	<0.001
	Sim	17	52.9	
ILM	Não	77	90.9	<0.001
	Sim	11	54.5	
Necrose tumoral	Não	63	93.7	0.002
	Sim	25	68.0	
Componente Sarcomatóide	Não	86	88.4	<0.001
	Sim	02	0	
	Não retirada	53	94.3	
Adrenal	Retirada neoplasia	sem 29	82.8	<0.001
	Retirada neoplasia	com 06	33.3	
	Não	83	89.2	
pN	Sim	05	40	<0.001
	1 e 2	61	98.4	
Estadio Patológico Agrupado	3 e 4	27	59.3	<0.001

Os valores da expressão gênica dos genes CD 133 e BAP1 não apresentaram impacto na SCE em 5 anos dos 88 pacientes do estudo. Baixa expressão de BAP1 e alta expressão do CD 133 estiveram relacionadas a pior SCE. Abaixo, a representação das curvas de SCE para os genes BAP1 e CD 133, estratificados por grupos a partir da mediana e do percentil 75, respectivamente. Figuras 16 e 17.

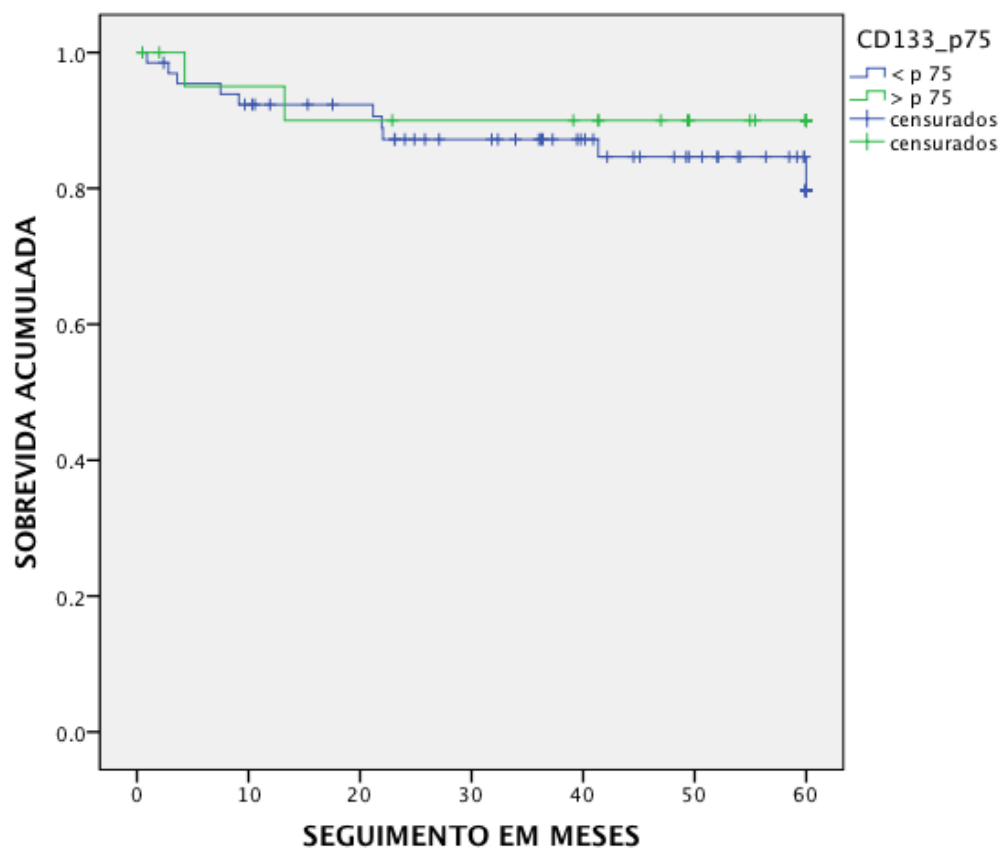


Figura 16 - Curva de sobrevida câncer específica em 60 meses para os 88 pacientes portadores de CCRcc estratificados em valores de expressão gênica do CD 133 acima e abaixo do percentil 75 ($p=0.466$).

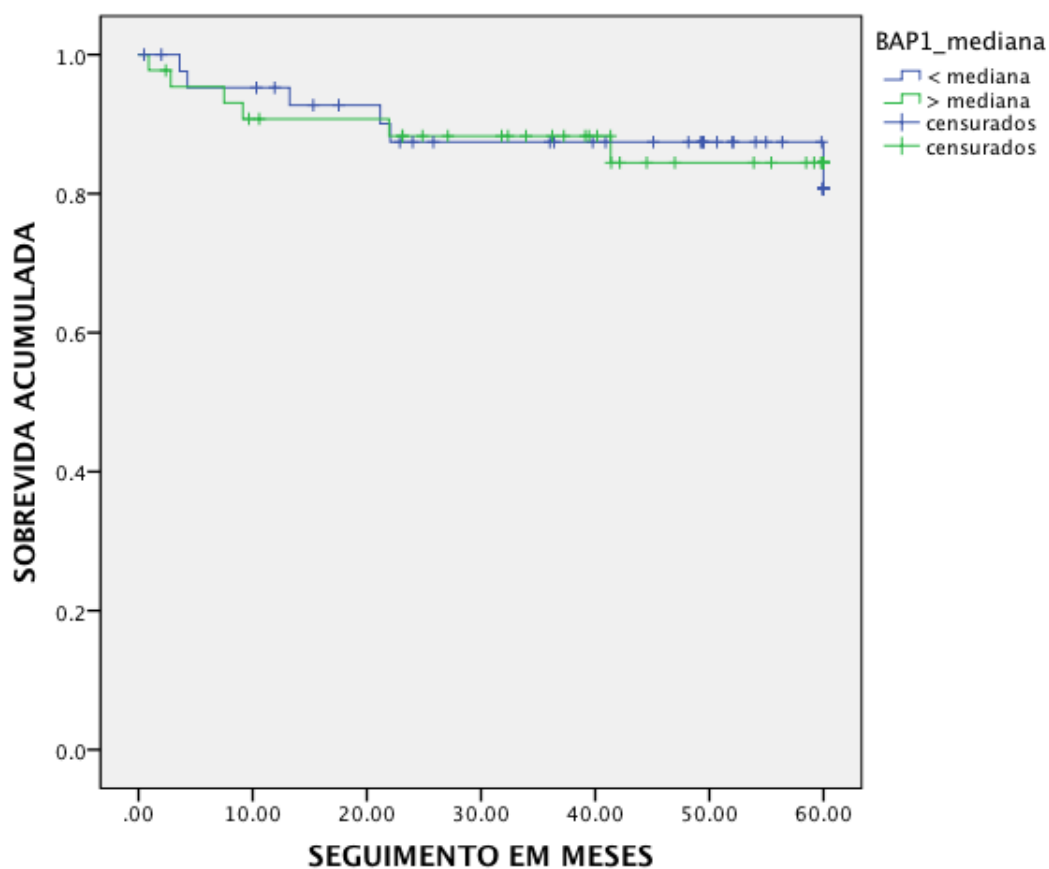


Figura 17 - Curva de sobrevida câncer específica em 60 meses para os 88 pacientes portadores de CCRcc estratificados em valores de expressão gênica do BAP 1 acima e abaixo da mediana ($p=0.992$).

A comparação dos valores de expressão do mRNA do CD133 e do BAP1 entre os grupos de **indivíduos vivos/mortos por outras causas X indivíduos mortos por câncer** não mostrou diferença estatística e estão apresentadas nas Tabelas 24 e 25.

Tabela 24 - Comparação de médias dos valores de expressão do gene CD133 entre os grupos referentes à sobrevida câncer específica em 5 anos para os 88 pacientes.

Grupos	n	Média CD133	p
Vivos/mortos outra causa	73	0.84675	0.142
Mortos por câncer	15	1.52633	

Tabela 25 - Comparação de médias dos valores de expressão do gene BAP1 entre os grupos referentes à sobrevida câncer específica em 5 anos para os 88 pacientes.

Grupos	n	Média BAP1	p
Vivos/mortos outra causa	73	0.59262	0.985
Mortos por câncer	15	0.52653	

4.3.4 Pacientes sem metástase ao diagnóstico.

Excluindo-se os casos de metástase ao diagnóstico, foram cinco mortes por câncer e sobrevida câncer específica em 5 anos de 93,5%, conforme Figura 18 abaixo.

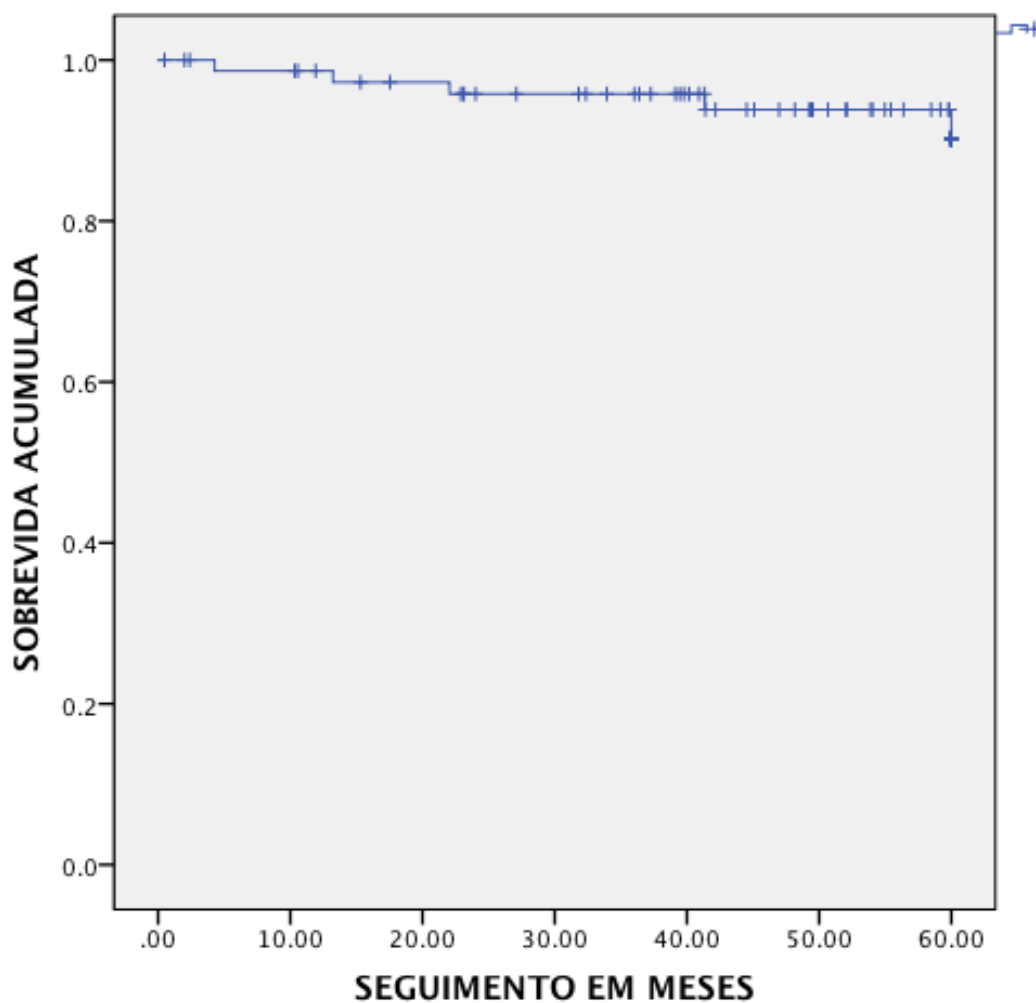


Figura 18 – Curva de sobrevida câncer específica em 60 meses dos 77 pacientes com CCRcc não metastático (93.5%).

Para este grupo de pacientes, entre as variáveis clínicas e epidemiológicas, a presença de sintomas ao diagnóstico apresentou impacto na SCE em 5 anos ($p=0.027$), conforme Tabela 26.

Tabela 26 - Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com variáveis clínicas em 77 pacientes portadores de CCRcc não metastático.

