

**ANÁLISE DO PERFIL DE MRNAS DIFERENCIALMENTE  
TRADUZIDOS NO CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS**

**JULIA AVIAN VASSALAKIS**

**Tese apresentada à Fundação Antonio Prudente para obtenção  
do título de Doutora em Ciências**

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra. Glauca Noeli Maroso Hajj**

**São Paulo  
2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Vassalakis, Julia Avian.

**Análise do perfil de mRNAs diferencialmente traduzidos no carcinoma renal de células claras** / Julia Avian Vassalakis – São Paulo, 2022.  
138f.

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

Orientadora: Glauca Noeli Maroso Hajj

1. Carcinoma de Células Renais de Células Claras. 2. Perfil da Expressão Gênica. 3. Modificação Traducional de Proteínas. 4. Proteína Supressora de Tumor Von Hippel-Lindau.

CDU 616

*“Não há sem dúvida, no gênero humano, um só indivíduo que seja sábio a todo momento e desprovido de qualquer espécie de loucura.”*

*- Erasmo de Rotterdam*

*Dedico este trabalho a todos os pacientes que permitiram o uso de suas informações clínicas e amostras biológicas para este estudo.*

## **AGRADECIMENTOS**

A todos os funcionários e ex-funcionários da Secretaria de Pós-Graduação do AC Camargo Cancer Center pelo suporte total em todos os momentos.

A todos os pesquisadores do CIPE, em especial a minha orientadora Dra Glaucia Hajj por me receber em seu grupo e confiar na minha capacidade, por todo suporte oferecido e por todo conhecimento repassado.

A Dra. Stephania Martins Bezerra do Departamento de Anatomia Patológica do AC Camargo Cancer Center por sempre me receber da melhor forma possível, pela dedicação e pela contribuição em diversas etapas deste projeto.

Ao Dr. Stenio Zequi do Departamento de Urologia do AC Camargo Cancer Center por fornecer a maior parte dos dados dos prontuários dos pacientes.

A Ana Paula Mitsue e Louise Mota do Biobanco do AC Camargo Cancer Center pela extrema eficiência em atender as inúmeras demandas deste projeto.

A Lais Takata Walter e Severino da Silva Ferreira da Facility de Imunohistoquímica do AC Camargo Cancer Center.

A todos os funcionários e ex-funcionários do CIPE, em especial Graziela Spilborghs, Ester Pereira, Gilmara Santos, Julia Cassim e Danilo Neiges pelo apoio diário.

A todos os amigos, colegas e ex-colegas do Laboratório de Biologia Tumoral e Biomarcadores, em especial Fernanda Ferreira, Barbara de Bellis, Dimas Pontes, Fernanda Lupinacci, Adriano Oliveira, Danielle Nascimento, Matheus Lima, Hermano Bellato, Bianca Troncarelli, Emne Abdallah e Denise Yamashita. Serão sempre as melhores lembranças que vou levar desses anos.

Ao Sandro Zavata por ser meu ombro amigo diário, por me ajudar a superar as piores fases e comemorar cada mínima vitória minha como se fosse sua.

A minha mãe Irene Avian, pelo amor incondicional, segurança e paciência; e minhas irmãs Barbara Avian e Priscylla Avian, por confiarem tanto em mim e por me ensinarem sempre a ver o mundo de outras formas. Não tem nada na vida que eu queira preservar mais do que vocês!

## **SUORTE À PESQUISA POR AGÊNCIAS DE FOMENTO**

Este trabalho recebeu apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através do auxílio à pesquisa 2018/17796-6, e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Oncogenômica (INCiTO) do A.C. Camargo Cancer Center.

## RESUMO

Vassalakis JA. **Análise do perfil de mRNAs diferencialmente traduzidos no carcinoma renal de células claras.** [Tese] São Paulo; Fundação Antonio Prudente; 2022.

O carcinoma renal de células claras (CRCC) é o tipo de neoplasia renal com maior incidência, cerca de 80%. A maioria dos casos são curados após cirurgia, porém, cerca de um terço dos pacientes apresentam recidiva da doença com metástase à distância. O tratamento para este tumor evoluiu muito nas últimas duas décadas, entretanto, pacientes metastáticos ainda apresentam baixas taxas de resposta aos tratamentos devido a resistência adquirida pelo tumor para escapar da terapia alvo. Identificar os mecanismos moleculares associados à carcinogênese do CRCC é essencial para entender as características tumorais que estão associadas a progressão da doença e resistência aos tratamentos. Entre as alterações mais frequentes no CRCC está a perda do gene VHL, um supressor tumoral e principal regulador da resposta à hipóxia. VHL tem dois principais alvos, o fator induzido por hipóxia  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ) e o fator induzido por hipóxia  $\alpha$  (HIF- $2\alpha$ ). Em normóxia, VHL é responsável pela degradação das subunidades de HIF. Em hipóxia, VHL deixa de reconhecer e marcar HIF- $1\alpha$  e HIF- $2\alpha$  para degradação e, uma vez estabilizadas, ativam vias de sinalização associadas a sobrevivência celular. As informações sobre alterações encontradas em tumores normalmente são estudadas a partir do sequenciamento da população total de mRNAs, oferecendo uma visão do transcriptoma. Nossa abordagem metodológica coleta e analisa apenas a população de mRNAs ativamente traduzidos, oferecendo uma visão mais próxima da expressão proteica final. A via de mTOR regula o início da tradução de mRNAs e está frequentemente mutada em CRCC. A hipóxia afeta a expressão de genes tanto via transcrição quanto via tradução. Alterações no controle traducional em CRCC afetam a expressão gênica contribuindo para a formação do tumor e progressão da doença. Assim, nosso objetivo principal foi identificar o perfil de genes diferencialmente traduzidos dependendo do status de VHL e da via de mTOR. Para isso utilizamos um modelo celular de CRCC deficiente em VHL e sua contraparte onde VHL foi restituído. Realizamos o perfil polissomal em modelos celulares de CRCC para separar e coletar a população de mRNAs ativamente traduzidos que foram posteriormente sequenciados. Nossos dados mostraram perfis distintos de tradução entre as células VHL-

deficientes e VHL-proficientes. Além disso, após a inibição de mTOR, ambas as células também apresentaram respostas diferentes ao tratamento. Além disso, observamos alterações na resposta imune e aumento do ciclo celular na ausência de VHL, que podem contribuir para a progressão tumoral. Em modelo com tecido tumoral congelado, nossos resultados parciais indicam que alterações na tradução global podem interferir principalmente no estadiamento clínico de pacientes com CRCC. Por fim, também analisamos a expressão de HIF-2 $\alpha$ , um dos alvos de VHL, em tecidos de pacientes com CRCC. Nossos resultados mostram que HIF-2 $\alpha$  pode ser utilizado na estratificação de pacientes com maior risco de recidiva, dependendo do estadiamento clínico.



## ABSTRACT

Vassalakis JA. **Analysis of differentially translated mRNA profile in clear cell renal cell carcinoma.** [Thesis] São Paulo; Fundação Antonio Prudente; 2022.

Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is the most common type of renal neoplasia with 80% of incidence. Most cases are cured after surgery, however, one third of all patients will have disease recurrence with distant metastasis. ccRCC treatment had evolved in the past two decades, however, metastatic patients still have low response rates due to tumor resistance. The identification of molecular mechanisms associated with ccRCC carcinogenesis is essential to understand the characteristics associated with disease progression and treatment resistance. The most frequent alteration in ccRCC is the loss of VHL gene, a tumor suppressor and the main regulator in response to hypoxia. VHL has two main target, hypoxia-induced factor 1  $\alpha$  (HIF-1  $\alpha$ ) and hypoxia-induced factor  $\alpha$  (HIF-2  $\alpha$ ). In normoxic conditions, VHL can lead HIF subunits to degradation. In hypoxia, HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  stabilize and activate cell survival associated signaling pathways. Studies about tumor alterations usually provides a view of the transcriptome. Our approach is based on the actively translated mRNAs collection and analysis, which provides a closer view from protein expression. mTOR pathway regulates translation initiation and is frequently mutated in ccRCC. Hypoxia affects gene expression in both transcriptional and translational regulation. Alteration in translational control in ccRCC affect gene expression which contributes to tumor progression. Our main objective was to identify the differentially translated gene profile depending on VHL status and mTOR pathway activation. To assess this, we used a VHL-deficient and a VHL-proficient ccRCC cell line. We used the polysome profiling technique to separate and collect the population of mRNAs actively translated that were subsequently sequenced. Our data showed distinct translation profiles between VHL-deficient and VHL-proficient cells. In addition, after mTOR inhibition, both cells showed different responses to treatment. We observed changes in immune response and increased cell cycle pathways in VHL deficient cells, which may contribute to tumor progression. In tumor tissue, our polysome profiling analysis indicate that changes in global translation may interfere in clinical staging of ccRCC patients. Finally, we analyzed the

expression of HIF-2 $\alpha$ , a VHL target, in ccRCC patient's tissues. Our results showed that HIF-2 $\alpha$  can distinct patients at higher recurrence risk depending on clinical staging.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características macroscópicas e histológicas do CRCC. ....	5
Figura 2. Alterações genéticas na via de sinalização de PI3K/AKT/mTOR em CRCC. ....	9
Figura 3. Via de sinalização de PI3K/AKT/mTOR. ....	11
Figura 4. Início da tradução de mRNAs em células eucariotas. ....	13
Figura 5. Polirribossomo ou polissomos. ....	16
Figura 6. Tratamentos utilizados para avaliar proteínas da via de mTOR e HIF-1 $\alpha$ . ....	20
Figura 7. Representação dos dois diferentes tipos de gradientes utilizados para o perfil polissomal de células e amostras tumorais de pacientes. ....	22
Figura 8. Perfil polissomal e quantificação da taxa de tradução das linhagens celulares de CRCC. ....	38
Figura 9. Expressão e fosforilação de proteínas da via de mTOR em células renais. ....	39
Figura 10. Perfil polissomal de linhagens celulares de CRCC após tratamento com rapamicina. ....	41
Figura 11. Taxa de tradução global das linhagens celulares de CRCC. ....	42
Figura 12. Curva de crescimento das linhagens celulares de CRCC. ....	43
Figura 13. Expressão de VHL nas linhagens celulares de CRCC. ....	44
Figura 14. Número de leituras obtidas pelo sequenciamento. ....	45
Figura 15. Análise de componente principal (PCA). ....	46
Figura 16. Visão geral das alterações nas células deficientes em VHL reguladas via translation. ....	48
Figura 17. Visão geral das alterações nas células deficientes em VHL reguladas via buffering. ....	49
Figura 18. Transição entre os modos de regulação gênica nas células deficientes em VHL. ...	50

Figura 19. Visão geral das alterações nas células com VHL restituído reguladas via translation. ....	51
Figura 20. Visão geral das alterações nas células com VHL restituído reguladas via buffering após uso prolongado de soro. ....	52
Figura 21. Vias enriquecidas nas células deficientes em VHL. ....	54
Figura 22. Vias enriquecidas nas células com VHL restituído. ....	55
Figura 23. Alterações nos diferentes modos de expressão gênica nas linhagens celulares de CRCC. ....	56
Figura 24. Vias enriquecidas nas células RCC4/Mock em comparação com as células RCC4/VHL após tratamento apenas com SFB por 2h. ....	58
Figura 25. Vias enriquecidas nas células RCC4/Mock em comparação com as células RCC4/VHL após tratamento apenas com SFB por 16h. ....	59
Figura 26. Alterações nos modos de regulação gênica após tratamento com rapamicina por 2h. ....	60
Figura 27. Alterações nos modos de regulação gênica após tratamento com rapamicina por 16h. ....	61
Figura 28. Vias enriquecidas nas células deficientes em VHL após inibição de mTORC1. ....	62
Figura 29. Vias enriquecidas nas células com VHL após inibição de mTORC1 por 2h. ....	63
Figura 30. Vias enriquecidas nas células com VHL após inibição de mTORC1 por 16h. ....	63
Figura 31. Análise de redes baseadas em topologia (NTA) em células deficientes em VHL. ..	64
Figura 32. Análise de redes baseadas em topologia (NTA) em células com VHL. ....	65
Figura 33. Análise de redes baseadas em topologia (NTA) up-reguladas nas células deficientes em VHL em comparação com as células com VHL restituído. ....	66
Figura 34. Análise de redes baseadas em topologia (NTA) down-reguladas nas células deficientes em VHL em comparação com as células com VHL restituído. ....	67
Figura 35. Análise de redes baseadas em topologia (NTA) down-reguladas nas células RCC4 após inibição de mTORC1. ....	68