Variável	Categoria	N	SCE em 5 anos (%)	p (log rank)
Raça	Branco	7	100	0.473
	Não branco	49	93.9	
	Ignorados	21	-	
Sexo	Masculino	43	90.7	0.293
	Feminino	34	97.1	
	Não fumante	51	94.1	
Tabagismo	Fumante	26	92.3	0.613
	Ignorados	-	-	
	0	41	92.7	
ECOG	1 e 2	20	100	0.451
	Ignorados	16	-	
	1 e 2	67	92.5	
ASA	3 e 4	9	100	0.351
	Ignorados	12	-	
	Não	53	98.1	
Sintomas	Sim	24	83.3	0.027
	Ignorados	11	-	

Dentre as variáveis anatomopatológicas, as que influenciaram significativamente a SCE foram: grau de Fuhrman ($p=0,008$), invasão da gordura perirrenal e do seio renal ($p<0,001$ para ambas), invasão de pelve/ureter ($p=0,041$), componente sarcomatóide ($p<0,001$) e estadiopatológico agrupado 3 e 4 ($p=0,001$), conforme Tabela 27.

Tabela 27 - Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas em 77 pacientes portadores de CCRcc não metastático.

Variáveis	Categorias	N	SCE em 5 anos	
			%	p (log rank)
Grau de Fuhrman	1 e 2	57	98.2	0.008
	3 e 4	20	80	
Invasão de Veia Renal	Não	74	93.2	0.674
	Sim	3	100	
Invasão Gordura perirrenal	Não	61	100	< 0.001
	Sim	16	68.8	
Invasão da gordura seio renal	Não	64	98.4	< 0.001
	Sim	13	61.5	
Invasão de pelve/ureter	Não	75	93.3	0.041
	Sim	2	50	
IVH	Não	67	94	0.147
	Sim	10	80	
ILM	Não	70	92.9	0.559
	Sim	7	85.7	
Necrose tumoral	Não	58	93.1	0.656
	Sim	19	89.5	
Componente sarcomatóide	Não	76	93.4	< 0.001
	Sim	1	0	
Adrenal	Sem neoplasia	74	93.2	0.149
	Com neoplasia	3	66.7	
pN	N0	76	92.1	0.752
	N1 ou 2	1	100	
Estadio Patológico	I e II	59	98.3	0.001
	III e IV	18	72.2	

Dentre os 77 pacientes não metastáticos, não se observou impacto do grau de expressão do BAP1 na SCE em nenhuma das estratificações por grupo. O agrupamento pelo valor da mediana teve um $p=0,165$, sendo uma menor SCE no grupo com baixa expressão de mRNA do BAP1. (Figura 19)

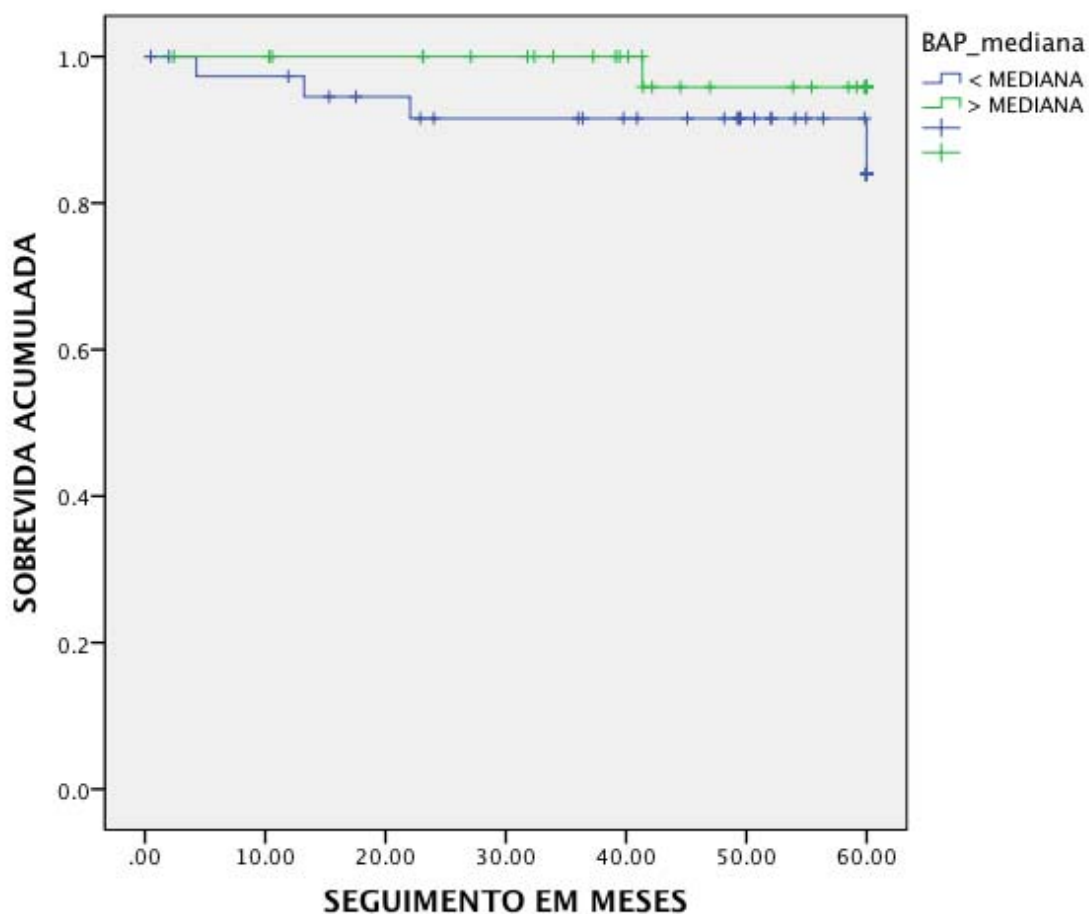


Figura 19 - Curva de sobrevida câncer específica em 60 meses para os 77 pacientes portadores de CCRcc não metastático estratificados em valores de expressão gênica do BAP 1 acima e abaixo da mediana.

Para análise de SCE a partir dos valores de expressão do CD133, novamente foi utilizado o percentil 75 como ponto de corte. Não houve impacto da expressão gênica do CD 133 nas curvas de sobrevida ($p=0,372$), sendo o grupo com maior expressão relacionado com uma pior SCE (Figura 20).

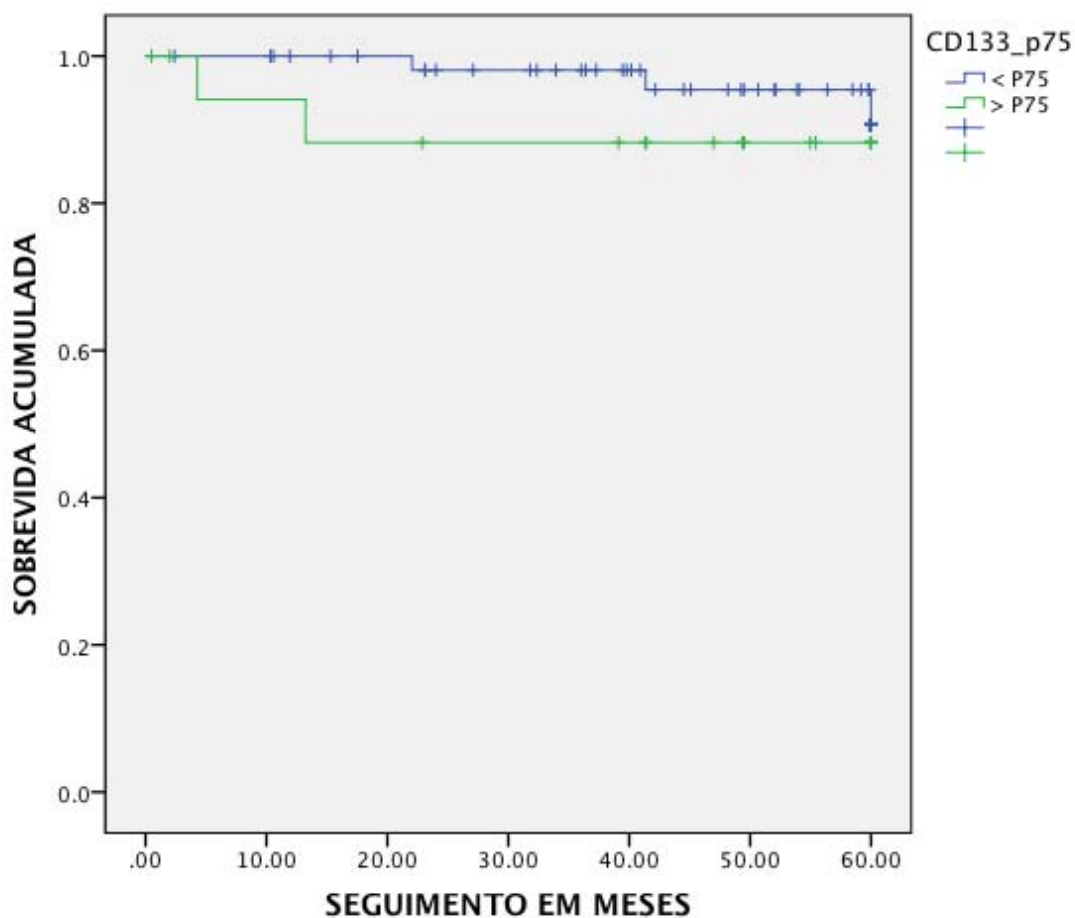


Figura 20 - Curva de sobrevida câncer específica em 60 meses para os 77 pacientes portadores de CCRcc não metastático estratificados em valores de expressão gênica do CD 133 acima e abaixo do percentil 75 ($p=0.372$).

Entre os pacientes não metastáticos, a comparação dos valores de expressão do mRNA do CD133 e do BAP1 entre os grupos de **indivíduos vivos/mortos outras causas X indivíduos mortos por câncer** não mostrou diferença estatística e estão apresentadas na Tabela 28 e 29.

Tabela 28 - Comparação de médias dos valores de expressão do gene CD133 entre os grupos referentes à sobrevida câncer específica em 5 anos para os 77 pacientes.

Grupos	n	Média CD133	p
Vivos ou mortos outra causa	72	0.86571	0.333
Mortos por câncer	05	3.54566	

Tabela 29 - Comparação de médias dos valores de expressão do gene BAP1 entre os grupos referentes à sobrevida câncer específica em 5 anos para os 77 pacientes.

Grupos	n	Média BAP1	p
Vivos ou mortos outras causa	72	0.59088	0.154
Mortos	05	0.48772	

4.3.5 Sobrevida Livre de Doença (SLD)

As análises de sobrevida livre de doença foram realizadas apenas para o grupo de pacientes sem metástases ao diagnóstico (n=77). A SLD em cinco anos na população estudada foi de 80,5%, como ilustrado na Figura 21.

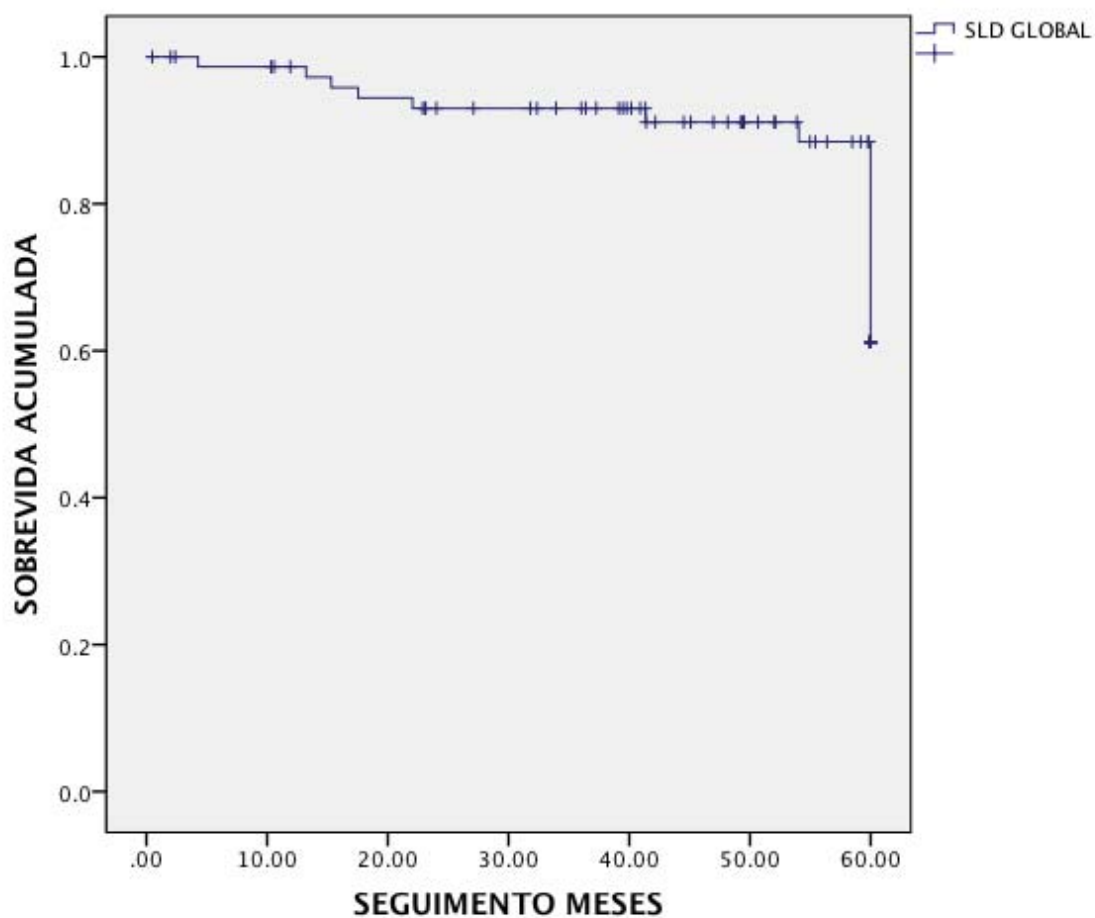


Figura 21 – Curva de sobrevida livre de doença em 60 meses para os 77 pacientes portadores de CCRcc não metastáticos ao diagnóstico (80.5%).

Nenhuma variável clínica e demográfica apresentou impacto significativo nas curvas de SLD, conforme a Tabela 30 abaixo.

Tabela 30 - Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença em 5 anos de acordo com variáveis clínicas e demográficas em 77 pacientes portadores de CCRcc não metastáticos ao diagnóstico.

Variável	Categoria	N	SLD em 5 anos (%)	p (log rank)
Raça	Branco	9	55.6	0.603
	Não branco	56	67.9	
	Ignorados	23	-	
Sexo	Masculino	51	64.7	0.181
	Feminino	37	78.4	
	Não fumante	59	71.2	
Tabagismo	Fumante	28	69	0.593
	Ignorados	-	-	
	0	43	79.1	
ECOG	1 e 2	26	61.5	0.158
	Ignorados	19	-	
	1 e 2	70	77.1	
ASA	3 e 4	15	46.7	0.043
	Ignorados	03	-	
	Não	54	85.2	
Sintomas	Sim	33	48.5	< 0.001
	Ignorados	01	-	
	Não	77	80.5	
Metástase ao diagnóstico	Não	77	80.5	< 0.001
	Sim	11	0	

Dentre as variáveis anatomopatológicas, as que influenciaram significativamente a SLD foram: grau de Fuhrman ($p=0.003$), invasão da gordura perirrenal e do seio renal ($p<0.001$ para ambas), invasão vascular microscópica ($p=0.044$), componente sarcomatóide ($p<0.001$) e estadió patológico ($p<0.001$), conforme demonstrado na Tabela 31.

Tabela 31 - Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença em 5 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas em 77 pacientes portadores de CCRcc não metastáticos ao diagnóstico.

Variáveis	Categorias	N	SLD em 5 anos %	p
Grau de Fuhrman	1 e 2	57	89,5	0.003
	3 e 4	20	55	
Invasão de Veia Renal	Não	74	81.1	0.173
	Sim	3	66.7	
Invasão Gordura perirrenal	Não	61	91.8	<0.001
	Sim	16	37.5	
Invasão da gordura seio renal	Não	64	92.2	<0.001
	Sim	13	23.1	
Invasão de pelve/ureter	Não	75	81.3	0.431
	Sim	2	50	
IVM	Não	67	85.1	0.044
	Sim	10	50	
IVL	Não	70	82.9	0.195
	Sim	7	57.1	
Necrose tumoral	Não	58	79.3	0.671
	Sim	19	84.2	
Componente sarcomatóide	Não	76	81.6	<0.001
	Sim	1	0	
Adrenal	Sem neoplasia	74	81.1	0.891
	Com neoplasia	3	66.7	
pN	N0	76	80.3	0.456
	N1 ou 2	1	100	
Estadio Patológico Agrupado	I e II	59	93.2	0.001
	III e IV	18	38.9	

Apesar dos casos com baixa expressão do mRNA BAP1 apresentarem uma pior SLD, não se observou impacto significativo do grau de expressão gênica do BAP1 estratificado pela mediana na SLD ($p=0,625$), conforme demonstrado a seguir, na Figura 22.

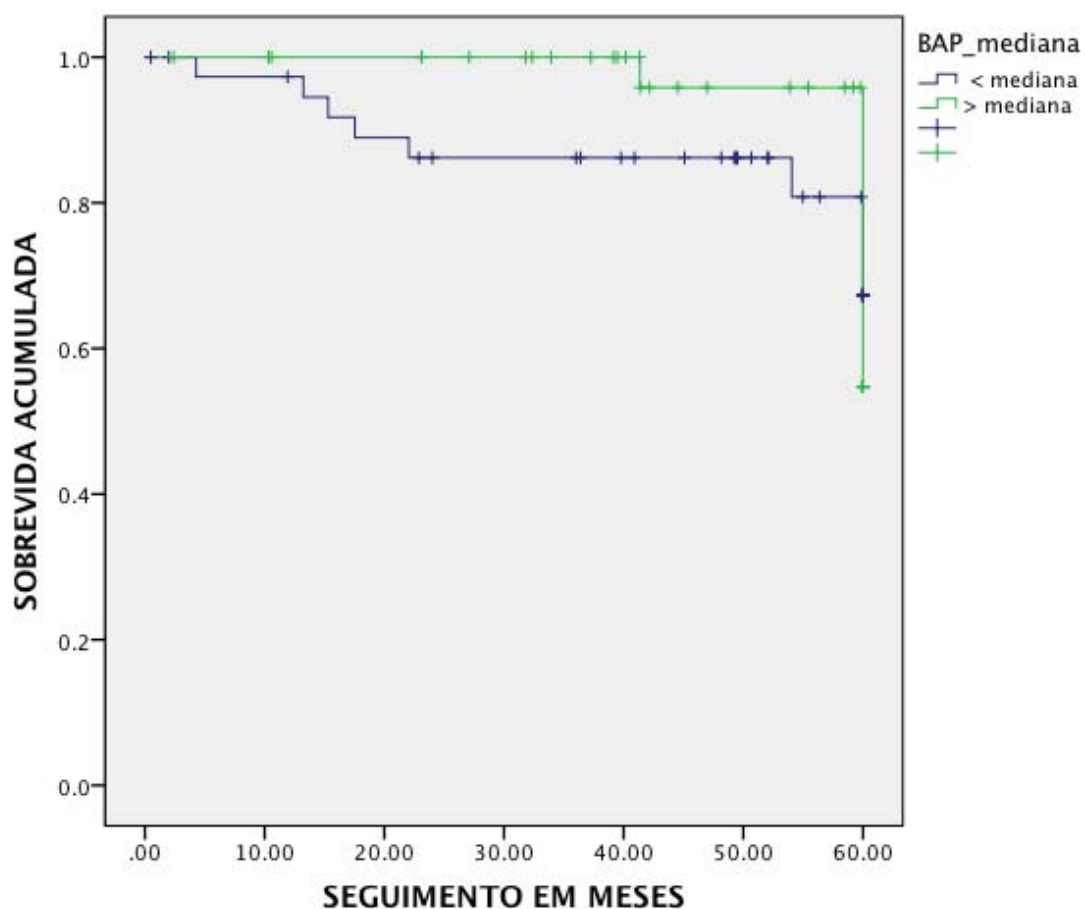


Figura 22 – Curva de sobrevida livre de doença em 60 meses para os 77 pacientes portadores de CCRcc não metastáticos ao diagnóstico, conforme expressão gênica do BAP1 estratificada pela mediana ($p=0.625$).

Não foi observado impacto da expressão gênica do gene CD133 nas curvas de SLD, mesmo utilizando-se diferentes formas de estratificação dos valores em grupos. Na Figura 23 está demonstrada a curva de SLD do CD133 conforme estratificação pelo percentil 75 ($p=0.766$).

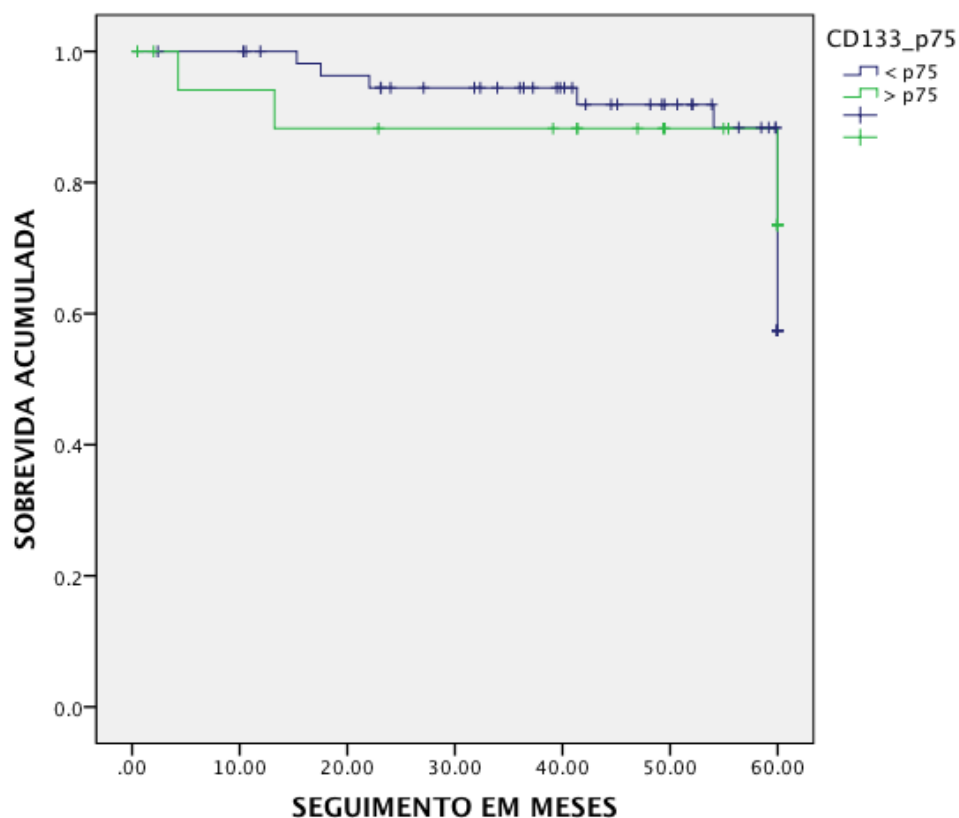


Figura 23 - Curva de sobrevida livre de doença em 60 meses para os 77 pacientes portadores de CCRcc não metastáticos ao diagnóstico, conforme expressão gênica do CD133 estartificada pelo percentil 75 ($p=0.776$).

Para os pacientes não metastáticos, a comparação dos valores de expressão do mRNA do CD133 e do BAP1 entre os grupos de **indivíduos sem recidiva** X **indivíduos com recidiva** não mostrou diferença estatística e estão apresentadas na Tabelas 32 e 33.

Tabela 32 - Comparação de médias dos valores de expressão do gene CD133 entre os grupos referentes à sobrevida livre de doença em 5 anos para os 77 pacientes.

Grupos	n	Média CD133	p
Sem recidiva	64	0.89701	0.381
Com recidiva	13	1.74478	

Tabela 33 - Comparação de médias dos valores de expressão do gene BAP1 entre os grupos referentes à sobrevida livre de doença em 5 anos para os 77 pacientes.

Grupos	n	Média BAP1	p
Sem recidiva	64	0.57406	0.290
Com recidiva	13	0.63268	

4.3.6 Análises Multivariadas

A análise multivariada foi realizada na análise da SG e SCE no grupo com 88 pacientes e na SLD no grupo com 77 pacientes. O baixo número de eventos (6 e 5, respectivamente) não justificou a realização de análise multivariada para a SG e SCE do grupo com 77 pacientes. A SLD não foi analisada para o grupo de 88 pacientes devido à presença de indivíduos com metástases ao diagnóstico.