Figura 36. Análise de redes baseadas em topologia (NTA) up-reguladas nas células RCC4/Mock após inibição de mTORC1.....	68
Figura 37. Expressão de HIF-1 $\alpha$ em linhagens celulares de CRCC.....	70
Figura 38. Perfil polissomal das linhagens celulares de CRCC após tratamento com cloreto de cobalto.....	71
Figura 39. Expressão de HIF-1 $\alpha$ e fosforilação de rpS6 em linhagens celulares de CRCC. ....	72
Figura 40. Expressão e quantificação de HIF-2 $\alpha$ e GLUT-1 em linhagens celulares de CRCC. .	73
Figura 41. Expressão de HIF-1 $\alpha$ , da via de ERK e da via de mTOR em PDX. ....	75
Figura 42. Perfil polissomal e taxa traducional de PDX. ....	76
Figura 43. Perfil polissomal de amostras tumorais de pacientes com CRCC. ....	79
Figura 44. Taxas de tradução global dos pacientes com CRCC não metastáticos correlacionadas com dados clínicos e anatomopatológicos. ....	83
Figura 45. Impacto da tradução na sobrevida global e sobrevida livre de progressão dos pacientes com CRCC.....	86
Figura 46. Impacto da tradução na sobrevida global e sobrevida livre de progressão dos pacientes com CRCC com baixo estadiamento clínico. ....	86
Figura 47. Expressão de HIF-2 $\alpha$ em tecido renal não neoplásico.....	88
Figura 48. Expressão de HIF-2 $\alpha$ em tecido tumoral de CRCC.....	89
Figura 49. Expressão de HIF-2 $\alpha$ em tecido tumoral de CRCC em maior aumento.....	89
Figura 50. Expressão de HIF-2 $\alpha$ em tecidos tumorais de CRCC e não tumorais adjacentes. ..	90
Figura 51. Determinação do ponto de corte para sobrevida livre de progressão entre baixa e alta expressão de HIF-2 $\alpha$ nos pacientes da casuística.....	90
Figura 52. Impacto da expressão nuclear de HIF-2 $\alpha$ na sobrevida de pacientes com CRCC. ...	94
Figura 53. Sobrevida livre de progressão estratificada pelo estadiamento tumoral e expressão nuclear de HIF2 $\alpha$ dos pacientes com CRCC.....	97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas e anatomopatológicas dos pacientes da casuística. ....	29
Tabela 2. Variáveis clínicas e anatomopatológicas de pacientes da casuística. ....	33
Tabela 3. Características anatomopatológicas e moleculares dos tecidos de PDX.....	77
Tabela 4. Comparações não paramétricas entre os dados demográficos, clínicos e anatomopatológicos dos pacientes com CRCC e mediana das taxas de tradução global.....	80
Tabela 5. Associação entre as taxas de tradução global e estadiamento do tumor dos pacientes com CRCC.....	84
Tabela 6. Associação entre características epidemiológicas e a expressão nuclear de HIF-2 $\alpha$ em pacientes com CRCC.....	91
Tabela 7. Associação entre variáveis de estadiamento e a expressão nuclear de HIF-2 $\alpha$ em pacientes com CRCC.....	92
Tabela 8. Associação entre características anatomopatológicas e a expressão nuclear de HIF-2 $\alpha$ em pacientes com CRCC.....	93
Tabela 9. Associação entre os desfechos e a expressão nuclear de HIF-2 $\alpha$ em pacientes com CRCC. ....	93
Tabela 10. Risco de recidiva em pacientes com CRCC.....	95
Tabela 11. Risco de recidiva em pacientes com CRCC incluindo a expressão de HIF-2 $\alpha$ . ....	96

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>4E-BP1</b>	Eukaryotic initiation translation factor 4E Binding-Protein 1
<b>AKT</b>	Protein kinase B
<b>AMPK</b>	AMP-activated protein kinase
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BAP1</b>	BRCA1 associated protein-1
<b>BCL2</b>	B-cell lymphoma 2
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>CDK1</b>	Cyclin-dependent kinase 1
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CHX</b>	Cicloheximida
<b>cm</b>	Centímetros
<b>CoCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de cobalto
<b>CRCC</b>	Carcinoma renal de células claras
<b>CTLA4</b>	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
<b>DEPTOR</b>	DEP domain containing mTOR interacting protein
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNA-PKcs</b>	DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>eEF2</b>	Eukaryotic translation elongation factor 2
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor
<b>eIF</b>	Eukaryotic translation initiation factor
<b>eIF1</b>	Eukaryotic translation initiation factor 1
<b>eIF1A</b>	Eukaryotic translation initiation factor 1A
<b>eIF2A</b>	Eukaryotic translation initiation factor 2A
<b>eIF3</b>	Eukaryotic translation initiation factor 3
<b>eIF4A</b>	Eukaryotic translation initiation factor 4A
<b>eIF4B</b>	Eukaryotic translation initiation factor 4B
<b>eIF4E</b>	Eukaryotic translation initiation factor 4E
<b>eIF4E2</b>	Eukaryotic translation initiation factor 4E 2
<b>eIF4F</b>	Eukaryotic translation initiation factor 4F
<b>eIF4F<sup>H</sup></b>	Eukaryotic translation initiation factor 4F <sup>(hypoxia)</sup>

<b>eIF4G</b>	Eukaryotic translation initiation factor 4G
<b>eIF4G3</b>	Eukaryotic translation initiation factor 4G 3
<b>eIF5</b>	Eukaryotic translation initiation factor 5
<b>EPAS1</b>	Endothelial PAS domain-containing protein 1
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinase 1
<b>FDR</b>	False discovery rate
<b>FIH</b>	Factor inhibiting HIF-1
<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase
<b>GDP</b>	Guanosine diphosphate
<b>GLUT-1</b>	Glucose transporter protein 1
<b>GNBL2</b>	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1
<b>GO</b>	Gene ontology
<b>GSEA</b>	Gene set enrichment analysis
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HER2</b>	Human epidermal growth factor receptor 2
<b>HIF</b>	Hypoxia-inducible factor
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$
<b>HIF-1<math>\beta</math></b>	Hypoxia-inducible factor 1 $\beta$
<b>HIF-2<math>\alpha</math></b>	Hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$
<b>HIF-3<math>\alpha</math></b>	Hypoxia-inducible factor 3 $\alpha$
<b>HRE</b>	Hypoxia-response elements
<b>HuR</b>	Human antigen R
<b>IGF-1</b>	Insulin-like growth factor 1
<b>IHQ</b>	Imunohistoquímica
<b>IL-12</b>	Interleucina 12
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>lncRNA</b>	RNA longo não-codificante
<b>m7g</b>	7-Metilguanosina
<b>Mdm2</b>	Murine double minute 2
<b>MET-tRNA</b>	Methionine transfer RNA
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>min</b>	Minutos



<b>mL</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin
<b>mTORC1</b>	mTOR complex 1
<b>mTORC2</b>	mTOR complex 2
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NF-κB</b>	Nuclear factor kappa B
<b>ng</b>	Nanogramas
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>NTA</b>	Network topology-bases analysis
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>ORF</b>	Open reading frame
<b>p70S6K</b>	Ribosomal protein S6 kinase beta-1
<b>PABP</b>	Poly(A)-binding protein
<b>PBRM1</b>	Polybromo 1
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline
<b>PC1</b>	Principal component 1
<b>PC2</b>	Principal component 2
<b>PCA</b>	Principal analysis componente
<b>PD1</b>	Programmed cell death protein 1
<b>PDGF</b>	Platelet-derived growth factor
<b>PDK1</b>	Pyruvate dehydrogenase kinase 1
<b>PD-L1</b>	Programmed cell death-ligand 1
<b>PDX</b>	Patient-derived xenografts
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol 3-kinase
<b>PI3KCA</b>	Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic alfa subunit
<b>PIC</b>	Pre-initiation complex
<b>PIP2</b>	Phosphatidylinositol biphosphate
<b>PIP3</b>	Phosphatidylinositol triphosphate
<b>PLD</b>	Phospholipase D
<b>PTEN</b>	Phosphatase and tensin homologue
<b>pVHL</b>	Von-Hipple Lindau protein

<b>RBM4</b>	RNA binding motif protein 4
<b>REDD1</b>	Regulated in development and DNA damage responses 1
<b>Rheb</b>	Ras homolog enriched in brain
<b>RIN</b>	RNA integrity number
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>rpS6</b>	Ribossomal protein S6
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SLC7A5</b>	Solute carrier family 7 member 5
<b>SQSTM1</b>	Sequestosome 1
<b>STAT3</b>	Signal transducer and activator of transcription 3
<b>TBS-T</b>	Tris-buffered saline with Tween®
<b>TMA</b>	Tissue microarray
<b>tRNA</b>	RNA transportador
<b>TSC1/2</b>	Tuberous sclerosis proteins 1 and 2
<b>TSO</b>	Template switching oligo
<b>µg</b>	Microgramas
<b>µL</b>	Microlitros
<b>µm</b>	Micrometro
<b>UTR</b>	Untranslated region
<b>V</b>	Volts
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>VEGFA</b>	Vascular endothelial growth factor A
<b>VHL</b>	Von-Hippel Lindau

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 <i>Carcinoma Renal</i> .....	2
1.2 <i>Carcinoma Renal de Células Claras</i> .....	4
1.2.1 Alterações moleculares no carcinoma renal de células claras.....	5
1.3 <i>Transcrição e tradução</i> .....	9
1.4 <i>Controle da tradução pela via de PI3K/Akt/mTOR</i> .....	10
1.5 <i>Início da tradução</i> .....	11
1.6 <i>Heterogeneidade tumoral e o controle da tradução</i> .....	13
1.7 <i>Translatômica</i> .....	15
2. OBJETIVOS.....	17
3. METODOLOGIA .....	18
3.1 <i>Linhagens celulares</i> .....	18
3.2 <i>Obtenção de tecidos congelados</i> .....	18
3.3 <i>Obtenção dos tecidos de PDX (patient-derived xenograft)</i> .....	18
3.4 <i>Curva de crescimento</i> .....	18
3.5 <i>Western Blot</i> .....	19
3.5.1 Via de mTOR.....	19
3.5.2 Via de mTOR e expressão de HIF-1 $\alpha$ .....	20
3.6 <i>Translatômica</i> .....	20
3.6.1 Processamento de linhagens celulares para perfil polissomal .....	21
3.6.2 Processamento de tecidos tumorais para perfil polissomal.....	21
3.6.3 Separação e fracionamento polissomal.....	21
3.6.4 Quantificação da taxa de tradução global .....	22
3.6.5 Extração de RNA .....	23
3.6.6 Construção da biblioteca smart-seq2 e sequenciamento .....	23
3.6.7 Processamento dos dados do smart-seq2 .....	24
3.6.8 Análise da eficiência da tradução utilizando anota2seq .....	24
3.7 <i>Tissue microarray (TMA)</i> .....	24
3.7.1 Reações de imuno-histoquímica no tissue microarray .....	25
3.7.2 Análise das reações.....	25
3.8 <i>Análises estatísticas</i> .....	26

4.	CASUÍSTICA .....	27
4.1	<i>Perfil Polissomal</i> .....	27
4.1.1	Critérios de Inclusão .....	27
4.1.2	Critérios de exclusão.....	27
4.1.3	Pacientes .....	27
4.2	<i>Tissue Micro-Array</i> .....	31
4.2.1	Critérios de inclusão .....	31
4.2.2	Critérios de exclusão.....	31
4.2.3	Pacientes .....	31
5.	RESULTADOS .....	36
5.1	<i>Modelos de linhagens celulares e PDX de Carcinoma Renal de Células Claras</i> .....	37
5.1.1	Perfil polissomal de linhagens celulares de CRCC .....	37
5.1.2	Análise das taxas de tradução global, ativação da via de mTOR e crescimento celular das linhagens celulares de CRCC .....	38
5.1.3	Análise do translatoma das linhagens celulares de CRCC .....	43
5.1.4	Efeito do cloreto de cobalto (CoCl <sub>2</sub> ) na via de mTOR e na estabilização de HIF-1 $\alpha$ e HIF-2 $\alpha$ nas linhagens celulares de CRCC.....	69
5.1.5	Taxas de tradução global, expressão de HIF-1 $\alpha$ , e de proteínas da via de mTOR e ERK em PDX. ....	74
5.2	<i>Tumores congelados do BioBanco do A.C. Camargo Cancer Center</i> .....	77
5.2.1	Perfil polissomal two-steps das amostras dos pacientes com CRCC.....	77
5.2.2	Correlação da taxa global de tradução e características clínicas e patológicas de pacientes com CRCC.....	79
5.2.3	Correlação da taxa global de tradução e sobrevida de pacientes com CRCC....	85
5.3	<i>Expressão de HIF-2<math>\alpha</math> em tecidos tumorais de carcinoma renal de células claras..</i>	87
5.3.1	Expressão de HIF-2 $\alpha$ em tecidos tumorais e tecidos adjacentes não neoplásicos	87
5.3.2	Associação entre a expressão de HIF-2 $\alpha$ e características epidemiológicas, clínicas e anatomopatológicas entre os pacientes com CRCC.....	91
5.3.3	Análises de sobrevida e risco de recidiva em pacientes com CRCC .....	94
6.	DISCUSSÃO.....	98
7.	CONCLUSÕES.....	110

8. REFERÊNCIAS.....	111
9. ANEXOS.....	133
10. APÊNDICES .....	134

## 1. INTRODUÇÃO

Neste trabalho foram abordados diferentes e complexos aspectos moleculares do câncer renal do tipo células claras a partir de resultados gerados em modelos celulares e tecidos tumorais, tendo como principal foco a tradução de RNAs mensageiros e seu papel no desenvolvimento tumoral. Ao longo do tempo houveram diversas colaborações que contribuíram para o resultado final desta tese que também estão mencionadas ao longo dos tópicos. A parte inicial dos resultados com modelos celulares foi realizado durante período sanduíche na Universidade McGill sob supervisão do Dr. Ivan Topisirovic. Os resultados gerados pelo sequenciamento dos modelos celulares foram realizados no laboratório do Dr. Ola Larsson no Instituto Karolinska por seus alunos de pós-graduação. O restante dos resultados obtidos foi realizado no Centro Internacional de Pesquisa do AC Camargo Cancer Center e contou com a participação de diversos pesquisadores, médicos e alunos do programa de Pós-graduação em Oncologia. A revisão dos casos de carcinoma renal incluídos nas casuísticas deste trabalho foi realizada pela patologista Dra. Stephania Martins Bezerra. Todos os casos nos quais foram utilizados tecidos tumorais congelados foram retirados do Biobanco de tecidos tumorais do AC Camargo Cancer Center. Grande parte dos dados obtidos dos prontuários eletrônicos dos pacientes foram fornecidos já em tabela pelo chefe da Urologia Dr. Stenio de Cassio Zequi. A revisão e inserção dos dados no sistema eletrônico de captura de dados foi realizada em conjunto com a aluna de doutorado Fernanda Ferreira da Silva e outros alunos de iniciação científica. Os tumores provindos de camundongos foram fornecidos pelo Dr. Tiago Góss e seu aluno de doutorado Adriano Oliveira. Uma parte das análises estatísticas foram feitas pela Janaína Germano do serviço de consultoria estatística e pelo Alexandre Defelicibus da core facility de Bioinformática. Ao final das referências bibliográficas estão os anexos e apêndices referentes a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, tabelas não incluídas na seção de resultados e outras informações relevantes para o desenvolvimento do projeto e análise dos dados obtidos. Para iniciar a contextualização deste trabalho, alguns conceitos e definições conhecidos na literatura foram abordados sobre biologia molecular e câncer renal.