- Análise Multivariada SG**

Devido ao baixo número de eventos (n=13), foram selecionadas apenas as 3 variáveis mais significativas para a análise multivariada. Foram elas: grau de Fuhrman ($p<0.001$), presença de necrose tumoral ($p=0.005$) e estágio estratificado ($p<0.001$).

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, presença de necrose tumoral (RR= 3.229; IC 95% [1.162 – 8.975]) e estágio patológico estratificado

(RR=10.999; IC 95% [3.088 – 39.182]) foram fatores independentes para risco de óbito.

- **Análise Multivariada SCE**

Devido ao baixo número de eventos (n=12), foram selecionadas apenas as 3 variáveis mais significativas para a análise multivariada. Foram elas: grau de Fuhrman ($p<0.001$), presença de necrose tumoral ($p=0.002$) e estágio estratificado ($p<0.001$).

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, apenas o estágio patológico estratificado (RR= 8.738; IC 95% [1.655 – 45.858]) foi fator de risco independente para o óbito.

- **Análise Multivariada SLD**

Devido ao baixo número de eventos (n=15), foram selecionadas apenas as 3 variáveis mais significativas para análise multivariada. Foram elas: grau de Fuhrman ($p=0.003$), presença de invasão vascular microscópica ($p=0.044$) e estágio patológico agrupada ($p<0.001$).

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, apenas o estágio patológico estratificado (RR: 8.270; IC 95% [2.629 – 26.013]) foi fator independente para risco de recidiva neoplásica.

5 DISCUSSÃO

5.1 ASPECTOS GERAIS

Dentre as variáveis clínicas avaliadas neste estudo, apenas a presença de sintomas ao diagnóstico e a presença de metástases ao diagnóstico apresentaram influencia nas curvas de SG, SCE e SLD. Esse resultado é compatível com a literatura (HOFBAUER et al. 2014; TILKI et al. 2014) por se tratarem de fatores indicativo e definidor, respectivamente, da doença avançada.

Neste atual estudo, a classificação de ASA, previamente descrita por nosso grupo como ferramenta prognóstica das curvas de sobrevida (DE CASSIO ZEQUI et al. 2010), se mostrou relevante apenas para a curva de SLD, não tendo relevância nas outras curvas de SG e SCE. Este dado é interessante, pois logicamente espera-se que indivíduos com maiores escores de ASA apresentem mais complicações pós operatórias e menores taxas de SG, em virtude de suas comorbidades, conforme demonstrado por outro estudo de nosso grupo recente (FERREIRA et al. 2013). Entretanto, nosso grupo mostra novamente que pacientes com mais doenças associadas, podem ter desfechos clínicos menos favoráveis.

Talvez isso se dê pelo fato destes pacientes (ASA 3) terem um prejuízo imunitário em comparação às pessoas mais saudáveis (ASA 1 e 2), ou pode ser um viés, decorrente destes pacientes frequentarem mais serviços médicos e se submeterem a mais exames diagnósticos, devido às diversas afecções e, deste modo, estarem mais expostos à chance do diagnóstico da recidiva mais precoce.

No nosso grupo, observou-se que variáveis anatomopatológicas clássicas descritas em estudos prévios, como grau de Fuhrman (FUHRMAN et al. 1982; TSUI et al. 2000; HERMANN et al. 2007), invasão de gordura perirrenal, invasão de pelve renal, componente sarcomatóide e estadió TNM patológico se mostraram fatores prognósticos para as curvas de SG e SCE nas análises univariadas do grupo com os 88 pacientes e também no grupo sem os pacientes metastáticos ao diagnóstico.

Em relação à SLD encontramos quase os mesmos fatores descritos nas curvas de SG e SCE, com a adição da invasão microvascular e a ausência de associação de invasão de pelve renal com a SLD. A invasão microvascular como fator prognóstico em curva de SLD corrobora os achados de outros autores (VAN POPPEL et al. 1997; DALL'OGGIO et al. 2007).

O sistema TNM de estadiamento é atualmente o fator mais utilizado como prognóstico no CCR (LAM et al. 2006). Junto com outras variáveis anatomopatológicas como grau de Fuhrman (LAM et al. 2005), diferenciação sarcomatóide (GOLDSTEIN et al. 1997) e presença de necrose tumoral (SENGUPTA et al. 2005), os fatores anatomopatológicos são critérios consagrados muito utilizados na prática atual. No entanto, mesmo estes fatores já consagrados ainda apresentam eficácia insatisfatória para predizer o comportamento de pequenas massas renais e a evolução pós operatória de tumores cirurgicamente ressecados. Mesmo os principais nomogramas para evolução pós operatória dos tumores ressecados apresentam eficácia em torno de 80% (GALFANO et al. 2008).

Consequentemente, parece razoável a busca por novos marcadores biomoleculares que apresentem impacto prognóstico e possam auxiliar na conduta terapêutica de pacientes com CCR. Estes marcadores devem ser avaliados através de

curvas de sobrevida e pela associação com outras variáveis clínicas e anatomopatológicas de importância prognóstica.

Além disso, a análise destes marcadores precisa, preferencialmente, ser factível e reprodutível em produtos de biópsias renais, para avaliação do possível comportamento de massas renais com indicação de protocolo de vigilância ativa ou tratamentos ablativos.

5.2 EXPRESSÃO DO CD 133

A proteína CD133 tem sido usada como marcador de células tronco tumorais humanas, pois, estudos experimentais demonstraram que células CD133+ foram capazes de gerar crescimento tumoral quando xenoimplantada em ratos (Singh et al. 2004), caracterizando a auto renovação, e foram capazes de produzir padrões antigênicos e morfológicos semelhantes ao tumor original, caracterizando a multi potencialidade (RICCI-VITTIANI et al. 2007).

Além disso, células tronco tumorais (CTCs) CD133+ foram associadas à progressão tumoral em tumores pancreáticos, bem como, foram consideradas essenciais para o processo de metástases deste tipo de carcinoma (HERMANN et al. 2007) e do carcinoma colorretal (SINGH et al. 2004). Em células já diferenciadas, a proteína geralmente se apresenta hipoexpressa (ARTELLS et al. 2012).

Em artigo de YU et al. (2010) sobre carcinoma gástrico, o autor analisa a relação da expressão gênica do CD133 com outro gene, o KI67, este um gene marcador de proliferação celular. O resultado, considerado como interessante pelo autor, demonstrou uma relação negativa entre os dois genes. Os casos com alta

expressão de CD133 foram associados à uma menor expressão de KI67, isto é, uma menor atividade de proliferação celular. Uma das explicações para este achado seria a presença de diferentes perfis celulares e moleculares de acordo com a evolução do processo de crescimento e proliferação intratumoral, caracterizando o conceito de heterogeneidade tumoral (GERLINGER et al. 2012).

As CTTs CD133 + seriam caracterizadas por um alto potencial de diferenciação, porém com uma baixa proliferação, servindo como um pequeno *pool* celular cujo processo mitótico fica estacionado na fase G0. O processo de proliferação celular se iniciaria mais intensamente com as células um nível abaixo das CTTs no processo de diferenciação.

Esta característica confere as CTTs CD133+ um caráter de reserva técnica tumoral para criação de células diferenciadas com poder mitótico e de proliferação. Analisando além, devido à seu processo mitótico estacionado na fase G0 da mitose, as células CD133+ também seriam mais resistentes à agentes quimio e radio terapicos, estando então, diretamente envolvidas no processo de resistência celular tumoral (GANGEMI et al. 2009).

Estes achados sugerem que a proporção de CTTs em um determinado tumor teria relevância clínica numa busca de uma terapia alvo contra as CTTs especificamente. Um complexo terapêutico droga/anticorpo anti-CD133 já se mostrou efetivo ao inibir o crescimento de carcinoma hepatocelular em linhagens celulares in vitro e in vivo (SMITH et al. 2008). Uma diminuição na quantidade de CTTs poderia portanto indicar um sucesso terapêutico contra a doença.

A proteína CD133 já foi relacionada a vários tumores sólidos na raça humana tais como: retinoblastoma, leucemias, carcinoma hepatocelular, carcinoma colorretal,

carcinoma de células renais e outros. E seu nível de expressão, tanto gênico (mRNA) quanto proteico (imunohistoquímica) já foi descrito em trabalhos prévios.

ARTELLS et al. (2012) descreveram a expressão gênica do CD133 em 64 pacientes portadores de carcinoma colorretal, pareando tecido neoplásico com tecido não neoplásico de todos os indivíduos. Em 70% dos pacientes, os autores acharam um hiperexpressão de CD133 no tecido neoplásico.

Em outro estudo avaliando o mRNA do CD133 em 31 pacientes portadores de carcinoma gástrico, o mRNA do CD133 estava expresso em 100% dos tecidos neoplásicos, enquanto apenas 16% dos tecidos não neoplásicos apresentavam o RNA mensageiro (YU et al. 2010).

Num dos poucos estudos disponíveis sobre análise gênica em CCR, o mRNA do CD133 estava hipoexpresso no tecido neoplásico em relação ao tecido não neoplásico em 28 de 41 pacientes ($p=0.04$), porém, neste mesmo artigo, o CD133 não se correlacionou com nenhum marcador de mau prognóstico ou desfecho desfavorável da doença (D'ALTERIO et al. 2010).

Nos nossos resultados, a expressão gênica do CD133 no tecido neoplásico foi menor que a média das amostras não neoplásicas em 82% dos pacientes. E a média da expressão do mRNA CD133 dos tecidos neoplásicos foi significativamente menor que a média dos não neoplásicos. Este achado foi semelhante à outro estudo do nosso grupo que evidenciou a hipoexpressão imunohistoquímica do CD133 em tecidos tumorais (DA COSTA 2011). Deve-se considerar que, em ambos os trabalhos do nosso grupo, a comparação dos tecidos tumorais e não tumorais foi feita de forma não pareada, utilizando-se uma amostra menor de pacientes para fazer uma amostragem de tecidos não neoplásicos.

Esta diferença de comportamento da expressão do CD133 no CCR, em relação à outros tumores do trato gastrointestinal (colorretal, gástrico e pancreático), parece acontecer também quando se avalia o impacto prognóstico do CD133 nestes tumores.

Nos tumores do aparelho digestivo, a hiperexpressão gênica de CD133 parece associado com uma pior apresentação clínica da doença. HORST et al. (2009) avaliando mRNA CD133 em cancer colorretal encontraram significativa correlação da hiperexpressão gênica com pior apresentação clínica da doença, tais como metástases hepáticas sincrônicas e envolvimento linfonodal.

Achado semelhante foi publicado por HORST et al. (2009) mostrando a hiperexpressão de CD133 relacionada à presença de metástases hepáticas sincrônicas.

Num grupo de 99 pacientes submetidos à gastrectomia por carcinoma gástrico, a alta expressão da proteína na IHQ esteve associada à fatores de mau prognóstico como: tumores maiores que 5 cm, estadio TNM avançado, linfonodos comprometidos, invasão linfática e vascular microscópicas. Ainda neste mesmo grupo, foi avaliada a expressão gênica do mRNA do CD133 em 31 pacientes, sendo a hiperexpressão do mRNA CD133 também associada à envolvimento linfonodal e pior sobrevida global (YU et al. 2010).

Na análise do papel do CD133 no CCR, dois estudos, avaliando a expressão proteica do CD133 através de IHQ, encontraram resultados diferentes em relação aos tumores gastrointestinais. Um destes estudos foi realizado por nosso grupo por DA COSTA et al. (2012a e b) e foi o principal motivador para que o CD133 continuasse a ser estudado através de outra técnica biomolecular como a RT-qPCR.

Neste estudo, nosso grupo encontrou uma hipoexpressão imunohistoquímica do CD133 nos tecidos tumorais e esta baixa expressão se associou com a presença de invasão vascular microscópica, um reconhecido fator de mau prognóstico em CCR. Além disso, a baixa expressão de CD133 se associou a redução de todas as taxas de sobrevida estudadas (SG, SCE e SLD) na análise univariada. Porém, não se observou impacto desse marcador nas análises multivariadas de sobrevida (DA COSTA et al. 2012a e b).

O outro artigo analisando a expressão proteica do CD133 demonstrou que a hiperexpressão proteica do CD133 foi maior em pacientes não metastáticos e apresentou correlação com fatores de bom prognóstico como a falta de componente sarcomatóide ou necrose na peça cirúrgica (KIM et al. 2011).