## 1.1 Carcinoma Renal

Mundialmente, o carcinoma renal é a neoplasia urológica mais comum – cerca de 90% dos casos – e com maior letalidade. Representa 2% de ocorrência entre todas as neoplasias, sendo o sétimo tipo tumoral mais diagnosticado (1–3). A incidência do carcinoma renal é mais elevada em países desenvolvidos do que nos países menos desenvolvidos. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que a incidência de casos de câncer renal em 2020 na América do Sul foi de 27 mil casos com mais de 11 mil mortes, e 12 mil casos no Brasil com uma taxa de mortalidade de quase 50%. Já os Estados Unidos, 70 mil casos e 15 mil mortes foram estimados no ano de 2020, e no continente europeu foram estimados mais de 130 mil novos casos com 54 mil mortes. A sobrevida dos pacientes em 5 anos é entre 65-75% e esse número cai para 10% em pacientes com doença metastática (2,4). Em comparação com outros tumores urológicos, a sobrevida em cinco anos para tumores de próstata e bexiga são 95% e 73%, respectivamente (5).

Os fatores de risco mais conhecidos associados ao carcinoma renal são o consumo de tabaco (6,7), hipertensão arterial (6) e obesidade (8), além de outros fatores como: gênero, sendo mais frequente em homens do que em mulheres; idade, onde 90% dos casos registrados são em adultos com mais de 45 anos; exposição à cádmio, benzeno, tricloroetileno e amianto; doença renal cística adquirida, doença renal em estágio final, pacientes transplantados e pacientes submetidos a diálises recorrentes (1–3). Algumas alterações genéticas aumentam o risco de desenvolver carcinoma renal, como a mutação germinativa no gene *VHL* e alterações no cromossomo que contém o gene *EPAS1* (9,10), ambas importantes para o desenvolvimento e sobrevivência tumoral e serão discutidas mais à frente.

A maioria dos pacientes com carcinoma renal são assintomáticos e metade dos casos são diagnosticados acidentalmente por meio de exames de imagem abdominais realizados por outros motivos. Os principais sintomas associados ao carcinoma renal são hematúria, dor abdominal e massa palpável no flanco. Pacientes com essa tríade clássica de sintomas apresentam um pior prognóstico, porém apenas 10% dos casos relatam estes sintomas. Os pacientes também podem apresentar sintomas sistêmicos como hipercalcemia e hipertensão, e sintomas inespecíficos como febre, fadiga e perda de peso (3,11). Após a suspeita de carcinoma renal, é importante determinar o subtipo de tumor presente, para avaliar a melhor abordagem terapêutica, e estabelecer o diagnóstico da doença nos estágios mais precoces, o

que aumenta a sobrevida do paciente (12). Por ser um tumor assintomático e detectado muitas vezes por acidente, muitos pacientes descobrem a doença em estágios mais avançados. Exames mais complexos como a tomografia computadorizada e ressonância magnética permitem determinar o tamanho do tumor, o comprometimento de linfonodos, detectar metástases e diferenciar alguns subtipos tumorais. A biópsia renal guiada é um procedimento pouco invasivo e com alta eficácia no diagnóstico e identificação de diferentes subtipos após coloração da lâmina com o tecido por hematoxilina-eosina (13,14). Pelo aumento do uso desses exames de imagem na medicina, houve um aumento no número de diagnósticos, porém a mortalidade no Brasil não diminuiu. A alta heterogeneidade do carcinoma renal e as dificuldades em diferenciar alguns de seus subtipos exigem métodos diagnósticos e terapias ainda mais sensíveis e eficazes do que existe atualmente (3,15,16).

O tratamento depende do estágio do tumor, mas normalmente é feita a remoção parcial ou total do rim por cirurgia aberta ou laparoscopia. A nefrectomia parcial (onde se mantém parte do tecido normal) é indicada para tumores confinados ao rim, pacientes com apenas um rim, tumores bilaterais e pacientes com a doença de VHL. Já a nefrectomia total apresenta cura em metade dos casos e é indicada para pacientes com vários tumores no rim ou com tumores maiores que 7 cm. Ambas abordagens apresentam eficácias similares, porém a maior desvantagem da nefrectomia total é o aumento do risco de outras doenças crônicas (17–20). Para pacientes impossibilitados de realizar a cirurgia, a ablação térmica por crioterapia ou radiofrequência é um método pouco invasivo e bastante eficaz na destruição tecidual do tumor, porém apresenta complicações em cerca de 20% dos casos (21–24). Apesar da falta de uma abordagem definida, a vigilância apresenta as mesmas taxas de sobrevida quando comparada com uma cirurgia e a principal vantagem é evitar que pacientes passem por procedimentos desnecessários. Outra abordagem é escolhida caso o tumor cresça mais de 3 cm no total ou mais de 0,5 cm por ano (25,26).

No caso de doença metastática é necessário incluir terapias sistêmicas. Pacientes submetidos a quimioterapia e radioterapia apresentam taxas muito baixas de resposta a esses tratamentos – cerca de 5% - por isso houve a necessidade de desenvolver e testar terapias alvo específicas para o carcinoma renal (27,28) como os inibidores de angiogênese, devido à alta vascularização do tumor; inibidores de tirosina-quinase, usados como primeira linha de tratamento sendo o sunitinibe a droga mais utilizada; e inibidores da síntese proteica, como everolimus e temsirolimus, usados como segunda linha de tratamento ou primeira linha em

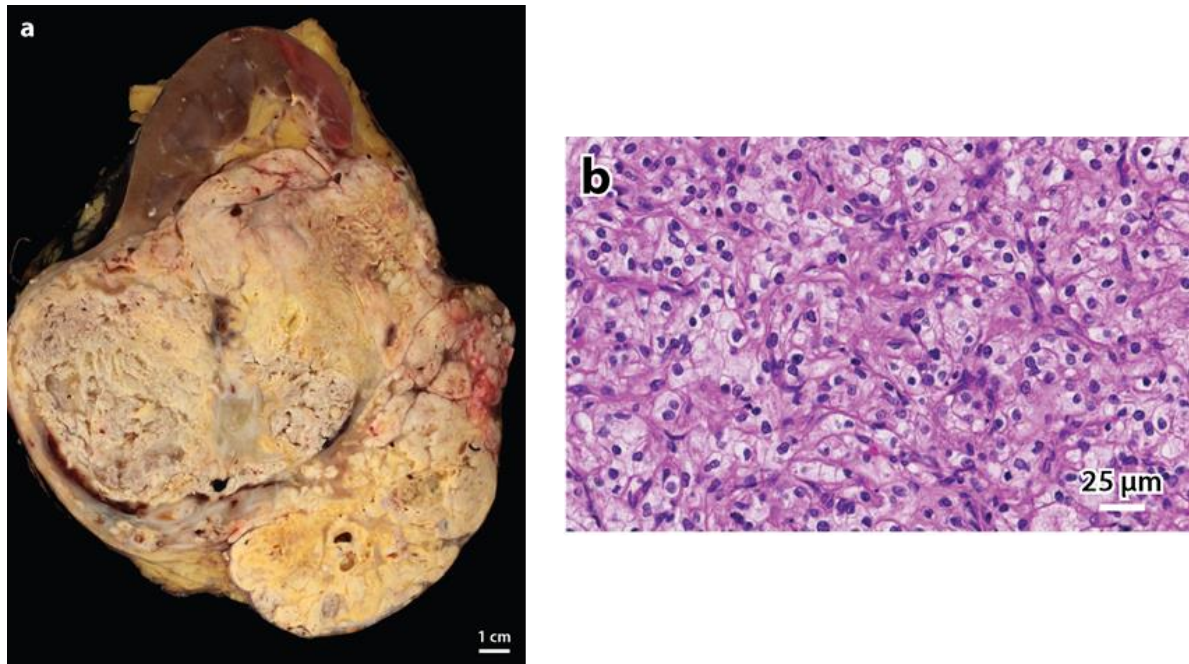


pacientes com tumores de alto risco (29–33). As imunoterapias com interferon alfa e IL-2 em altas doses foram utilizadas como tratamento padrão até o uso do sunitinibe (29,30,34) porém nos últimos anos vem crescendo o uso de imunoterapias com inibidores de checkpoints imunes, como o nivolumabe (bloqueador de PD1), avelumabe (bloqueador de PD-L1) e ipilimumabe (inibidor de CTLA4) (35–38).

O carcinoma renal abrange tumores heterogêneos com diversas características morfológicas e genéticas, os quais necessitam de terapias específicas por apresentarem diferentes evoluções e respostas aos tratamentos. O carcinoma renal de células claras (CRCC) é o subtipo com maior incidência – entre 80 a 90% de todos os casos e nosso foco neste trabalho – seguido pelos subtipos papilífero e cromóforo, que compreendem cerca de 80% de todos os carcinomas renais não-células claras (39).

## 1.2 Carcinoma Renal de Células Claras

O **Carcinoma Renal de Células Claras (CRCC)** é uma neoplasia maligna originada nos túbulos renais proximais e recebe esse nome devido à coloração amarelada causada pela presença de lipídios no citoplasma de suas células. Macroscopicamente o CRCC pode apresentar formas variadas, mas, em sua maioria, é possível observar uma massa lobulada distorcendo a aparência normal do rim (**Figura 1A**). Histologicamente, as células apresentam citoplasma claro, devido a perda do conteúdo citoplasmático durante o processamento histológico, com uma rede vascular mais evidente que em outros subtipos histológicos de carcinoma renal (**Figura 1B**). Os achados nos exames de imagem mostram lesões vascularizadas e heterogêneas (40) e os principais achados patológicos são necrose, hemorragia, calcificação e fibrose (41,42).



**Figura 1. Características macroscópicas e histológicas do CRCC.**

(A) Macroscopia do CRCC onde é possível visualizar o tumor de colocação amarelada e distorcendo o rim. (B) Corte histológico do CRCC onde é possível visualizar o citoplasma claro das células. Essa característica é devido à perda do conteúdo citoplasmático, composto principalmente por lipídios e glicogênio, durante o processamento histológico (43).

### 1.2.1 Alterações moleculares no carcinoma renal de células claras

A descoberta de alterações moleculares envolvidas na patogênese do CRCC contribuiu para melhores tratamentos, como os inibidores de angiogênese e da síntese proteica, porém tumores agressivos e com baixa taxa de resposta carecem de estratégias com maior durabilidade para melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Uma das características do carcinoma renal é a heterogeneidade tumoral, o que é essencial para o tumor adaptar-se às condições do ambiente e resistir aos tratamentos (44). No CRCC é comum a inativação de genes supressores de tumor presentes no braço curto do cromossomo 3 e, como consequência, a desregulação de proteínas envolvidas no desenvolvimento e progressão tumoral. A perda de heterozigose do gene *VHL*, o principal regulador da resposta à hipóxia, é crucial na carcinogênese, apesar de não ser o único passo necessário para a transformação maligna do CRCC. Outras alterações são necessárias e as mais comuns são as inativações de genes envolvidos no controle epigenético como *PRBM1* (em 29 a 40% dos casos), *SETD2* (em 8 a 12% dos casos) e *BAP1* (em 6 a 10% dos casos) (45–48). A superativação da via de PI3K/Akt/mTOR ou a inativação de seus reguladores também ocorre

com frequência (48). Essa via controla a tradução de proteínas em células normais e, quando alterada, favorece a proliferação, migração e sobrevivência do tumor (49–51). Essas alterações, ou combinações de alterações, determinam características do tumor e o prognóstico dos pacientes com CRCC (52).

#### *1.2.1.1 Síndrome de von Hippel-Lindau (VHL)*

A síndrome de VHL é uma doença hereditária autossômica dominante, com alta penetrância para gerações futuras (100% até 65 anos), que ocorre pela mutação germinativa em um alelo do gene *VHL*. Pacientes com essa síndrome têm maior predisposição a doenças como câncer de rim, hemangioblastomas no sistema nervoso central e retina, tumores e cistos no pâncreas, tumores neuroendócrinos e paragangliomas. A inativação do gene ocorre após mutação somática no segundo alelo *VHL* e é um evento que favorece a formação e vascularização de doenças pré-cancerosas (53–56). A perda de *VHL* causa um acúmulo de fatores induzidos por hipóxia (HIF) que estimulam a transcrição de fatores angiogênicos (57). A maioria dos casos de CRCC são esporádicos, porém pacientes com a síndrome de VHL são acometidos pelo carcinoma renal mais precocemente, com maiores chances de recidiva da doença, e maior risco de desenvolver outras patologias ao mesmo tempo.

#### *1.2.1.2 VHL-HIF e a resposta celular à hipóxia*

Células eucariontes dependem de oxigênio para manutenção de todos os tecidos. Em 2019, o prêmio Nobel de Medicina ou Fisiologia foi dedicado à três pesquisadores – Sir Peter Ratcliffe, William Kaelin Jr., e Gregg Semenza – que descreveram os mecanismos moleculares de sobrevivência e funcionamento da célula em resposta a disponibilidade de oxigênio (58). A patologia e fisiologia do CRCC é consequência da resposta celular a baixos níveis de oxigênio. A principal proteína envolvida é codificada pelo gene *VHL*, um supressor tumoral que regula a expressão de HIF em condições normais. Em normóxia, a proteína VHL (pVHL) participa da ubiquitinação de HIF e degradação via proteassoma. O domínio alfa ( $\alpha$ ) de pVHL se liga ao complexo ubiquitina E3 ligase e o domínio beta ( $\beta$ ) reconhece as subunidades  $\alpha$  de HIF-1 e HIF-2. pVHL não tem atividade enzimática, apenas reconhece prolinas hidroxiladas conservadas adicionadas a HIF na presença de oxigênio e conecta o complexo ubiquitina E3

ligase a HIF (59,60). Em hipóxia, a quantidade de oxigênio não é suficiente e pVHL não é capaz de reconhecer HIF- $\alpha$ , resultando no acúmulo dessas proteínas.

HIF consiste em HIF- $\alpha$  (isoformas 1 $\alpha$ , 2 $\alpha$  e 3 $\alpha$ ) e HIF- $\beta$ ; HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  formam dímeros com HIF- $\beta$  para iniciar a transcrição de genes envolvidos na resposta à hipóxia, e HIF-3 $\alpha$  não possui um papel caracterizado na fisiologia de CRCC (59,61,62). Em hipóxia, HIF- $\alpha$  acumula no citoplasma, onde HIF- $\beta$  está constitutivamente expresso, formando um dímero que se liga a regiões promotoras do gene chamadas de elementos de resposta à hipóxia (HRE). No núcleo, HIF ativa a transcrição de genes que codificam proteínas como eritropoetina, fator de crescimento vascular endotelial A (VEGFA) e transportadores de glicose, como GLUT1 (*glucose transporter-1*), envolvidas no desenvolvimento tumoral (63). No CRCC, onde o VHL está inativado, esses genes são expressos mesmo na presença de oxigênio. O controle da transcrição por HIF ocorre também no núcleo por fatores inibitórios de HIF (FIH), porém essa ligação também é dependente de pVHL (64). Além do mecanismo de degradação de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  por pVHL ser similar, uma proteína pode regular a outra (59,65).

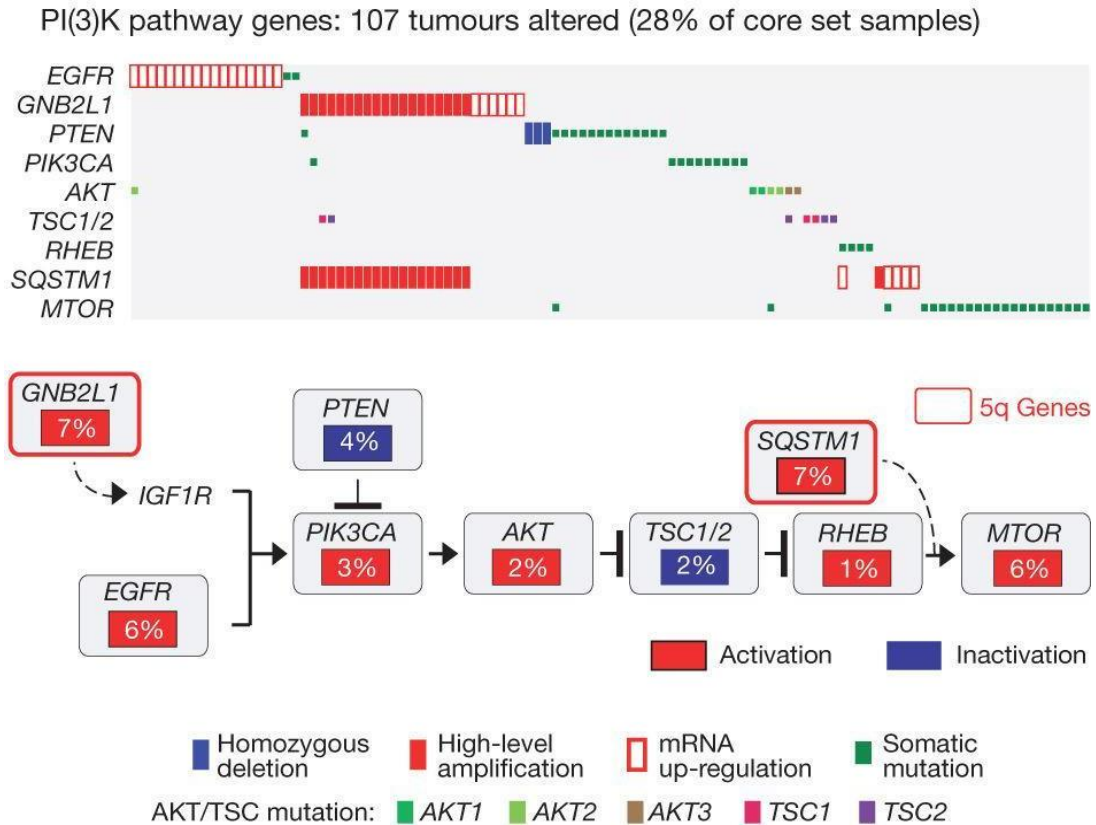
HIF- $\alpha$  regula genes em células cancerígenas que geram ATP por vias anaeróbicas independente da disponibilidade de oxigênio, mecanismo conhecido como efeito Warburg (66). HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  ativam a transcrição de genes distintos que participam do crescimento, progressão e metástase do tumor (67–72). O status de cada uma dessas proteínas pode determinar o fenótipo das células tumorais. Em 40% dos casos de CRCC, HIF-1 $\alpha$  deixa de ser expresso, porém não é suficiente para evitar o crescimento tumoral (73). O ambiente se torna favorável para o crescimento tumoral pela expressão de proteínas reguladas por HIF-2 $\alpha$  como GLUT-1, SLC7A5 (um transportador de aminoácidos) e VEGFA (65). Além disso, pacientes com deleção no cromossomo 14q (onde se localiza o gene *HIF1*) apresentam um pior prognóstico (10). Ambas as proteínas participam de formas diferentes na progressão tumoral. Além de regular o crescimento celular, a expressão de HIF-2 $\alpha$  causa maior tolerância a danos no DNA (71).

#### 1.2.1.3 Via de sinalização PI3K/Akt/mTOR no CRCC

Terapias que bloqueiam vias de sinalização contribuíram para o avanço no tratamento de CRCC, mas muitos tumores desenvolvem resistência por vias alternativas. O eixo VHL/HIF é uma das assinaturas do CRCC esporádico e o *cross-talk* com a via de PI3K/Akt/mTOR ainda

não é totalmente elucidado. Cerca de 28% dos casos de CRCC tem alterações em genes da via de PI3K/Akt/mTOR (**Figura 2**), principalmente em *GNB2L* (16%), *PIK3CA* (5%), *PTEN* (5%), *AKT* (2%) e *MTOR* (4%–9%) (48), que influenciam na patogênese e prognóstico do carcinoma renal.

Um dos fatores de predisposição para carcinoma renal é a perda de *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*), o regulador negativo da via de PI3K/Akt/mTOR (74,75). Mutações em *PTEN* são mais raras, mas a perda da expressão ocorre frequentemente nos tumores, influenciando no metabolismo, proliferação e crescimento das células. A perda de *PTEN* favorece a metástase, reduz a sobrevida global e está relacionada a tumores mais avançados e pacientes com pior prognóstico (74–77). Tumores com alterações em *PTEN* respondem bem aos tratamentos com inibidores de angiogênese e da via de mTOR (78,79). Diversas vias são reguladas por *PTEN*, como a transição epitélio-mesenquimal, reparo de DNA, glicólise, hipóxia e resposta de interferon (IFN) (79). Sem o regulador negativo, aumenta a ativação de proteínas downstream, como Akt, que está envolvida na progressão tumoral e estágios mais avançados da doença (80–82). Inibidores de PI3K diminuem a expressão de Akt controlando o crescimento celular e melhorando a sobrevida de pacientes (83). A via de PI3K/Akt/mTOR regula o ciclo celular, crescimento, proliferação e metabolismo da célula em estresse. Grande parte dos casos de CRCC tem alterações nessa via que interferem nas características do tumor e pode indicar um pior prognóstico em pacientes com CRCC não-metastático (82,84–87). A hiperativação da via causa sensibilidade a rapamicina e casos avançados com mutações mTOR e *TSC1/2* respondem melhor aos tratamentos, porém sem melhora da sobrevida (79,88,89). A deleção de *VHL* e a superativação da via de PI3K/Akt/mTOR regulam HIF- $\alpha$  e promovem proliferação celular, angiogênese e metástase (90,91).



**Figura 2. Alterações genéticas na via de sinalização de PI3K/AKT/mTOR em CRCC.**

Estão indicados a frequência de alterações em porcentagem de cada gene (EGFR, GNB2L1, PTEN, PIK3CA, AKT, TSC1/2, RHEB, SQSTM1 e MTOR) e o tipo de alteração, em azul para inativação e em vermelho para ativação (48).

VHL regula mTOR pela via VHL/HIF/REDD1, enquanto os substratos de mTOR modulam a expressão de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  (90,92). Além disso, as funções da via de PI3K/Akt/mTOR em CRCC são controversas e outros trabalhos não observaram diferenças na patogênese, prognóstico ou sobrevida (78,93,94). Ambas as vias possuem complexas funções celulares e entender a comunicação entre elas é um ponto chave para avançar o conhecimento sobre o CRCC.

### 1.3 Transcrição e tradução

O complexo de pré-iniciação (PIC) inicia a transcrição de um RNA mensageiro (mRNA) após ser recrutado para o promotor de um gene. Fatores e cofatores de transcrição junto com outros elementos do PIC realizam a abertura da fita dupla do DNA e permitem que a RNA polimerase II inicie a transcrição. A maquinaria de transcrição é estabilizada na fase de alongação, onde o mRNA é sintetizado pela RNA polimerase II a partir da fita molde do DNA. O mRNA transcrito é então liberado para ser traduzido em proteína e a polimerase é reciclada

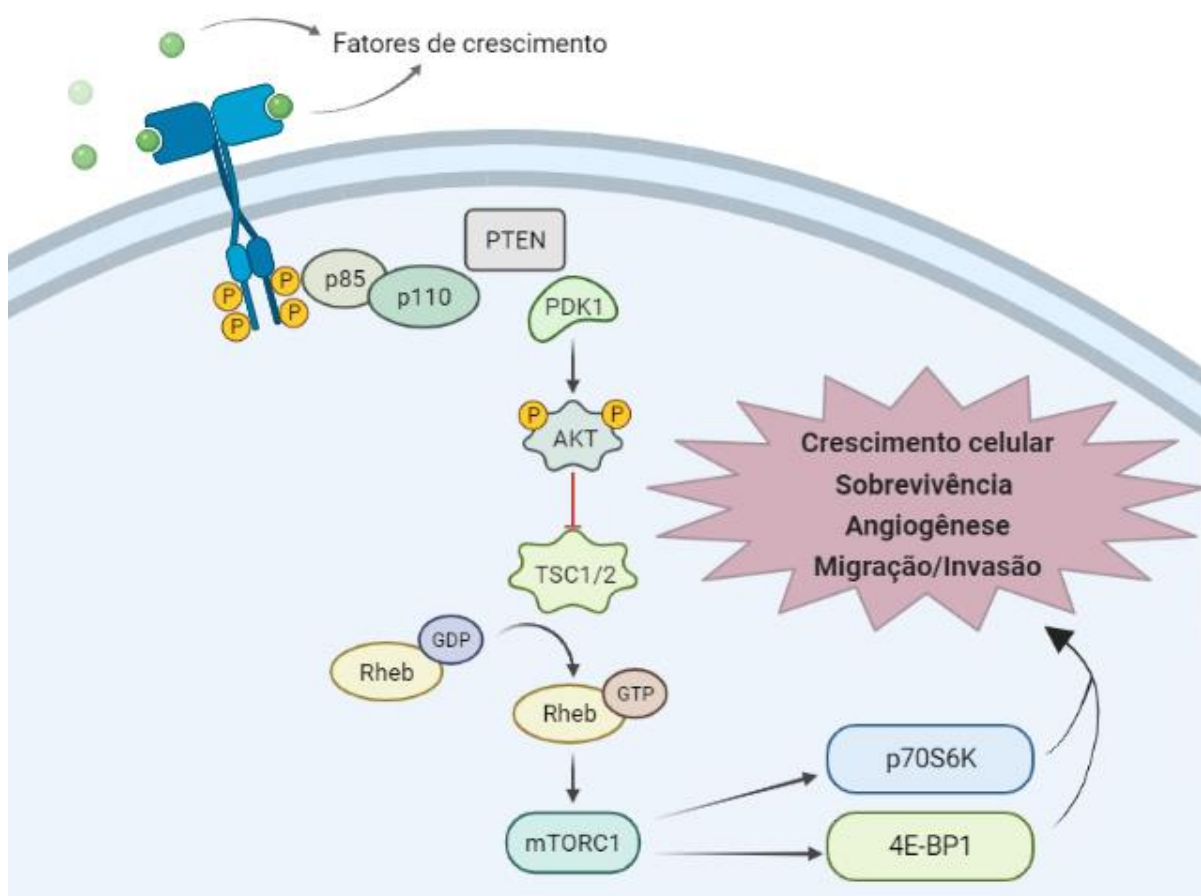
para iniciar a transcrição novamente. Para que esse processo ocorra, diversas etapas controladas são necessárias. Entre elas, a maquinaria epigenética controla a expressão gênica através da metilação e acetilação do DNA e remodelamento da cromatina, que afetam a acessibilidade da maquinaria de transcrição a um determinado gene. Diferentes tipos de neoplasias estão associados com desregulações em diversas etapas da transcrição, que podem determinar a agressividade do tumor e a resistência ao tratamento. O tratamento de tumores com inibidores da transcrição inclui a ação de enzimas que participam do controle epigenético e diminuem a formação do PIC; inibição da polimerase II e de fatores da elongação; inibição prematura do término da transcrição com o uso de inibidores ou análogos das polimerases (97,98).