No estudo aqui apresentado, a única correlação do CD133 estatisticamente significativa com fatores prognósticos anatomopatológicos foi a correlação de sua hiperexpressão com a presença de invasão da glândula adrenal ($p=0.007$). A expressão gênica do CD133 não apresentou impacto nas curvas de SG, SCE ou SLD.

De acordo com a sétima versão do TNM da AJCC 2010, a invasão da glândula adrenal caracteriza o estadio T4, isto é, um estadio patológico avançado (EDGE et al. 2010). No entanto, a correlação do mRNA do CD133 com o estadio patológico estratificado em grupos (1 e 2 X 3 e 4) não foi estatisticamente significativa. Com isso, não podemos descartar a possibilidade de falha estatística do tipo *beta* na correlação do CD133 com a presença de invasão adrenal.

Apesar da falta de significância estatística, possivelmente explicada por uma amostra pequena para um tempo de acompanhamento de 5 anos, ao analisarmos apenas descritivamente, percebemos uma associação da hiperexpressão de mRNA

CD133 com alguns fatores de mau prognóstico e com menores tempo de sobrevivência nas curvas apresentadas, embora sem significância estatística, ressaltamos.

Por se tratar de um dos poucos estudos analisando o mRNA do CD133 em CCR, este trabalho parece mostrar que a correlação entre hiperexpressão de CD133 e fatores de mau prognóstico em CCR não é diferente dos tumores gastrointestinais, merecendo uma investigação numa maior coorte, ao invés de ser descartado como fator prognóstico em CCRcc.

Os achados diferentes entre as técnicas de RT-qPCR e IHQ também foram previamente relatados em tumores colorretais (KEMPER et al. 2010) e em tumores gástricos (YU et al. 2010). Sugerem os autores que uma mudança no padrão de glicosilação da proteína levaria a alteração na expressão imunohistoquímica do epítipo AC 133.

A importância da glicosilação no mecanismo de diferenciação celular parece estar bem definido. Sabe-se que o estado de glicosilação de uma célula muda de acordo com seu grau de diferenciação e transformação maligna. Devido à ligação restrita do anticorpo AC133 à um epítipo glicosilado de CD133, é possível que a expressão do antígeno AC133 observada possa estar subestimada, quando vista como uma medida de expressão do CD133 (CORBEIL et al. 2000).

Ademais, nem sempre a hiperexpressão de um marcador biomolecular, verificada durante a transcrição através do mRNA, se traduz inequivocamente em alta expressão pela imunohistoquímica. Além da questão da glicosilação dos epítipos mencionada acima, inúmeros outros eventos biomoleculares podem ocorrer para a baixa expressão na IHQ.

De qualquer modo, é curioso que numa mesma Instituição com *expertise* em

técnicas biomoleculares, a hipoexpressão imunohistoquímica esteja associada à eventos desfavoráveis específicos (morte por CCR e recidiva), equanto que a sua hiperexpressão em mRNA pareça se associar com pior prognóstico. Considerações devem ser feitas a respeito de um eventual erro ao compararmos “*pari passu*” estes diferentes estudos de nosso grupo como se fossem similares.

O estudo atual, infelizmente, por diversas limitações, não atingiu poder estatístico para validar a expressão do mRNA do CD 133 como fator prognóstico independente em CCR, ao contrário do estudo de DA COSTA (2012 a e b).

O estudo em tela, analisou o CD 133 apenas em portadores de CCR tipo de células claras, enquanto que na série de DA COSTA (2012 a e b) tivemos 30% de outros tipos histológicos (42 de 142 paciente não apresentavam CCR de células claras).

Além disso, por motivos logísticos de nossa instituição (disponibilidade em Biobanco), os pacientes analisados por RT-qPCR nesta série foram diferentes daqueles analisados por imunohistoquímica. Um futuro estudo analisando as duas técnicas no mesmo grupo de pacientes seria importante para confirmar a eventual “incongruência de achados entre elas ao se estudar o CD133 em pacientes portadores de CCR.

5.3 EXPRESSÃO DO BAP 1

O conhecimento a respeito do panorama de mutações no CCRcc, o subtipo histológico mais agressivo do CCR, mudou drasticamente nos últimos quatro anos em decorrência dos achados de estudos genômicos em câncer renal. Antes conhecida

como a doença de um único gene, o VHL. Sabe-se que a mutação ou inativação epigenética do gene von Hippel Lindau, encontrada em até 90% dos CCRcc, ainda é considerada o evento primário na patogênese deste tumor, porém não apresenta valor prognóstico e/ou preditivo significativo (RAKIN et al. 2006).

Neste contexto, novos estudos de sequenciamento identificaram uma frequência alta de mutação em outros genes, envolvidos na remodelação de cromatina, podendo-se citar o PBRM1 (41%), o KDM5C (9%), o BAP1 (8%) e o SETD2 (4%) (DALGLIESH et al. 2010; GUO et al. 2012). Apesar do mecanismo de ação destes genes remodeladores de cromatina ainda não estar totalmente esclarecido, a cromatina, juntamente com as histonas, são a base da arquitetura gênômica e sua desregulação certamente acarreta alterações na transcrição de outros importantes genes (HORN et al. 2002). Estas alterações em genes envolvidos com controle epigenético torna a via de remodelação de cromatina um campo emergente e promissor no estudo da oncogênese renal.

Como já foi relatado na introdução desta dissertação, 3 destes genes de remodelação de cromatina (BAP1, PBRM1 e SETD2) estão localizados no mesmo braço curto do cromossomo 3 (3p21), próximos ao locus 3p25 do gene VHL. Portanto, a perda de um dos alelos do 3p, presente na maioria dos CCRcc, acarreta uma alteração em 4 genes com possível ligação funcional entre eles. Estudos como estes que identificaram os genes remodeladores de cromatina continuam a serem feitos por vários centros. Neste contexto, um grupo da *Mayo Clinic* publicou recentemente 31 genes altamente expressos no CCRcc que provavelmente possuam papel importante no início e na progressão desta doença (VON ROEMELING et al. 2014).

Estudos de *exome sequencing*, confirmados pelo sequenciamento por método Sanger, demonstraram o BAP 1 como um gene supressor tumoral no CCRcc, funcionando de acordo com a teoria "*two-hit tumor supressor*" (PEÑA LLOPIS et al. 2012). A perda inicial do braço pequeno do cromossomo 3 pode inativar vários genes ligados à supressão tumoral no CCRcc, incluindo o BAP1. A maneira de inativação do segundo alelo do BAP1 é específica de cada órgão ou tecido. Nos mesoteliomas, por exemplo, ambos os alelos devem ser inativados por mutações pontuais ou inserções (TESTA et al. 2011). No CCRcc, esta perda do 3p leva a um estado celular de vulnerabilidade para a perda do segundo alelo do BAP1. PEÑA LLOPIS et al. (2012) encontrou uma frequência de 14% de mutações no alelo restante do BAP1, sendo a maioria delas produtoras de proteínas truncadas, geralmente no domínio UCH (ubiquitin C terminal hydrolase) da deubiquitinase nuclear.

A perda de um alelo nativo e a presença de mutações truncadas no alelo remanescente podem explicar o nosso achado de baixa expressão de mRNA do BAP1 no tecido tumoral quando comparado ao *pool* de amostras de tecidos não neoplásicos. Esta diferença de expressão foi estatisticamente significativa ($p=0.0034$) e 86% pacientes apresentaram menor expressão de mRNA no tecido tumoral.

Em relação aos fatores clínicos e epidemiológicos, encontramos associação entre a expressão do BAP1 e a classificação de ASA ($p=0.029$). Estudo prévio de nosso grupo demonstrou a classificação da *American Society of Anesthesiology* como ferramenta prognóstica adicional no CCR, semelhante aos escores de *status performance* como ECOG e *Karnofsky Performance Status* (KPS). Dentre os 145 pacientes, os classificados como ASA 3 apresentaram menores taxas de SG, SCE e SLD que os ASA 1 e 2, com impacto nas análises uni e multivariadas.

Adicionalmente os ASA 3 tiveram 10 vezes mais metástases e menos tumores assintomáticos que os demais (DE CASSIO ZEQUI et al. 2010). Recentemente corroboramos a associação do ASA 3 com variáveis clinicopatológicas desfavoráveis e com menor SG na análise univariada (FERREIRA et al. 2013).

Em relação as variáveis anatomopatológicas de reconhecido valor prognóstico, não encontramos associações entre a expressão do BAP1 e estas variáveis ao analisarmos os 88 pacientes da casuística. Na análise feita com exclusão dos 11 pacientes metastáticos, encontramos a correlação estatisticamente significativa da baixa expressão do BAP1 com: tumores maiores que 4cm, tumores com estadio pT3 e 4, presença de invasão de gordura perirrenal/seio renal e com estadios patológicos avançados (3 e 4).

Não sabemos com certeza se as metástases apresentam interações com a lesão primária a ponto de influenciar a expressão do tumor primário e, por isso, optamos por investigar a expressão do mRNA num tumor “livre” em teoria de eventuais influências. Esse talvez seja um ponto favorável em nossa análise.

Frente a esses resultados, talvez o BAP 1 seja importante nos CCR localizados e localmente avançados e não nos metastáticos, situação na qual diversos eventos biomoleculares que confirmam mais vantagens adaptativas (mutações adicionais, imortalização celular, interações com outras vias biomoleculares ainda desconhecidas etc) possam ter ocorrido. Um exemplo disso é o verificado com a anidrase carbônica IX, um marcador prognóstico importante em pacientes com metástases, mas insignificante para pacientes com doença local ou loco regional (SANDLUND et al. 2007; DE MARTINO et al. 2009).

Sabe-se que o tamanho tumoral é fator prognóstico independente, porém,

principalmente em idosos, existe uma chance de até 12% a 20% de benignidade em pequenas massas renais. Até mesmo as PMR, quando malignas, podem já se apresentar metastáticas entre 1 a 8% dos casos (KLATTE et al. 2008). A biópsia na identificação de malignidade em pequenas massas tumorais apresenta boa sensibilidade e também boa especificidade na caracterização do subtipo histológico. No entanto, a sensibilidade é baixa para identificação de outros importantes fatores de mau prognóstico como grau de Fuhrman e presença de necrose (MILLET et al. 2012).

A identificação de fatores de mau prognóstico em biópsias de pequenas células renais é de extrema importância para prever o potencial de agressividade da massa e ajudar na decisão terapêutica, principalmente em caso de *Active Surveillance*. Frente ao nosso achado de BAP1 pouco expresso em tumores maiores, podemos tentar investigar a correlação entre a baixa expressão de mRNA com PMR de maior potencial de crescimento e agressividade.

O envolvimento da gordura perirrenal é reconhecido como fator prognóstico independente em algumas séries. A invasão da gordura adjacente ao seio renal confere pior evolução se comparada à invasão da gordura da face externa do rim (TAKASHI et al. 1993). Ao analisar uma série de 205 pacientes inicialmente classificados como pT3a, THOMPSON et al. (2005) demonstrou que os 43 pacientes que apresentavam invasão da gordura do seio renal tinham maior mortalidade cancer específica, mesmo na análise multivariada, em relação aos pacientes apenas com gordura perirrenal comprometida. THOMPSON et al. (2005) sugere inclusive modificações na classificação dos tumores pT3a pela AJCC.

O estadiamento TNM (*Tumour-Node-Metastasis*) é o sistema prognóstico

mais utilizado em CCR. Submetido à frequentes atualizações, encontra-se desde 2010 em sua sétima versão pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e é importante ferramenta de estratificação de pacientes portadores de CCR (TELOKEN et al. 2009).

A relação encontrada com estadios patológicos avançados foi compatível com outros estudos prévios em CCRcc. Estadios patológicos 3 e 4 foram associados à pacientes BAP1 negativos na imunohistoquímica (JOSEPH et al. 2013) e à pacientes com presença de mutação no gene BAP1 (HAKIMI et al. 2013).

A perda de um alelo BAP1 foi associada à tumores com maior grau nuclear de Fuhrman, 3 e 4. Os autores atribuíram este achado à uma ativação da via tumorigênica do mTOR- *mammalian target of rapamycin* (PEÑA LLOPIS et al. 2012). A mesma correlação entre alto grau de Fuhrman com baixa expressão de BAP1 também foi encontrada em análise de 1330 casos por imunohistoquímica (JOSEPH et al. 2013). Em nossa estatística, essa correlação com grau de Fuhrman não foi reprodutível. Vale ressaltar que neste estudo, que os casos com grau de Fuhrman 3 e 4 foram proporcionalmente menores que os casos grau 1 e 2, 33% e 67%, respectivamente.