A tradução dos mRNAs transcritos é feita em quatro etapas – início, elongação, término e reciclagem dos ribossomos – e assim como a transcrição, é um processo altamente regulado. Os fatores de início da tradução (eIF) regulam a montagem do ribossomo maduro e recrutam o RNA transportador (tRNA) carregando o primeiro aminoácido (MET-tRNA) ao códon de início do mRNA para dar início a tradução (99). mTOR é a molécula catalisadora em dois complexos, mTORC1 (*mammalian TOR complex 1*) e mTORC2 (*mammalian TOR complex 2*), que regulam o crescimento celular de acordo com a disponibilidade de nutrientes, hormônios e ATP. Se constantemente ativados em ambientes estressantes, mTORC1 e mTORC2 contribuem para a formação de tumores devido a sua alta capacidade de regular o metabolismo celular. A ação catalisadora de mTORC1 inicia a tradução após fosforilação de seus dois substratos: a proteína ribossomal S6 quinase (p70S6K) e a proteína 1 de ligação ao fator de início da tradução (4E-BP1) (97,100).

#### 1.4 Controle da tradução pela via de PI3K/Akt/mTOR

A via de PI3K/Akt/mTOR é ativada pela fosforilação de PI3K após a ligação de fatores de crescimento a seus receptores. PI3K adiciona um grupo fosfato ao PIP2 (fosfatidilinositol 3,4-bifosfato) para gerar PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato), que recruta Akt para ser ativada pela proteína PDK1 (quinase 1 dependente de fosfoinosítide) na membrana plasmática (101). Os substratos de Akt são as proteínas TSC1/2 e Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), que ativam mTOR. O regulador negativo da via, PTEN, impede a fosforilação de PIP3 e inibe a ativação da via de mTOR (102). mTOR integra dois complexos com funções diferentes:

mTORC1 e mTORC2 (100,103). mTORC1 regula a síntese de proteínas através da fosforilação de seus substratos principais 4E-BP1 e p70S6K (**Figura 3**). O fator de início da tradução eIF4E faz parte do complexo que se liga no mRNA para iniciar a tradução. 4E-BP1 sequestra eIF4E impedindo a formação desse complexo. Quando 4E-BP1 é ativado por mTORC1, sua ligação a eIF4E não ocorre, permitindo o início da tradução. mTORC1 também ativa a proteína p70S6K, o que resulta na fosforilação de outras proteínas envolvidas no processo de tradução, como a proteína ribossomal S6, o fator de iniciação eIF4B e o fator de alongação eEF2 (*eukaryotic translation elongation factor 2 kinase*) (100,104,105).



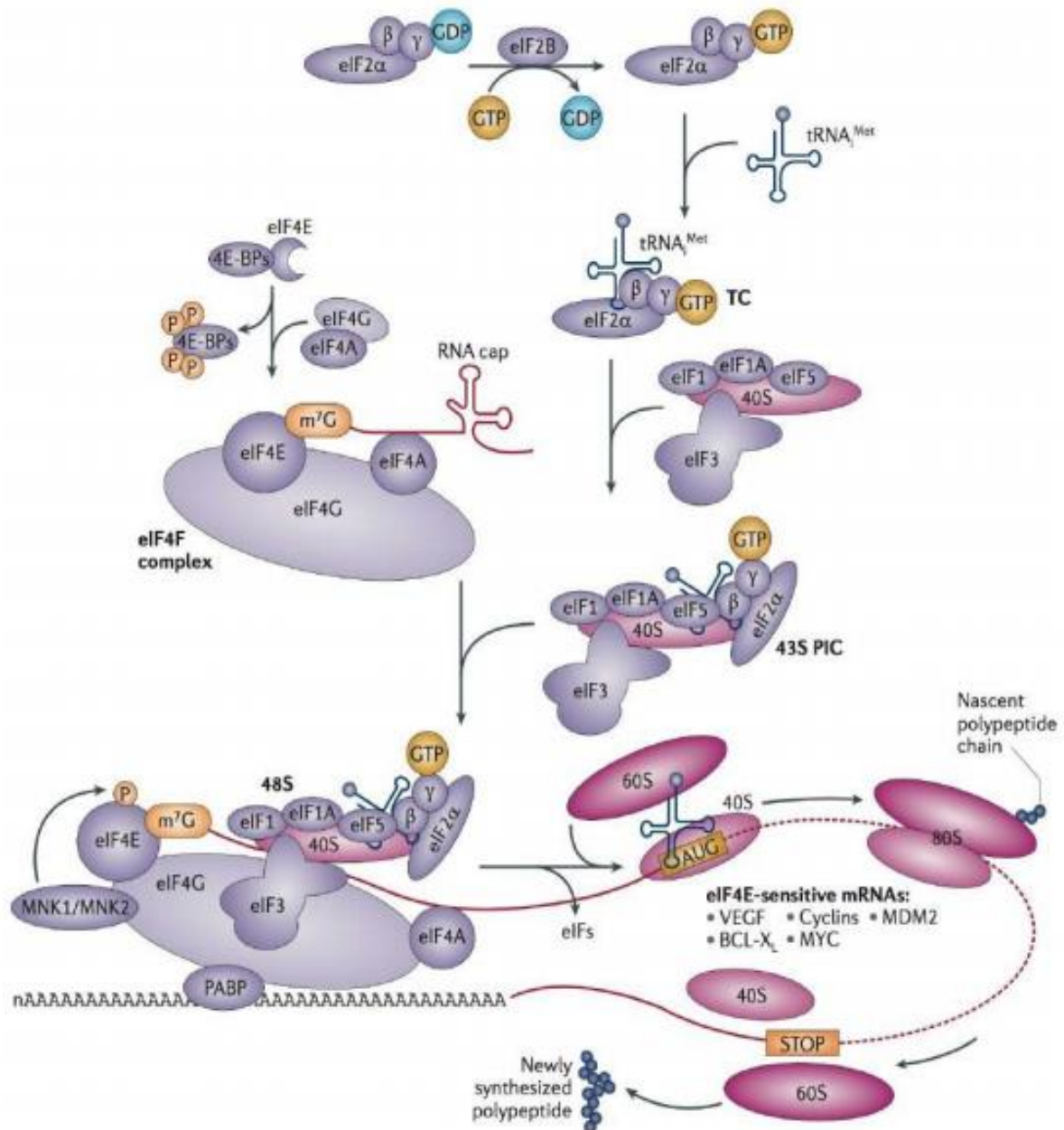
**Figura 3. Via de sinalização de PI3K/AKT/mTOR.**

A via é ativada após fosforilação das subunidades de PI3K após a ligação de fatores de crescimento a receptores de tirosina-quinase. A ativação de PI3K resulta na fosforilação PIP2 para produzir PIP3, que serve como um sinal para a ancoragem de Akt e PDK1. PDK1 fosforila e ativa Akt. PTEN desfosforila PIP3, impedindo a ativação de Akt. Após sua ativação, Akt fosforila a proteína TSC1/2. A fosforilação de TSC1/2 inibe a sua atividade de GTPase para a proteína Rheb. Rheb por sua vez, promove a ativação de mTOR e sua sinalização para os alvos p70S6K e 4EBP1.

### 1.5 Início da tradução



O mRNA sofre modificações pós-transcricionais dentro do núcleo que sinalizam para a ancoragem dos fatores de início de tradução e auxiliam no transporte para o citoplasma. Nas extremidades 5' e 3' são adicionados o *cap* de 7'-metilguanosina (m7G) e uma sequência de adeninas (cauda poli-a), respectivamente (106). O complexo eIF4F – composto pelos fatores eIF4E, eIF4G e eIF4A – liga ao *cap* de m7G na região 5' e a proteína PABP (*Poly-A binding protein*) se liga a cauda poli-A na região 3'. PABP é unido ao complexo eIF4F pelo fator eIF4G, circularizando o mRNA (107). eIF4E se liga ao *cap* de m7g enquanto eIF4A se posiciona mais à frente na molécula de mRNA para remover as estruturas secundárias presentes na região 5' UTR (*Untranslated region*) que possam bloquear o complexo de início de tradução. Paralelamente a circularização do mRNA, ocorre a formação do complexo 43S PIC (*Preinitiation complex*) que contém a subunidade 40S do ribossomo; o complexo ternário, formado por eIF2A, um tRNA iniciador carregando uma metionina e uma molécula de GTP; os fatores eIF1 e eIF1A, responsáveis pela interação entre o complexo ternário e a subunidade 40S; eIF3 que se liga ao complexo eIF4F pelo fator eIF4G; e eIF5, que hidrolisa a molécula de GTP em GDP. A interação do 43S PIC com o complexo eIF4F, forma o complexo 48S que escaneia a fita de mRNA até encontrar o códon de início AUG da fase aberta de leitura (ORF). Uma vez encontrado, eIF5 hidrolisa a molécula de GTP do complexo ternário e recruta a subunidade 60S, formando o ribossomo 80S competente. Após a formação do ribossomo, iniciam os processos de alongação e término e, nesse momento, outro complexo de início de tradução é estruturado na molécula de mRNA, permitindo que o mesmo transcrito seja traduzido simultaneamente por mais de um ribossomo (108–110) (**Figura 4**).



**Figura 4. Início da tradução de mRNAs em células eucariotas.**

O mRNA maduro é circularizado após a ligação do complexo eIF4F (formado por eIF4E, eIF4G e eIF4A) no cap de m<sup>7</sup>G e da proteína PABP na cauda poli-A. O complexo ternário (formado pelo eIF2 ligado a um tRNA<sup>iMet</sup> e uma molécula de GTP) ligado à subunidade 40S do ribossomo e aos fatores de iniciação eIF3 e eIF5, formam o complexo 43S PIC. Após a ligação do 43S PIC ao complexo eIF4F-PABP é formado o complexo 48S que inicia o escaneamento da fita de mRNA até o códon de início AUG. O fator eIF5 hidrolisa a molécula de GTP liberando alguns fatores de iniciação. eIF5B é capaz, então, de recrutar a subunidade 60S do ribossomo, formando o ribossomo 80S, e dar continuidade a elongação do mRNA (111).