Num estudo analisando a evolução pós operatória de pacientes com CCRcc de baixo risco pelo *Mayo clinic* SSIGN score (FRANK et al. 2002), os autores encontraram a expressão imunohistoquímica do BAP1 como fator de risco para mortalidade cancer específica na análise univariada. Em outro estudo analisando *targeted sequencing* de 185 pacientes portadores de CCRcc, a presença de mutações no BAP1 impactou negativamente a curva de sobrevida cancer específica (HAKIMI et al. 2013).

Estudo da Universidade do Texas entre 1998 e 2011 analisou, por sequenciamento, a frequência de mutação entre dois genes de remodelação de cromatina, o BAP1 e o PBRM1. Entre os 145 pacientes, percebeu-se que as mutações destes dois genes foram, na sua grande maioria, mutuamente exclusivas. Os pacientes BAP1 mutantes apresentaram sobrevida global menor que os PBRM1 mutados (4.6 anos, intervalo confiança 2.1-7.2 X 10.6 anos; ic 9.8 – 11.5). Nesse mesmo estudo, os autores validaram este impacto do BAP1 na SG em outra coorte com 327 pacientes do Projeto The Cancer Genome Atlas. Os poucos casos de mutações duplas sincrônicas, BAP1 e PBRM1, foram associados à componente sarcomatóide e à pior curva de SG e SCE (KAPUR et al. 2013).

Em relação ao *PBRM1*, nosso grupo demonstrou por IHQ e por RT-qPCR do mRNA que a perda de sua expressão gênica e proteica se associou a piores taxas de SCE e SLD em análise univariada e também com fatores clínico patológicos desfavoráveis (DA COSTA et al. 2014).

Nossa casuística demonstrou que o *BAP1* esteve também associado à fatores de mau prognóstico já estabelecidos na literatura. A ausência de impacto deste marcador nas três curvas de sobrevida pode ser consequência da baixa casuística, haja visto que existe uma nítida tendência de dissociação das curvas de SG e SCE entre pacientes não metastáticos com valores abaixo e acima da mediana da expressão de mRNA do BAP1.

Os estudos iniciais de sequenciamento foram capazes de mostrar a frequência de mutação do BAP1 nos casos de CCRcc, bem como, mostrar as correlações entre a presença destas mutações com fatores clássicos de mau prognóstico e piores curvas de sobrevida. No entanto, a análise por sequenciamento não é capaz de analisar os

casos onde o gene BAP1 possa sofrer algum tipo de silenciamento epigenético.

Buscando um outro ponto de vista sobre o BAP1, autores apresentaram estudos analisando a expressão proteica através de imunohistoquímica. Com uma casuística significativa, JOSEPH et al. (2013) analisou mais de 1300 pacientes com CCRcc classificados como baixo risco. Conforme o resultado da imunohistoquímica, os pacientes foram classificados como BAP1 nuclear negativos ou BAP1 nuclear positivos. Apesar do achado de aproximadamente 11% de BAP1 negativos ser compatível com estudos de mutação (5 a 15%), o autor mostrou a dificuldade de classificar um número expressivo de casos. Os casos duvidosos foram considerados como BAP1 heterogêneos ou BAP1 fraco reagente e ambos foram excluídos do estudo.

A análise por sequenciamento do gene BAP1 falha por não identificar possíveis silenciamentos epigenéticos do gene. Por sua vez, a análise da expressão proteica por imunohistoquímica pode apresentar dificuldades técnicas pré-analíticas, analíticas e pós-analíticas de classificação dos casos.

Em CCRcc, não é do nosso conhecimento estudos prévios de análise do mRNA do BAP1 através da técnica de RT-qPCR. Esta técnica é capaz de demonstrar a ausência de expressão gênica, seja devido à mutações truncadas ou por silenciamento epigenético.

A técnica de RT-qPCR pode apresentar falhas como: contaminação da amostra com DNA genômico; a amplificação de transcritos não específicos ou a medição de sinais inespecíficos por excesso de oligonucleotídeos iniciadores. Porém, são atualmente disponíveis vários recursos metodológicos que permitem detectar a eventual formação de moléculas espúrias, mantendo a alta qualidade nos

experimentos realizados, como realizado em nossas instituições.

Em nossa metodologia, após o tratamento da amostra com a enzima DNAase, a ausência do DNA genômico foi confirmada através do teste negativo pro gene GAPDH e pela ausência de amplificação de fragmentos em gel de agarose. Além disso, as sondas foram desenhadas para serem complementares ao transcrito de interesse na região delimitada pelos iniciadores, normalmente na junção entre dois éxons do transcrito, evitando assim amplificação por DNA genômico.

A presença de dois picos de amplificação, sugestiva de dímeros de *primers* foi especificamente interessante na análise do mRNA do BAP1. Somente após o ajuste da concentração dos primers *forward* e *reverse* foi possível uma curva de dissociação única, indicando a amplificação específica do gene de interesse.

Em nosso estudo, encontramos dificuldade para estratificar os pacientes em grupos de acordo com o grau de expressão do mRNA. Utilizamos os valores numéricos puros para fazermos as correlações com os fatores de mau prognóstico já estabelecidos e utilizamos os percentis destes valores para estratificar os grupos na confecção das curvas de sobrevida. A busca por novos métodos de agrupamento de pacientes de acordo com o valor da expressão gênica será importante para estudos futuros em nosso grupo.

Podemos até mesmo discutir qual o valor ideal de calibração, a partir do qual comparamos os demais valores. As amostras normais de nossa série representam o peritumoral não neoplásico de apenas 9 pacientes, que serviu de comparação com todos os 88 casos. Entretanto isso é prática comum e não nos parece necessário e economicamente viável investigar amostras não tumorais em uma grande série de pacientes.

Estudos que analisam o comportamento de um gene utilizando um método único estão sujeitos a erros nos resultados por problemas metodológicos. Entendendo-se que exista uma sequência de processos desde a presença de um gene até a expressão de seus produtos funcionais (mRNA e proteínas), futuros estudos devem buscar a análise de toda esta cadeia de processos, utilizando-se de diferentes técnicas biomoleculares na análise de um mesmo gene.

Nosso grupo já realizou estudo analisando a expressão do VHL, principal gene do CCRcc, em todas as etapas desde da transcrição quanto tradução. O sequenciamento revelou 35 novas mutações não descritas do VHL, incluindo os tipos: *missense*, *nonssense*, deleções e duplicações. Porém, a presença das mutações não foram concordantes com os resultados encontrados nas expressões gênicas e proteicas. Uma das possíveis explicações para esta não concordância pode ser por casos VHL positivos na imunohistoquímica com proteína produzida por alelo mutado e não do tipo selvagem. E a RT-qPCR pode não distinguir entre o mRNA normal ou um *splicing* alternativo (ALVES et al. 2014).

Nossa casuística demonstrou que o gene BAP1 novamente esteve associado à fatores de mau prognóstico já estabelecidos na literatura. A ausência de impacto significativo deste marcador nas curvas de sobrevida pode ser consequência da baixa casuística, haja visto que existe uma tendência de dissociação das curvas de SG e SCE entre pacientes não metastáticos com valores abaixo e acima da mediana do BAP1. Numa outra abordagem para analisar o desfecho clínico com os valores de expressão do BAP1, percebemos que, apesar dos grupos de pior desfecho apresentarem uma menor média de expressão do mRNA do BAP1, também não houve diferença estatisticamente significativa nos valores do mRNA entre os grupos:

vivos X mortos por cancer X mortos por outras causas e também entre os **sem recidiva X com recidiva**.

De acordo com a teoria da heterogeneidade tumoral proposta por GERLINGER et al. (2012), os eventos mutacionais em genes de remodelação de cromatina do cromossomo 3p podem ser eventos ramificadores e formadores de tronco de linhagens celulares heterogêneas dentro de um mesmo tumor.

Por se tratar de um estudo piloto, com limitadores de custo, este trabalho serviu para validar a importância do BAP1 como marcador tumoral e estimular a continuação da pesquisa deste, e de outros genes envolvidos na remodelação de cromatina, com uma maior casuística, com análises através de mais de um método biomolecular e, por fim, incluir um maior número possível destes genes para estudar suas frequências de inativação e as possíveis correlações entre eles. As correlações conhecidas até o momento, por ex: BAP1 e PBRM1, podem, no futuro, ajudar à montar um perfil genético de agressividade tumoral. Também, é importante a análise de diferentes microáreas tumorais e até mesmo metástases, em futuros estudos, respeitando-se o conceito da heterogeneidade tumoral.

Por ora já se encontra em andamento a análise imunohistoquímica do BAP -1 numa série de nossa instituição que inclui estes 88 casos e mais todos os casos em lâminas de TMA, visto que não depende de material em biobanco. De posse desses dados num futuro breve, poderemos entender melhor o desencadeamento biológico entre a transcrição e a expressão proteica deste gene.

6 CONCLUSÕES

- O mRNA do CD133 e do BAP -1 são menos expressos no CCRcc em comparação ao tecido renal não neoplásico.
- A baixa expressão do mRNA do CD133 se associou à presença de invasão tumoral da glândula adrenal.
- A expressão do CD133 não apresentou impacto nas curvas de SG, SCE ou SLD.
- A baixa expressão do mRNA do BAP1 se associa à fatores de mau prognóstico como: a ocorrência de tumores maiores (> 4cm), invasão de gordura perirrenal/seio renal e estadios patológicos avançados.
- Nas curvas de SG e SCE, os casos com baixa expressão de do mRNA do BAP1 apresentaram curvas inferiores de sobrevida, porém, sem impacto estatisticamente significativo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ACS] American Cancer Society. **Kidney cancer**. Available from: <URL:<http://www.cancer.org/cancer/kidneycancer/detailedguide/kidney-cancer-adult-key-statistics>> [2014 ago 12]

Alves MR, Carneiro FC, Lavorato-Rocha AM, et al. Mutational status of VHL gene and its clinical importance in renal clear cell carcinoma. **Virchows Arch** 2014 Jul 16. [Epub ahead of print]

Angeloni D. Molecular analysis of deletions in human chromosome 3p21 and the role of resident cancer genes in disease. **Brief Funct Genomic Proteomic** 2007; 6:19-39.

Artells R, Moreno I, Díaz T, et al. Tumour CD133 mRNA expression and clinical outcome in surgically resected colorectal cancer patients. **Eur J Cancer** 2010; 46:642-9.

Becker F, Siemer S, Kamradt J, Zwergel U, Stöckle M. Important aspects of organ-preserving surgery for renal tumors: indications, new standards, and oncological outcomes. **Dtsch Arztebl Int** 2009; 106:117-22.

Bidlingmaier S, Zhu X, Liu B. The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. **J Mol Med (Berl)** 2008; 86:1025-32.

Blom JH, van Poppel H, Maréchal JM; EORTC Genitourinary Tract Cancer Group. Radical nephrectomy with and without lymph-node dissection: final results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) randomized phase 3 trial 30881. **Eur Urol** 2009; 55:28-34.

Bongso A, Richards M. History and perspective of stem cell research. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** 2004; 18:827-42.

Brugarolas J. PBRM1 and BAP1 as novel targets for renal cell carcinoma. **Cancer J** 2013; 19:324-32.

Bruno S, Bussolati B, Grange C, et al. Isolation and characterization of resident mesenchymal stem cells in human glomeruli. **Stem Cells Dev** 2009; 18:867-80.

Buchhagen DL, Qiu L, Etkind P. Homozygous deletion, rearrangement and hypermethylation implicate chromosome region 3p14.3-3p21.3 in sporadic breast-cancer development. **Int J Cancer** 1994; 57:473-9.

Bui MH, Visapaa H, Seligson D, et al. Prognostic value of carbonic anhydrase IX and KI67 as predictors of survival for renal clear cell carcinoma. **J Urol** 2004; 171:2461-6.

Bussolati B, Bruno S, Grange C, et al. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. **Am J Pathol** 2005; 166:545-55.

Cairns P. Renal cell carcinoma. **Cancer Biomark** 2010; 9:461-73.

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

Chawla SN, Crispen PL, Hanlon AL, Greenberg RE, Chen DY, Uzzo RG. The natural history of observed enhancing renal masses: meta-analysis and review of the world literature. **J Urol** 2006; 175:425-31.

Corbeil D, Roper K, Hellwig A, et al. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. **J Biol Chem** 2000; 275:5512-20.