### 1.6 Heterogeneidade tumoral e o controle da tradução

O ambiente tumoral é caótico; nichos de células do mesmo tumor, com diversas características, são expostos a microambientes com diferentes níveis de fatores de

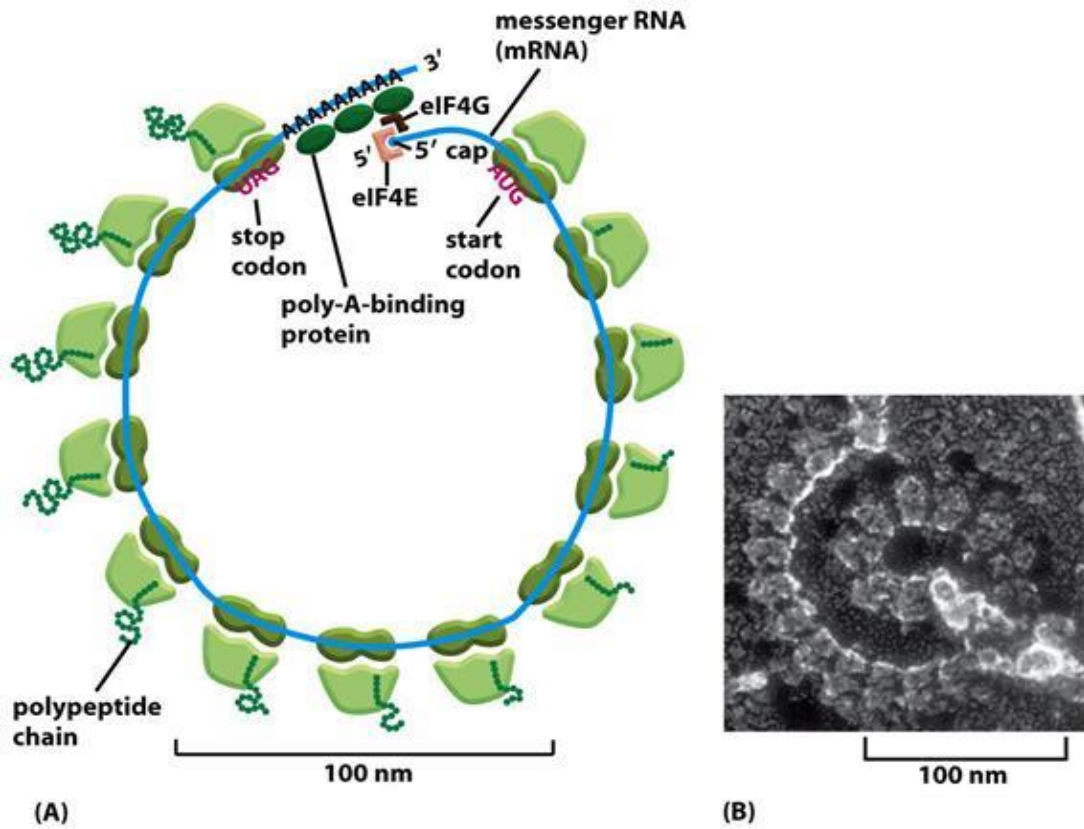
crescimento, oxigênio, nutrientes, pH e vascularização. A heterogeneidade tumoral ultrapassa o nível genético e pode gerar fenótipos diferentes dentro de um tumor geneticamente igual por alterações epigenéticas como metilação do DNA e remodelamento de cromatina. Essa variedade de fenótipos seleciona as células mais bem adaptadas ao microambiente e mais resistentes às terapias-alvo. Obter um perfil molecular do tumor é essencial para alcançar melhores resultados na medicina de precisão. Porém, mesmo com o avanço dos métodos de sequenciamento e da análise de megadados, ainda existem outros grandes desafios para definir um tratamento individualizado mais eficaz a longo prazo. Inibidores de oncogenes são eficazes em diversos tipos de câncer, como o trastuzumabe, utilizados há mais de vinte anos no tratamento de câncer de mama com amplificação de HER2 (*human epidermal growth factor 2*) (112,113), mas a heterogeneidade tumoral pode selecionar clones que não dependem da via *downstream* ou instigar mutações em vias *by-pass*. Apesar do avanço na pesquisa clínica com combinações de tratamentos que inibem mecanismos diferentes, falta aprovação de tratamentos para oncogenes já conhecidos e mesmo com o crescente conhecimento das alterações moleculares em tumores, existem genes com funções ainda desconhecidas na carcinogênese.

Tratamentos com inibidores do início da tradução podem acrescentar na combinação de terapias em tumores com altos níveis de 4E-BP1 e eIF4E fosforiladas, ambas associadas a um prognóstico pior em CRCC (114). O desbalanceamento na via de PI3K/Akt/mTOR modifica a tradução de proteínas de forma geral, mas sua atividade tem impactos diferentes nas populações de mRNAs. Transcritos envolvidos na proliferação celular, como ciclina D, e na resistência a apoptose, como BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*), são exemplos de mRNAs preferencialmente traduzidos por mTOR (115,116). As variações de oxigênio e nutrientes alteram as taxas de tradução nas células tumorais que se adaptam para sobreviver em hipóxia por vias alternativas (117,118). Em hipóxia, mTORC1 é inibido via REDD1 (*Protein regulated in development and DNA damage response 1*) e a fosforilação de 4E-BP1 deixa de ser catalisada; eIF4E é constantemente sequestrado por 4E-BP1 e as taxas de tradução caem (119). Apesar dos tratamentos com inibidores de mTOR afetarem a fosforilação de 4E-BP1, essa proteína é alvo de outras enzimas como ERK e CDK1 (120,121). Investigar as mudanças no perfil de mRNAs diferencialmente traduzidos no CRCC é mais uma etapa necessária para elucidar processos celulares associados ao desenvolvimento tumoral e mecanismos de resistência.

## 1.7 Translatômica

Grandes consórcios internacionais disponibilizam informações essenciais sobre expressões, mutações e número de cópias de genes envolvidos no desenvolvimento de diversos tumores. Os sequenciamentos de nova geração mais avançados atualmente avaliam a população geral de mRNAs, o que nem sempre condiz com os níveis finais de proteínas. A relação entre quantidades totais de mRNAs e de proteínas nem sempre ocorre de forma linear, pois depende de fatores biológicos, da abundância de transcritos, da eficiência da tradução, e também de características da proteína, como a meia-vida. Avaliar o perfil dos mRNAs traduzidos é a primeira etapa da translatômica, que estuda os elementos que participam da tradução, e oferece uma visão mais próxima do proteoma do que o transcriptoma (122–124).

A tradução de um transcrito é feita simultaneamente por vários ribossomos, sendo que quantidade de ribossomos ligados ao mRNA é proporcional à taxa de tradução – quanto mais ribossomos, mais ativa a tradução. É possível a separação dos mRNAs mais ou menos traduzidos através de um gradiente de sacarose com concentrações diferentes, onde os mRNAs livres não precipitam por serem muito leve e os polissomos (mRNAs ligados a vários ribossomos) (**Figura 5**) se depositam pelo gradiente de acordo com a sua densidade (125). Técnicas de sequenciamento de última geração ou *microarray* podem ser utilizadas para avaliar o perfil de mRNAs que estão sendo menos traduzidos (com um ou dois ribossomos ligados) daqueles ativamente traduzidos (com mais de três ribossomos ligados) (126). O perfil polissomal é uma técnica desenvolvida na década de 60 para separação de moléculas em um gradiente de sacarose. Devido à sua alta densidade, quanto mais ribossomos ligados a um mRNA, mais rapidamente esse complexo precipita no gradiente. Dessa forma, as amostras podem ser fracionadas e analisadas separadamente. Recentemente, foi publicada a padronização e otimização das técnicas de perfil polissomal e sequenciamento utilizados nos trabalhos do nosso grupo para a identificação dos mRNAs diferencialmente traduzidos em tumores humanos (127).



**Figura 5. Polirribossomo ou polissomos.**

(A) Ribossomos 80S traduzindo simultaneamente uma molécula de mRNA em células eucariotas. (B) Foto por microscopia eletrônica do polissomo na célula eucariota (128).

## 2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo é contribuir com informações sobre mecanismos envolvidos no controle traducional em carcinoma renal de células claras pela via de mTOR, por componentes do eixo VHL/HIF e pelo *cross-talk* entre ambos. Para isso, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Realizar a translômica em modelos celulares de CRCC para observar os diferentes perfis de expressão encontrados na ausência ou presença de VHL, avaliando a influência da via de mTOR em cada perfil;
- Revisar e atualizar o banco de dados de pacientes com CRCC;
- Determinar a taxa de tradução global dos tumores de CRCC pelo perfil polissomal e correlacionar com os dados clínicos dos pacientes;
- Avaliar a expressão de HIF-2 $\alpha$  nos tecidos de CRCC e correlacionar com dados clínicos dos pacientes.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Linhagens celulares

As linhagens celulares RCC4/Mock (RCC4/*empty vector* – RRID:CVCL\_UY81) e RCC4/VHL (RCC4/VHL – RRID:CVCL\_2706) utilizadas nos experimentos são células epiteliais humanas de carcinoma renal de células claras. RCC4/Mock é uma célula transfectada com um vetor pcDNA3, que confere resistência a neomicina, e RCC4/VHL é uma célula transfectada com o vetor pcDNA3-VHL, que confere resistência a neomicina e codifica o gene supressor de tumor *VHL* (129). As células foram mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) *High Glucose* (ThermoFisher Scientific) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (ThermoFisher Scientific), 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina), 1% de glutamina, e selecionadas com 150 µg/ml geneticina (G418), em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As linhagens celulares foram fornecidas pelo Dr. Ivan Topisirovic (Universidade McGill) e Dra. Laura Hulea (Universidade de Montreal).

#### 3.2 Obtenção de tecidos congelados

Os tecidos congelados foram obtidos do Biobanco de Tecidos Tumorais do Hospital A.C Camargo Cancer Center e mantidos a -80°C até o momento do processamento.

#### 3.3 Obtenção dos tecidos de PDX (*patient-derived xenograft*)

Os tecidos de PDX utilizados neste trabalho foram fornecidos pelo Dr. Tiago Góss e seu aluno de doutorado Adriano Oliveira, que padronizaram com sucesso um modelo de estudo de CRCC a partir de xenoenxertos em camundongos imunodeficientes (130). A metodologia consiste em implantar fragmentos de tumor de pacientes diretamente na cápsula renal de camundongos NSG (*Non-obese Diabetic Scid Gamma Mouse*). Após o crescimento do tumor, parte destas amostras foram criopreservadas e fornecidas para processamento neste projeto.

#### 3.4 Curva de crescimento

Para cada linhagem celular (RCC4/Mock e RCC4/VHL), foram plaqueadas  $8 \times 10^3$  células, em duplicata para cada dia de experimento, em placas de seis poços. As células foram plaqueadas em meio de cultura DMEM *High Glucose* no primeiro dia do experimento. No segundo dia, as células foram tratadas com 40 nM de rapamicina por 30 min seguido do tratamento com 10% de SFB por 2 h para estimular o crescimento após o bloqueio com a rapamicina. As células foram coradas com azul de metileno e contadas, de acordo com a viabilidade, em câmara de Neubauer por 5 dias para avaliar a taxa de crescimento. Apenas as células viáveis foram contadas.

### 3.5 Western Blot

Os extratos celulares foram fracionados por eletroforese em gel SDS-PAGE com diferentes porcentagens (de 8% a 13%), dependendo da proteína de interesse, com voltagem controlada de 80V por 20 min, utilizando tampão de corrida contendo Tris 25 mM, Glicina 191 mM (Sigma Aldrich), e 0,1% de SDS. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,45  $\mu$ m (GE Healthcare) em tampão Tris 25 mM, Glicina 191 mM, 0,1% SDS, 20% de metanol (Sigma Aldrich), com voltagem controlada de 100V por 1 h e 30 min. Após a transferência, a membrana foi bloqueada por 1 h com 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS-T (NaCl 150 mM, Tris 50 mM pH 7.4 e 0,1% Tween®). O anticorpo primário de escolha foi incubado *overnight* sob agitação a 4°C diluído em solução com 5% de BSA ou leite em pó desnatado (dependendo do anticorpo) em TBS-T. As membranas foram lavadas com TBS-T e o anticorpo secundário acoplado à peroxidase anti-Mouse ou anti-Rabbit (GE Healthcare) foi incubado por 1 h em temperatura ambiente na diluição de 1:2500 na solução de bloqueio. A membrana foi novamente lavada em TBS-T e revelada com kit de quimiluminescência (ThermoFisher Scientific) em filme fotográfico (GE Healthcare). A quantificação das bandas correspondentes às proteínas de interesse dos filmes foi realizada pelo software ImageJ e os gráficos gerados expressam a quantidade de proteína relativizada pelo controle de carregamento.

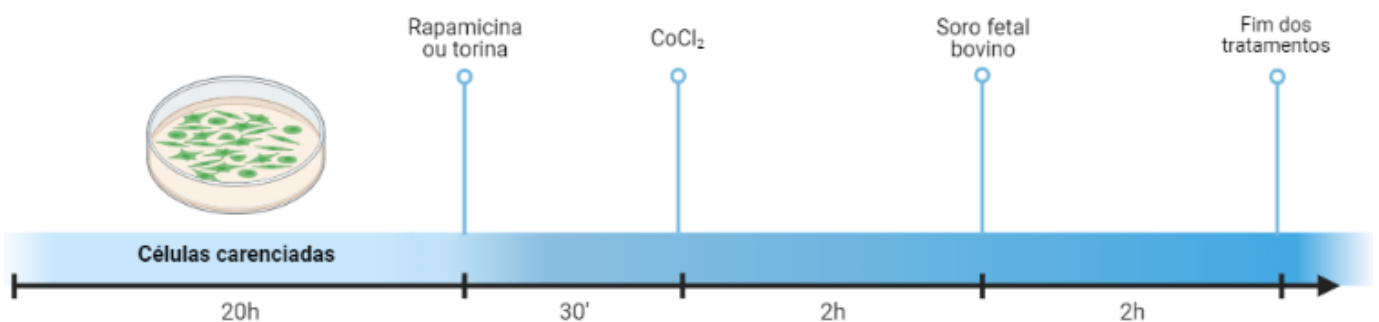
#### 3.5.1 *Via de mTOR*



A fosforilação de 4E-BP1, S6K e rps6 foi avaliada por *Western Blot*. As células RCC4/Mock e RCC4/VHL foram semeadas em uma placa de 150 mm até atingirem a confluência de 90%. Foram carenciadas por 20 h e tratadas apenas com o veículo (DMSO) ou com o veículo e 250 nm de rapamicina por 2h ou 16h e estimuladas com soro fetal bovino (SFB). A carência de soro é necessária para diminuir o aporte de nutrientes e sincronizar todas as células na mesma fase do ciclo celular antes do tratamento com rapamicina. Os mesmos tratamentos foram posteriormente utilizados para o perfil polissomal.

### 3.5.2 Via de mTOR e expressão de HIF-1 $\alpha$

As células RCC4 foram carenciadas *overnight* e, no dia seguinte, foram inicialmente tratadas com rapamicina ou torina por 30 min, seguido do tratamento com cloreto de cobalto (CoCl<sub>2</sub>) por 2 h. Para estimular a resposta das células, foi adicionado SFB e após 2 h de tratamento as células foram retiradas das placas e lisadas para os ensaios (**Figura 6**). Para cada tratamento foi adicionado uma amostra controle, além das amostras apenas carenciadas. A resposta a cada tratamento foi avaliada por *Western Blot* pela expressão de HIF-1 $\alpha$  e fosforilação de rpS6, alvo de mTOR.



**Figura 6. Tratamentos utilizados para avaliar proteínas da via de mTOR e HIF-1 $\alpha$ .**

Após o final dos tratamentos, as células foram retiradas das placas e passaram pelo processo de lise para realizar os experimentos de *western blot*. As células foram tratadas de acordo com a padronização do tempo de cada tratamento, de forma que nenhuma placa fosse submetida a um tempo maior do que o estipulado de cada um dos tratamentos.

## 3.6 Translatômica

### 3.6.1 *Processamento de linhagens celulares para perfil polissomal*

Após os tratamentos nas condições desejadas, 100 µg/µl de ciclohexamida (CHX) (Sigma-Aldrich) foram adicionados às células por 7 min. Em seguida, as placas foram lavadas duas vezes com PBS 1X gelado com 100 µg/µl de CHX. As células foram lisadas com tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 7.5 (Sigma Aldrich), 100 mM de KCl (Sigma Aldrich), 10 mM de MgCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich), 1% Triton X-100 (Sigma Aldrich), 1 mM de DTT (Sigma Aldrich), 100 µg/mL de CHX (Sigma-Aldrich), inibidor de protease (Promega) e Ribonucleoside Vanadyl Complex (24 µL por amostra) (Biolabs). As amostras foram incubadas no gelo por 15 min após adição do tampão de lise e centrifugadas a 14.000 RPM por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para a separação pelo perfil polissomal. 50 µl do sobrenadante foram coletados para a análise do RNA total.

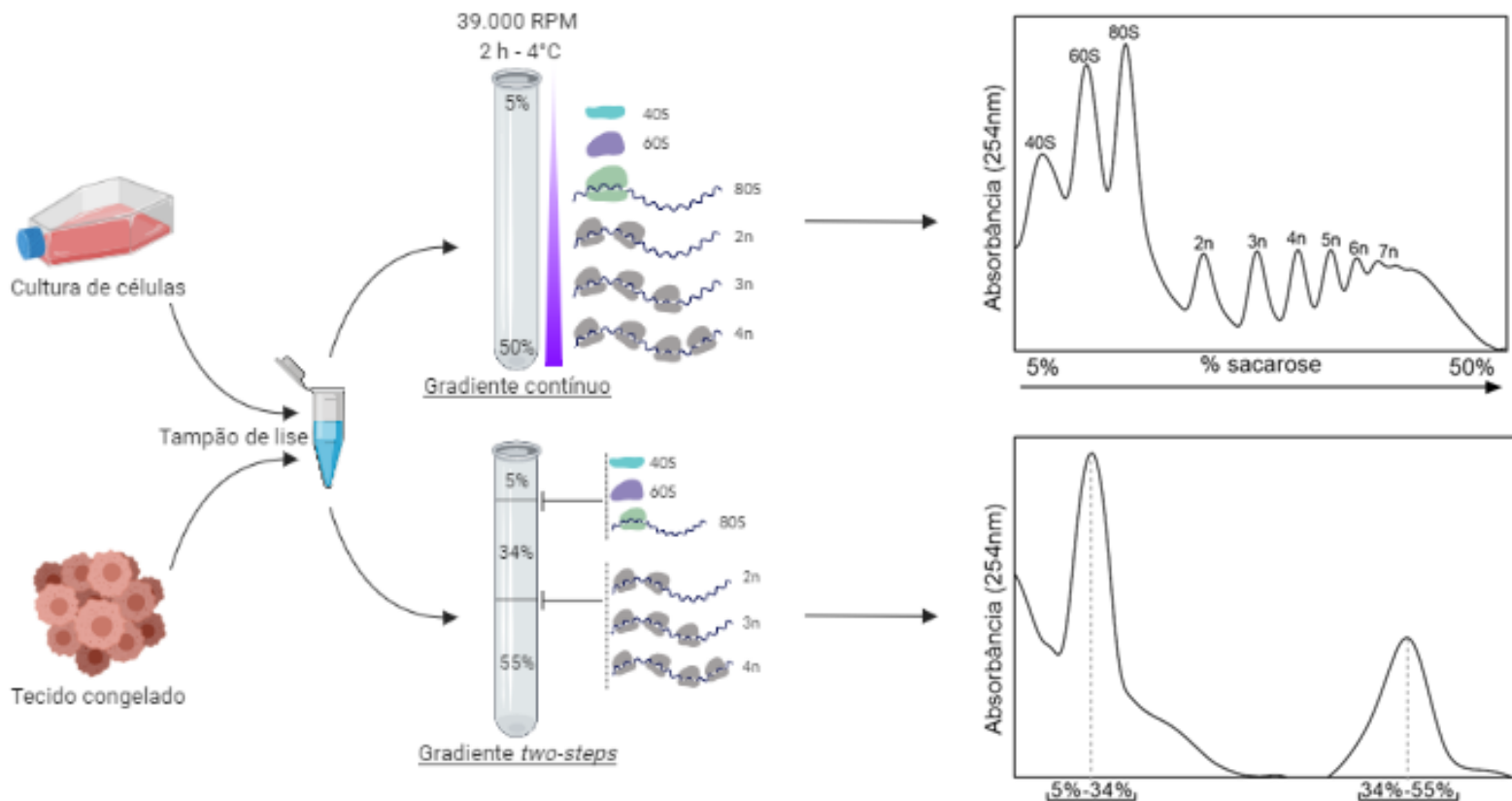
### 3.6.2 *Processamento de tecidos tumorais para perfil polissomal*

Os tecidos congelados obtidos foram homogeneizados no Polytron® (Kinematica – Modelo PT 10-35 GT) com 600 µl de tampão de lise hipotônico contendo 50 mM Tris-base pH 7,5 (Sigma-Aldrich), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM KCl, 116 µg/mL CHX, 2 mM DTT e Ribonucleoside Vanadyl Complex (24 µL por amostra) (Biolabs). Após homogeneização dos tecidos, foram adicionados 25 µl de Triton X-100 a 10% e 25 µl de deoxicolato de sódio a 10%. As amostras foram incubadas por 15 min no gelo e posteriormente centrifugados a 14.000 RPM por 3 min a 4°C. 50 µl do sobrenadante foram coletados para a análise de RNA total.

### 3.6.3 *Separação e fracionamento polissomal*

Os extratos obtidos das linhagens celulares foram aplicados em gradiente linear com concentrações de 5% a 50% de sacarose. O tampão preparado para o gradiente contém 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 mM DTT. Os extratos obtidos a partir das amostras de tecidos congelados foram submetidos a gradiente não linear contendo três concentrações diferentes de sacarose (5%, 34% e 55%) preparados em tampão contendo 20 mM HEPES, 100 mM KCl e 5 mM MgCl<sub>2</sub>. O fracionamento das amostras foi feito pela ultracentrifugação a 39.000 RPM por 2 h a 4°C no rotor SW41Ti (Beckman Coulter – Cat.

Number: 331362) (**Figura 7**). Essa centrifugação permite que mRNAs associados a ribossomos sejam separados dos mRNAs livres ou associados a poucos ribossomos sendo possível, dessa forma, isolar os mRNAs que estão sendo ativamente traduzidos.



**Figura 7. Representação dos dois diferentes tipos de gradientes utilizados para o perfil polissomal de células e amostras tumorais de pacientes.**

A primeira metodologia para separação de RNA polissomal é utilizada para avaliar o perfil polissomal em linhagens celulares. É realizada a lise celular e aplicação do extrato em gradiente de sacarose linear com concentrações contínuas que inicia em 5% e termina em 50%. Os gradientes são ultracentrifugados a 39.000 rpm por 2h. Dessa forma, é possível visualizar a formação de diferentes picos após a leitura da absorvância a 254 nm que correspondem aos picos das frações 40S e 60S do ribossomo, seguido do pico correspondente aos monossomos (80S) e a separação dos polissomos (ribossomos ligados a fitas de mRNA), onde pode-se observar os picos separadamente de acordo com sua densidade. A segunda metodologia foi adaptada para separação de polissomos em tecidos com pouco material. Neste gradiente é possível visualizar a formação de dois picos onde se encontram os monossomos (no primeiro pico) e os polissomos (no segundo pico). O protocolo foi desenvolvido pelo nosso grupo em colaboração com o laboratório do Dr. Ola Larsson no Instituto Karolinska e pode ser visualizado no link: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/104596v1>.

### 3.6.4 Quantificação da taxa de tradução global

No perfil polissomal é possível observar os picos formados a partir da absorvância das amostras através do gradiente de sacarose. Os dados gerados são plotados em uma planilha e o gráfico pode ser quantificado. Para quantificar, é utilizada a relação entre a área referente ao pico de 80S e a área referente aos polissomos, a partir de três ribossomos ligados a uma molécula de mRNA ( $\geq 3n$ ). Dessa forma, retiramos os picos com polissomos leves onde podem conter mRNAs menos comprometidos com a tradução ou que estejam no processo final da tradução. O gráfico gerado a partir do cromatograma foi quantificado pelo software ImageJ (<https://imagej.nih.gov>), que determina matematicamente os valores referentes às áreas abaixo das curvas de interesse a partir da criação de polígonos. Os valores gerados podem ser relativizados e a taxa de tradução pode ser inferida dessa forma.

### 3.6.5 Extração de RNA

As frações correspondentes ao mRNA polissomal e o mRNA total foram coletados e o material foi isolado usando TRIzol™ LS Reagent (ThermoFisher Scientific) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. O controle da qualidade do RNA extraído foi avaliado sistema Bioanalyzer (Agilent), onde foram consideradas as amostras com RIN de alta qualidade (*RNA Integrity Number* > 9).

### 3.6.6 Construção da biblioteca smart-seq2 e sequenciamento

Foram utilizados 10 ng de cada amostra de mRNA total e mRNA polissomal para preparar a biblioteca de sequenciamento de RNA pelo método de *single-cell* (131). O RNA foi incubado por 3 min a 72°C com oligo-dT30 para hibridação e em seguida foi realizada a síntese do cDNA com a enzima SuperScript™ II (Invitrogen), tampão fornecido pelo fabricante, 5mM de DTT, 1  $\mu$ M de TSO (*Template Switch Oligo*), 1 M de betaína, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> e 5U de inibidor de RNase (Promega) na seguinte reação: 42°C por 90 min, 10 ciclos de 50 °C por 2 min e 42 °C por 2 min, e 70 °C por 15 min. A pré-amplificação foi realizada em seguida com a enzima KAPA HiFi HotStart e os IS PCR na reação: 3 minutos a 98°C, 8 ciclos de 98°C por 20s, 67°C por 15s, 72°C por 6 minutos, e 72°C por 5 minutos. O cDNA pré-amplificado foi purificado utilizando beads AMPure XP (Beckman Coulter). 70 pg em volume final de 25  $\mu$ l de cada biblioteca de cDNA foram fragmentados utilizando o kit Nextera XT (Illumina). O pool de

amostras contendo a biblioteca de sequenciamento de RNA foi sequenciado utilizando Novaseq 6000 (National Genomics Infrastructure, SciLifeLab, Sweden) para obter leituras *pair-end* de 150 pares de base.

### 3.6.7 *Processamento dos dados do smart-seq2*

Os dados brutos do RNA-seq foram pré-processados usando o pipeline nf-core/rnaseq (v1.4.2) com configurações pré-definidas (132) e o genoma humano GRCh38. Para as análises, foram considerados apenas mRNAs codificadores de proteínas contendo pelo menos uma sequência de RNA em todas as amostras.

### 3.6.8 *Análise da eficiência da tradução utilizando anota2seq*

Para confirmar a qualidade do estudo, análises de componente principal (PCA) foram realizadas. O pacote anota2seq foi então utilizado para identificar mudanças na tradução de mRNA (alterações em mRNA polissomais que não são paralelas a alterações no mRNA total, denominado *translation*), alterações no mRNA total, mas sem alterações nos mRNAs polissomais (denominado *buffering*) e alterações no mRNA polissomal que acompanha as alterações no mRNA total (denominado *abundance*) (133,134).