Corbeil D, Röper K, Fargeas CA, Joester A, Huttner WB. Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. **Traffic** 2001; 2:82-91.

da Costa WH. **Estudo do valor prognóstico e da expressão imuno-histoquímica das células-tronco tumorais, através do CD133 e CD44 em carcinoma de células renais**. São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

da Costa WH, Moniz RR, da Cunha IW, Fonseca FP, Guimaraes GC, de Cássio Zequi S. Impact of renal vein invasion and fat invasion in pT3a renal cell carcinoma. **BJU Int** 2012b; 109:544-8.

da Costa WH, Rocha RM, Cunha IW, Fonseca FP, Guimaraes GC, Zequi Sde C. CD133 immunohistochemical expression predicts progression and cancer-related death in renal cell carcinoma. **World J Urol** 2012a; 30:553-8.

da Costa WH, Rezende M, Carneiro FC, et al. Polybromo-1 (PBRM1), a SWI/SNF complex subunit is a prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. **BJU Int** 2014; 113:E157-63.

Dalgliesh GL, Furge K, Greenman C, et al. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. **Nature** 2010; 463:360–3.

Dall'Oglio MF, Antunes AA, Sarkis AS, et al. Microvascular tumour invasion in renal cell carcinoma: the most important prognostic factor. **BJU Int** 2007a; 100:552-5.

D'Alterio C, Cindolo L, Portella L, et al. Differential role of CD133 and CXCR4 in renal cell carcinoma. **Cell Cycle** 2010; 9:4492-500.

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

de Martino M, Klatte T, Seligson DB, et al. CA9 gene: single nucleotide polymorphism predicts metastatic renal cell carcinoma prognosis. **J Urol** 2009; 182:728-34.

Delahunt B, Kittelson JM, McCredie MR, Reeve AE, Stewart JH, Bilous AM. Prognostic importance of tumor size for localized conventional (clear cell) renal cell carcinoma: assessment of TNM T1 and T2 tumor categories and comparison with other prognostic parameters. **Cancer** 2002; 94:658-64.

Delahunt B, Eble JN. Papillary renal cell carcinoma. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. *Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs*. 2004. p.27-9.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. *AJCC cancer staging manual*. 7^a ed. New York: Springer-Verlag; 2010. Kidney; p.479-89.

Egger SE, Yossepowith O, Petrus JA, Snyder ME, Motzer RJ, Russo P. Renal cell carcinoma recurrence after nephrectomy for localized disease: predicting survival from time of recurrence. **J Clin Oncol** 2006; 24:3101-6.

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

Escudier B, Eisen T, Stadler WM, et al. Sorafenib for treatment of renal cell carcinoma: Final efficacy and safety results of the phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial. **J Clin Oncol** 2009; 27:3312-8.

Ferreira DB, Zequi SC, da Costa WH, et al. Use of the American Society of Anesthesiologists Classification as an additional planning tool for renal cell carcinoma assessment. **J Cancer Ther** 2013; 4:7-14.

Ficarra V, Secco S, Fracalanza S, et al. Expanding indication for elective nephron-sparing surgery in renal cell carcinoma. **Arch Ital Urol Androl** 2009; 81:86-90.

Florek M, Haase M, Marzesco AM, et al. Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. **Cell Tissue Res** 2005; 319:15-26.

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

Frank I, Blute ML, Leibovich BC, Cheville JC, Lohse CM, Zincke H. Independent validation of the 2002 American Joint Committee on cancer primary tumor classification for renal cell carcinoma using a large, single institution cohort. **J Urol** 2005; 173:1889-92.

Fuhrman AS, Lasky LC, Limas C. prognostic significance of morphological parameters in renal cell carcinomas. **Am J Surg Pathol** 1982; 6:655-63.

Galfano A, Novara G, Iafrate M, et al. Mathematical models for prognostic prediction in patients with renal cell carcinoma. **Urol Int** 2008; 80:113-23.

Gangemi R, Paleari L, Orengo AM, et al. Cancer stem cells: A new paradigm for understanding tumor growth and progression and drug resistance. **Curr Med Chem** 2009; 16:1688-703.

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. **N Engl J Med** 2012; 366:883-92.

Goel RK, Kaouk JH. Probe ablative treatment for small renal masses: cryoablation vs. radio frequency ablation. **Curr Opin Urol** 2008; 18:467-73.

Goldstein NS. The current state of renal cell carcinoma grading: Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). **Cancer** 1997; 80:977-80.

Guo G, Gui Y, Gao S, et al. Frequent mutations of genes encoding ubiquitin-mediated proteolysis pathway components in clear cell renal cell carcinoma. **Nature Genet** 2012; 44:17–9.

Gupta K, Miller JD, Li JZ, Russell MW, Charbonneau C. Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): a literature review. **Cancer Treat Rev** 2008; 34:193-205.

Hakimi AA, Chen YB, Wren J, et al. Clinical and pathologic impact of select chromatin-modulating tumor suppressors in clear cell renal cell carcinoma. **Eur Urol** 2013; 63:848-54

Harbour JW, Onken MD, Roberson ED, et al. Frequent mutation of *BAP1* in metastasizing uveal melanomas. **Science** 2010; 330:1410-3.

Hermann PC, Huber SL, Herrier T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determines tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. **Cell Stem Cell** 2007; 1:313-23.

Hofbauer SL, de Martino M, Seemann C, et al. Associations between presenting symptoms, clinicopathological parameters, and prognosis in a contemporary series of patients with renal cell carcinoma. *Korean J Urol* 2014; 55:505-10.

Horn PJ, Peterson CL. Molecular biology: chromatin higher order folding--wrapping up transcription. *Science* 2002; 297:1824-7.

Horst D, Kriegel L, Engel L, Kirchner T, Jung A. Prognostic significance of cancer stem cell markers CD133, CD44 and CD166 in colorectal cancer. *Cancer Invest* 2009; 22:1.

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

Jensen DE, Rauscher FJ 3rd. Defining biochemical functions for the BRCA1 tumor suppressor protein: analysis of the BRCA1 binding protein BAP1. *Cancer Lett* 1999; 143:S13-S17.

Joseph RW, Kapur P, Serie DJ, et al. Loss of BAP1 protein expression is an independent marker of poor prognosis in patients with low-risk clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 2014; 120:1059-67.

Kallakury BV, Karikehalli S, Haholu A, Sheehan CE, Azumi N, Ross JS. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7:3113-9.

Kanao K, Mizuno R, Kikuchi E, et al. Preoperative prognostic nomogram (probability table) for renal cell carcinoma based on TNM classification. *J Urol* 2009; 181:480-5.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J Am Statist Assoc** 1958; 53:457-81.

Kapur P, Peña-Llopis S, Christie A, et al. Effects on survival of BAP1 and PBRM1 mutations in sporadic clear-cell renal-cell carcinoma: a retrospective analysis with independent validation. **Lancet Oncol** 2013; 14:159-67.

Karnofsky DA, Burchenal JH. Present status of clinical cancer chemotherapy. **Am J Med** 1950; 8:767-88.

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

Kemper K, Sprick MR, de Bree M, et al. The AC133 Epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. **Cancer Res** 2010; 70:719-29.

Kim K, Ihm H, Ro JY, Cho YM. High-level expression of stem cell marker CD133 in clear cell renal cell carcinoma with favorable prognosis. **Oncol Lett** 2011; 2:1095-100.

Klatte T, Patard JJ, de Martino M, et al. Tumor size does not predict risk of metastatic disease or prognosis of small renal cell carcinomas. **J Urol** 2008; 179:1719-26.

Kristie TM, Liang Y, Vogel JL. Control of herpesvirus IE gene expression by HCF-1 coupled chromatin modification activities. **Biochim Biophys Acta** 2010; 1799:257-65.

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

Lam JS, Leppert JT, Figlin RA, Belldegrun AS. Role of molecular markers in the diagnosis and therapy of renal cell carcinoma. **Urology** 2005; 66(5 Suppl):1-9.

Liang Y, Vogel JL, Narayanan A, Peng H, Kristie TM. Inhibition of the histone demethylase LSD1 blocks alpha-herpesvirus lytic replication and reactivation from latency. **Nat Med** 2009; 15:1312-7.

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

Lopez-Beltran A, Carrasco JC, Cheng L, Scarpelli M, Kirkali Z, Montironi R. 2009 update on the classification of renal epithelial tumors in adults. **Int J Urol** 2009; 16:432-43.

Machida YJ, Machida Y, Vashisht AA, Wohlschlegel JA, Dutta A. The deubiquitinating enzyme BAP1 regulates cell growth via interaction with HCF-1. **J Biol Chem** 2009; 284:34179-88.

Mani A, Gelmann EP. The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. **J Clin Oncol** 2005; 23:4776-89.

Marchiò C, Dowsett M, Reis-Filho JS. Revisiting the technical validation of tumour biomarker assays: how to open a Pandora's box. **BMC Med** 2011; 9:4.

Margulis V, McDonald M, Tamboli P, Swanson DA, Wood CG. Predictors of oncological outcome after resection of locally recurrent renal cell carcinoma. **J Urol** 2009; 181:2044-51.

Maw MA, Corbeil D, Koch J, et al. A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration. **Hum Mol Genet** 2000; 9:27-34.

Millet I, Curros F, Serre I, Taourel P, Thuret R. Can renal biopsy accurately predict histological subtype and Fuhrman grade of renal cell carcinoma? **J Urol** 2012; 188:1690-4.

Mizrak D, Brittan M, Alison MR. CD133: molecule of the moment. **J Pathol** 2008; 214:3-9.

Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. **Nature** 2006; 441:1068-74.

Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2002; 20:289-96.

Motzer RJ, Bacik J, Schwartz LH, et al. Prognostic factors for survival in previously treated patients with metastatic renal cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2004; 22:454-63.

Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. **Lancet** 2008; 372:449-56.

Nardi AC, Zequi SC, Clark OA, Almeida JC, Glina S. Epidemiologic characteristics of renal cell carcinoma in Brazil. **Int Braz J Urol** 2010; 36:151-7.

Page RB, Stromberg AJ. Linear methods for analysis and quality control of relative expression ratios from quantitative real-time polymerase chain reaction experiments. **ScientificWorldJournal** 2011; 11:1383-93.

Pantuck AJ, Seligson DB, Klatte T, et al. Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy. **Cancer** 2007; 109:2257-67.

Patard JJ, Kim HL, Lam JS, et al. Use of the University of California Los Angeles integrated staging system to predict survival in renal cell carcinoma: an international multicenter study. **J Clin Oncol** 2004; 22:3316-22.

Peña-Llopis S, Vega-Rubín-de-Celis S, Liao A, et al. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. **Nat Genet** 2012; 44:751-9.

Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Scholer H. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. **Mech Dev** 1998; 71:89-98.

Rankin EB, Tomaszewski JE, Haase VH. Renal cyst development in mice with conditional inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. **Cancer Res** 2006; 66:2576-83.

Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. **Nature** 2007; 445:111-5.

Rini BI, Jaeger E, Weinberg V, et al. Clinical response to therapy targeted at vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: impact of patient characteristics and Von Hippel-Lindau gene status. **BJU Int** 2006; 98:756-62.

Rioux-Leclercq N, Turlin B, Bansard J, et al. Value of immunohistochemical Ki-67 and p53 determinations as predictive factors of outcome in renal cell carcinoma. **Urology** 2000; 55:501-5.

Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. **J Urol** 1969; 101:297-301.

Röper K, Corbeil D, Huttner WB. Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. **Nat Cell Biol** 2000; 2:582-92.

Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, et al. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. **J AM Soc Nephrol** 2006; 17:2443-56.

Sandlund J, Oosterwijk E, Grankvist K, Oosterwijk-Wakka J, Ljungberg B, Rasmuson T. Prognostic impact of carbonic anhydrase IX expression in human renal cell carcinoma. **BJU Int** 2007; 100:556-60.

Sanduja S, Dixon DA. Tristetraprolin and E6-AP: Killing the messenger in cervical cancer. **Cell Cycle** 2010; 9:3135-6.

Scheuermann JC, de Ayala Alonso AG, Oktaba K, et al. Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. **Nature** 2010; 465:243-7.

Schraml P, Struckmann K, Hatz F, et al. VHL mutations and their correlation with tumour cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. **J Pathol** 2002; 196:186-93.

Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. **Crit Rev Oncol Hematol** 2004; 51:1-28.

Sengupta S, Lohse CM, Leibovich BC, et al.: Histologic coagulative tumor necrosis as a prognostic indicator of renal cell carcinoma aggressiveness. **Cancer** 2005; 104:511-20.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature** 2004, 432:396-401.

Sivanand S, Peña-Llopis S, Zhao H, et al. A validated tumorgraft model reveals activity of dovitinib against renal cell carcinoma. **Sci Transl Med** 2012; 4:137ra75.

Smith ER, Cayrou C, Huang R, Lane WS, Côté J, Lucchesi JC. A human protein complex homologous to the *Drosophila* MSL complex is responsible for the majority of histone H4 acetylation at lysine 16. **Mol Cell Biol** 2005; 25:9175-88.

Smith LM, Nesterova A, Ryan MC, et al. CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers. **Br J Cancer** 2008; 99:100-9.

Takashi M, Nakano Y, Sakata T, Miyake K, Hamajima N. Multivariate evaluation of prognostic determinants for renal cell carcinoma. **Urol Int** 1993; 50:6-12.

Teloken PE, Thompson RH, Tickoo SK, et al. Prognostic impact of histological subtype on surgically treated localized renal cell carcinoma. **J Urol** 2009; 182:2132-6.

Testa JR, Cheung M, Pei J, Below JE, et al. Germline *BAP1* mutations predispose to malignant mesothelioma. **Nat Genet** 2001; 43:1022-5.

Thompson RH, Leibovich BC, Cheville JC, et al. Is renal sinus fat invasion the same as perinephric fat invasion for pT3a renal cell carcinoma? **J Urol** 2005; 174:1218-21.

Tilki D, Hu B, Nguyen HG, et al. Impact of synchronous metastasis distribution on cancer-specific survival in renal cell carcinoma after radical nephrectomy with tumor thrombectomy. **J Urol** 2014 Jul 22. [Epub ahead of print]

Toma MI, Grosser M, Herr A, et al. Loss of heterozygosity and copynumber abnormality in clear cell renal cell carcinoma discovered by high-density affymetrix 10K single nucleotide polymorphism map-ping array. **Neoplasia** 2008; 10:634-42.

Tsui KH, Shvarts O, Smith RB, Figlin R, de Kernion JB, Belldegrun A. Renal cell carcinoma: prognostic significance of incidentally detected tumors. **J Urol** 2000; 163:426-30.

Van Poppel H, Vandendriessche H, Boel K, et al. Microscopic vascular invasion is the most relevant prognosticator after radical nephrectomy for clinically nonmetastatic renal cell carcinoma. **J Urol** 1997; 158:45-9.

Varela I, Tarpey P, Raine K, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. **Nature** 2011; 469:539-42.

Ventii KH, Devi NS, Friedrich KL, et al. BRCA1-associated protein-1 is a tumor suppressor that requires deubiquitinating activity and nuclear localization. **Cancer Res** 2008; 68:6953-62.

Von Roemeling CA, Marlow LA, Radisky DC, et al. Functional genomics identifies novel genes essential for clear cell renal cell carcinoma tumor cell proliferation and migration. **Oncotarget** 2014; 5:5320-34.

Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. **Proc Natl Acad Sci** 1997; 94:12425-30.

Woldrich JM, Mallin K, Ritchey J, Carroll PR, Kane CJ. Sex differences in renal cell cancer presentation and survival: an analysis of the National Cancer Database, 1993-2004. **J Urol** 2008; 179:1709-13.

Wu XZ. Origin of cancer stem cells: the role of self-renewal and differentiation. **Ann Surg Oncol** 2008; 15:407-14.

Wu Y, Wu PY. CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. **Stem Cells Dev** 2009; 18:1127-34.

Wunsch-Filho V. Insights on diagnosis, prognosis and screening of renal cell carcinoma. **Sao Paulo Med J** 2002; 120:163-4.

Yao M, Yoshida M, Kishida T, et al. VHL tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 2002; 94:1569-75.

Yoshimizu T, Sugiyama N, De Felice M, et al. Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescentprotein (GFP) transgene in mice. **Dev Growth Differ** 1999; 41:675-84.

Yu H, Mashtalir N, Daou S, et al. The ubiquitin carboxyl hydrolase BAP1 forms a ternary complex with YY1 and HCF-1 and is a critical regulator of gene expression. **Mol Cell Biol** 2010; 30:5071-85.

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

Zequi SC. **Estudo da expressão imuno-histoquímica e do valor prognóstico de sintases do óxido nítrico, metaloproteases da matriz extracelular, VEGF, caderina E, densidade de microvasos e de vasos linfáticos em pacientes portadores de carcinoma de células renais.** São Paulo; 2008. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Zigeuner R, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Langner C. Value of p53 as a prognostic marker in histologic subtypes of renal cell carcinoma: a systematic analysis of primary and metastatic tumor tissue. **Urology** 2004; 63:651-5.

Anexo 1 – Ficha de Levantamento de dados

Nome: _____

Registro: _____ **Lâmina:** _____ **Data de
admissão:** _____

Idade (anos): _____ **Raça:** (1) Branco (2) Não branco **Sexo:** (1)

Masculino (2) Feminino **Tabagismo:** (1) Fumante (2) Não fumante (9) Ignorado

“Packyear”: (0) Ignorado (1) 1-10 Packyears (2) 11-20 Packyears (3) >20 Packyears

ECOG: (0) 0 (1) 1 (2) 2

ASA: (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4 **Sintomas:** (0) Ausência (1) Hematuria (2) Dor lombar (3)

Emagrecimento (4) Febre (5) Outros (6) Massa palpável (9) Ignorado

Tempo de Evolução (meses): _____

Tumor incidental: (0) Sim (1) Não

Metástase ao diagnóstico: (0) Não (1) Sim

Tumor Familiar: (0) Não (1) Sim

Nº de Familiares: (0) 0 (1) 1 (2) 2

Hemoglobina: _____ **Hematócrito:** _____

Cirurgia: (1) Radical (2) Parcial

Incisão: (1) Abdominal (2) Lobotomia

Ressecção: (0) Irressecável (1) Ressecção total (2) Margem microscópica (3)

Margem macroscópica

Tempo de Cirurgia: _____

Data da Cirurgia: _____ **Transfusão:** (0) Não (1) Sim

Volume de transfusão: _____

Complicações Precoces: (0) Não (1) Insuficiência renal aguda (2) Íleo paralítico (3)

Infecção (4) Cardiovascular (5) Tromboembolismo (6) Fistula urinaria (7)

Hemorragia (9) Outras

Internação (dias): _____ **Complicações Tardias:** (0) Não (1)

Insuficiência renal aguda (2) Suboclusão intestinal (3)

Parede abdominal **Estádio T:** (1) T1a **Estádio N:** (0) N0 **TNM:** (1) TN0M0

Nº de Linfonodos: _____ **Nº de Linfonodos +:**

_____ **Estádio Robson:** (1) I (2) II (3) IIIa (4) IIIb (5) IIIc (6) IV

Estádio clínico: (1) I (2) II (3) III (4) IV **Grau de Fuhrman:** (1) I (2) II (3) III (4) IV

Tipo Histológico: (1) Células claras (2) Papilífero (3) Cromóforo (4) TTE3 Gene (5) Ductos coletores (6) Inclassificável (7) Outros

Diâmetro tumoral (cm): _____ **Lateralidade:** (1) Direito (2)

Esquerdo (3) Bilateral **Tumor bilateral:** (0) Não (1) Sincrônico (2) Metacrônico

Multifocal: (0) Não (1) Sim **Topografia:** (1) Pólo superior (2) Pólo médio (3) Pólo inferior (4) Mais de um pólo **Invasão vascular:** (0) Não (1) Sim **Invasão vascular**

linfática: (0) Não (1) Sim **Invasão de veia renal:** (0) Não (1) Sim **Invasão de veia cava:** (0) Não (1) Sim **Invasão de pelve e/ou ureter:** (0) Não (1) Sim

(4) Hipertensão arterial sistêmica (6)) Outras (2) T1b (3) T2 (4) T3a (5) T3b (6) T3c (7) T4

(1) N1 (2) N2 (3) Nx (2) TN+M0 (3) TN0M+ (4) TN+M+

Invasão de gordura: (0) Não (1) Sim

Necrose tumoral: (0) Não (1) Sim

Invasão de Adrenal: (0) Não (1) Sim

Falha: (0) Não (1) Sim **Data da falha:** _____

Falha: (0) Não (1) Local (2) Pulmão (3) Osso (4) Fígado (5) SNC (7) Outro

Tratamento: (0) Não (1) Cirurgia (2) Radioterapia (3) Cirurgia + RT Imunoterapia + quimioterapia (6) Outro (7) Quimioterapia (8) Inibidor tirosina quinase

Data da última consulta: _____ **Status:** (1) Vivo sem doença (2) Vivo com doença (3) Morte outras causas (5) Morte por câncer

(6) Perda de vista **Óbito:** (1) Sim (2) Não **Sobrevida global (meses):** _____

Sobrevida livre de doença (meses): _____ **Seguimento atualizado (meses):**

Anexo 2 – Estadiamento TMN (2010 – 7ª edição)

KIDNEY STAGING FORM						
CLINICAL <i>Extent of disease before any treatment</i>		STAGE CATEGORY DEFINITIONS			PATHOLOGIC <i>Extent of disease through completion of definitive surgery</i>	
☐ y clinical – staging completed after neoadjuvant therapy but before subsequent surgery		TUMOR SIZE: _____			LATERALITY: ☐ left ☐ right ☐ bilateral	
		PRIMARY TUMOR (T)				
☐ TX ☐ T0 ☐ T1 ☐ T1a ☐ T1b ☐ T2 ☐ T2a ☐ T2b ☐ T3 ☐ T3a ☐ T3b ☐ T3c ☐ T4		Primary tumor cannot be assessed No evidence of primary tumor Tumor 7 cm or less in greatest dimension, limited to the kidney Tumor 4 cm or less in greatest dimension, limited to the kidney Tumor more than 4 cm but not more than 7 cm in greatest dimension limited to the kidney Tumor more than 7 cm in greatest dimension, limited to the kidney Tumor more than 7 cm but less than or equal to 10 cm in greatest dimension, limited to the kidney Tumor more than 10 cm, limited to the kidney Tumor extends into major veins or perinephric tissues but not into the ipsilateral adrenal gland and not beyond Gerota's fascia Tumor grossly extends into the renal vein or its segmental (muscle containing) branches, or tumor invades perirenal and/or renal sinus fat but not beyond Gerota's fascia Tumor grossly extends into the vena cava below the diaphragm Tumor grossly extends into the vena cava above the diaphragm or invades the wall of the vena cava Tumor invades beyond Gerota's fascia (including contiguous extension into the ipsilateral adrenal gland)			☐ TX ☐ T0 ☐ T1 ☐ T1a ☐ T1b ☐ T2 ☐ T2a ☐ T2b ☐ T3 ☐ T3a ☐ T3b ☐ T3c ☐ T4	
☐ NX ☐ N0 ☐ N1		REGIONAL LYMPH NODES (N)			☐ NX ☐ N0 ☐ N1	
☐ M0 ☐ M1		DISTANT METASTASIS (M)			☐ M1	
ANATOMIC STAGE • PROGNOSTIC GROUPS						
CLINICAL				PATHOLOGIC		
GROUP	T	N	M	GROUP	T	N
☐ I	T1	N0	M0	☐ I	T1	N0
☐ II	T2	N0	M0	☐ II	T2	N0
☐ III	T1 or T2	N1	M0	☐ III	T1 or T2	N1
	T3	N0 or N1	M0		T3	N0 or N1
☐ IV	T4	Any N	M0	☐ IV	T4	Any N
	Any T	Any N	M1		Any T	Any N
☐ Stage unknown				☐ Stage unknown		

Anexo 3 – Carta de aprovação da Comissão de Ética e Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center (CEP)



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 25 de abril de 2013.

Ao
Dr. Stênio de Cássio Zequi.

Aluno: Deusdedit Cortez Vieira da Silva Neto (Mestrado).

**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1712/12
“Análise do valor da expressão de RNA mensageiro dos genes CD133 e do BAP1 como
fatores prognósticos no carcinoma de células renais”.**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 23/04/2013, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 11/12/2012, **aprovaram** a realização do projeto do estudo (datado de 26 de março de 2013) em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas pelo Biobanco do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Urologia do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Urologia do Hospital AC Camargo;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**