## 3.7 Tissue microarray (TMA)

O TMA permite visualizar a expressão de proteínas em larga escala em tecidos tumorais a partir da confecção de uma única lâmina contendo centenas de amostras diferentes (*spots*), tornando o processo mais prático e menos custoso para as análises. Para confecção do TMA, os blocos de parafina e suas respectivas lâminas histológicas são selecionados e cada caso é analisado individualmente para demarcação da área com tecido tumoral de interesse. Utilizando o *Manual Tissue Microarrayer* (Beecher Instruments Microarray Technology, Silver Spring, USA), a área demarcada foi retirada por punção com agulha de 0,6 mm e cada cilindro obtido do bloco de parafina original, denominado doador, foi transferido para um bloco de parafina novo, denominado receptor. A partir do bloco receptor foram confeccionados cortes histológicos sequenciais de 0,4 um de espessura. A

amostra foi considerada satisfatória quando houve representação de pelo menos 10% da área tumoral na punção em observação microscópica.

### 3.7.1 *Reações de imuno-histoquímica no tissue microarray*

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas na Core Facility de Histologia-IHQ-TMA do Hospital AC Camargo Cancer Center no sistema automatizado Ventana BenchMark XT (Ventana Medical System) seguindo as instruções do fabricante. Como controle, as reações foram padronizadas em tecidos de tumor renal e tecido renal não neoplásico. As lâminas (4  $\mu\text{m}$  de espessura) foram desparafinizadas com a solução EZPrep (Ventana Medical System, Roche, cat. 950-102) e a recuperação antigênica foi realizada com o cell conditioning I (cat. 950-224) ou cell conditioning II (cat. 950-223, Ventana Medical Systems) a 95°C por 60 min. O anticorpo primário anti-HIF-2 $\alpha$  (Novus Biologicals – cat: NB100-122) foi incubado por 60 min na diluição de 1:200 + 1% ABS e o kit de detecção utilizado foi o OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical System) por 60 min. Após finalizar o ensaio de IHQ, as lâminas foram montadas com o meio de montagem Entellan (Merck – cat: 107961).

### 3.7.2 *Análise das reações*

As análises das reações de IHQ foram realizadas manualmente pela patologista Dra. Stephania Bezerra, sem conhecimento das informações clínicas de cada amostra analisada. Cada spot foi analisado individualmente e classificado quantitativamente em escala de 10% (com marcação negativa nos núcleos sendo 0% e marcação positiva em todos os núcleos sendo 100%) de acordo com a porcentagem de células com núcleos positivamente marcados com o anticorpo anti-HIF2 $\alpha$  no campo microscópico. Os *spots* foram analisados em duplicata para cada caso e a média aritmética dos dois *spots* foi utilizada nas análises estatísticas. Após determinar a média da porcentagem de marcação para cada paciente, os resultados foram plotados em uma tabela para determinar o ponto de corte ideal para categorizar a casuística em dois grupos, um com baixa expressão de HIF-2 $\alpha$  e um com alta expressão de HIF-2 $\alpha$ . Para isso, o *p*-valor foi determinado para as seguintes categorias: 20%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60% e 65% de marcação de HIF-2 $\alpha$  no núcleo. A partir destes testes, determinamos o melhor ponto

de corte sendo 60% e, dessa forma, nossa casuística foi separada entre os grupos baixo (com marcação nuclear entre 0 e 60%) e alto (com marcação nuclear acima de 60%).

### 3.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo software *GraphPad Prism 8*, pelo software *Statistical Package for Social Science (SPSS)* versão 28.0 e pelo R. Para as análises paramétricas entre variáveis nominais e variáveis qualitativas foram utilizados o teste *t* de Student para comparar dois grupos, e o teste de análise de variância (ANOVA) one- ou two-way, a depender da quantidade de grupos testados. Quando necessárias, as comparações múltiplas foram realizadas pelo teste de Tukey. Para as análises não-paramétricas entre variáveis nominais e quantitativas foram utilizados o teste de Mann-Whitney para comparações entre dois grupos não pareados e o teste de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas pelo teste de Bonferroni quando necessário. As distribuições das frequências absoluta e relativas das variáveis foram reportadas em forma de tabela e estão detalhadas na seção 'casuística'. Para comparar a expressão de HIF-2 $\alpha$  nos tecidos neoplásicos e tecidos adjacentes ao tumor, foi realizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Para definir o ponto de corte para a categorização da variável HIF-2 $\alpha$ , foi utilizado o pacote *maxstat*<sup>1</sup> e o método *survfit* do pacote *survival*<sup>2</sup> com parâmetros padrões. Para avaliar associações entre a expressão categorizada baixa ou alta de HIF-2  $\alpha$  com características clínicas e anatomopatológicas dos pacientes foi utilizado o teste de Qui-quadrado de Pearson (para casos que não obedeceram ao pré-requisito de uma frequência observada superior a 5 foi utilizado o teste exato de Fisher). Análises univariadas relacionadas à sobrevida global e sobrevida livre de progressão foram realizadas para identificar as variáveis que foram incluídas no modelo de regressão de Cox simples e múltiplo. As análises de sobrevivência global e sobrevivência livre de progressão foram realizadas pela estimativa de Kaplan-Meier com comparações pelo teste de Log-Rank. Pacientes que perderam seguimento foram incluídos na curva de sobrevida até a última data disponível e apresentados como censura. Para todos os testes utilizados, foi utilizado um nível de significância de 0,05.

---

<sup>1</sup> <https://cran.r-project.org/web/packages/maxstat/vignettes/maxstat.pdf>

<sup>2</sup> <https://cran.r-project.org/web/packages/survival/survival.pdf>

## 4. CASUÍSTICA

### 4.1 Perfil Polissomal

#### 4.1.1 *Critérios de Inclusão*

Para realizar o perfil polissomal e comparar as taxas de tradução global com características clínicas, foram incluídos 116 casos de pacientes com diagnóstico final de carcinoma renal de células claras no laudo patológico, com prontuário eletrônico disponível no A.C Camargo Cancer Center e que aceitaram previamente participar do estudo. O acompanhamento clínico dos pacientes foi de, no mínimo, cinco anos a partir da data de início deste projeto. Os pacientes foram selecionados de acordo com seu estadiamento tumoral no momento do primeiro diagnóstico.

#### 4.1.2 *Critérios de exclusão*

Foram excluídas amostras de pacientes que não possuíam prontuário disponível ou acompanhamento clínico de, pelo menos, cinco anos da data de início desse projeto, pacientes sem amostra disponível no BioBanco de Tecidos Tumoriais do A.C Camargo Cancer Center e pacientes diagnosticados com outros sítios de tumor primário.

#### 4.1.3 *Pacientes*

Os dados dos pacientes foram coletados de seus prontuários disponíveis no H2TC, um sistema de prontuário eletrônico do Hospital AC Camargo Cancer Center. Este estudo tem caráter retrospectivo e não ocorreu nenhuma interação direta com os pacientes do estudo, sendo assim, não foi necessário adotar o termo de consentimento pós-informado. Os dados coletados dos prontuários foram revisados e os dados foram armazenados usando a ferramenta de captura de dados eletrônica REDCap (*Research Electronic Data Capture*)<sup>3</sup>

---

<sup>3</sup> REDCap é um aplicativo seguro, hospedado na web, projetado para apoiar a captura de dados em estudos de pesquisa, fornecendo 1) uma interface intuitiva para a entrada de dados validados; 2) auditoria para



(135,136) hospedados no servidor do Hospital AC Camargo Cancer Center. As variáveis analisadas nesta casuística foram: idade, sexo, estadiamento clínico, estadiamento patológico pelo TNM AJCC/UICC 2017, grau histológico tumoral ISUP (*International Society of Urological Pathology*), presença de metástase sincrônica no primeiro diagnóstico, comprometimento de linfonodos, recorrência/recidiva, componente sarcomatoide, invasão perineural, invasão vascular microscópica, necrose tumoral, situação do paciente ao final do estudo e o tempo de seguimento desde o primeiro diagnóstico até o final do estudo. As amostras utilizadas neste estudo são de material congelado que estavam disponíveis no Biobanco de Tecidos Tumoriais do Hospital AC Camargo Cancer Center, não havendo nenhum prejuízo ao paciente. O projeto está inscrito no Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente no AC Camargo Cancer Center sob o número 2440/17B como projeto afiliado no projeto temático intitulado “Controle Traducional no Carcinoma Renal de Células Claras” registrado no mesmo Comitê de Ética e Pesquisa sob o número 2440/17.

A casuística é composta por 116 pacientes no total, que foram separados por estadiamento clínico no primeiro diagnóstico, sendo 41 pacientes de estadiamento I, 13 pacientes de estadiamento II, 48 pacientes de estadiamento III e 14 pacientes de estadiamento IV. Destes, 57% são do sexo masculino e 43% do sexo feminino. A idade média dos pacientes é de 56 anos, sendo o paciente mais jovem com idade de 25 anos e o paciente mais idoso com 83 anos. Nesta casuística, cerca de 36% dos pacientes apresentaram recidiva da doença após tempo médio de 3 anos e seis meses e 21% dos pacientes apresentaram outra neoplasia além do CRCC.

O ISUP foi coletado dos prontuários eletrônicos de cada paciente e nesta casuística não houveram pacientes com grau histológico tumoral ISUP 1; 34,1% dos pacientes apresentaram ISUP 2, 46,3% dos pacientes apresentaram ISUP 3, e 19,5% dos pacientes apresentaram ISUP grau 4. Quanto ao tratamento, todos os pacientes incluídos nesta casuística foram submetidos a nefrectomia parcial ou total, com uma taxa de cura de 63%. 13,8% foram submetidos a radioterapia e 18,1% receberam tratamento com inibidores de tirosina-quinase. Das características anatomopatológicas, 3,7% dos pacientes apresentaram componente sarcomatoide, 3,5% apresentaram invasão perineural, 4,4% apresentaram invasão vascular

---

rastreamento de manipulação e exportação de dados; 3) exportação automatizada dos dados para pacotes estatísticos; e 4) procedimentos para importação de dados de fontes externas. – *Texto retirado e traduzido de <https://projectredcap.org/resources/citations/>*

linfática, 16,7% apresentaram invasão vascular sanguínea, e 64% apresentaram necrose (Tabela 1).

**Tabela 1. Características clínicas e anatomopatológicas dos pacientes da casuística.**

<b>Variável</b>	<b>Categoria</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Idade</b>	≤ 40	14	12,1
	41 a 64	78	67,2
	≥ 65	24	20,7
	<b>Total</b>	<b>116</b>	<b>100</b>
<b>Sexo</b>	Masculino	66	56,9
	Feminino	50	43,1
	<b>Total</b>	<b>116</b>	<b>100</b>
<b>Estadiamento Clínico</b>	I	41	36
	II	13	10,8
	III	48	40,5
	IV	14	12,6
	<b>Total</b>	<b>116</b>	<b>100</b>
<b>Estadiamento Clínico</b>	Baixo	54	46,8
	Alto	62	53,2
	<b>Total</b>	<b>116</b>	<b>100</b>
<b>ISUP</b>	2	28	34,1
	3	38	46,3
	4	16	19,5
	<b>Total</b>	<b>82</b>	<b>100</b>
<b>ISUP</b>	1 e 2	28	34,1
	3 e 4	54	65,9
	<b>Total</b>	<b>82</b>	<b>100</b>
<b>Recidiva</b>	Não	64	63,4
	Sim	37	36,6
	<b>Total</b>	<b>101</b>	<b>100</b>
<b>Estadiamento patológico (pT)</b>	T1	42	36,2
	T2	13	11,2
	T3	59	50,9
	T4	2	1,7
	<b>Total</b>	<b>116</b>	<b>100</b>
<b>Estadiamento patológico (pT)</b>	T1 e T2	55	47,4
	T3 e T4	61	52,6
	<b>Total</b>	<b>116</b>	<b>100</b>
<b>Comprometimento de linfonodos</b>	Nx / N0	112	96,6
	N1	4	3,4
	<b>Total</b>	<b>116</b>	<b>100</b>
<b>Componente Sarcomatoide</b>	Não	78	96,3
	Sim	3	3,7

	<b>Total</b>	<b>81</b>	<b>100</b>
Invasão perineural	Não	110	96,5
	Sim	4	3,5
	<b>Total</b>	<b>114</b>	<b>100</b>
Invasão vascular linfática	Não	108	95,6
	Sim	5	4,4
	<b>Total</b>	<b>113</b>	<b>100</b>
Invasão vascular sanguínea	Não	95	83,3
	Sim	19	16,7
	<b>Total</b>	<b>114</b>	<b>100</b>
Necrose	Não	30	36,1
	Sim	53	63,9
	<b>Total</b>	<b>83</b>	<b>100</b>
Histórico familiar de câncer	Não	29	34,5
	Sim	55	65,5
	<b>Total</b>	<b>84</b>	<b>100</b>
Outra neoplasia	Não	86	78,9
	Sim	23	21,1
	<b>Total</b>	<b>109</b>	<b>100</b>
Status sobrevida	Vivo	92	79,3
	Morto	24	20,7
	<b>Total</b>	<b>116</b>	<b>100</b>
Radioterapia	Não	100	86,2
	Sim	16	13,8
	<b>Total</b>	<b>116</b>	<b>100</b>
Terapia Alvo	Não	95	81,9
	Sim	21	18,1
	<b>Total</b>	<b>116</b>	<b>100</b>

---

## 4.2 Tissue Micro-Array

### 4.2.1 *Critérios de inclusão*

Foram incluídos pacientes com Carcinoma Renal de Células Claras comprovados pela histologia, submetidos a nefrectomia parcial ou radical, que não foram submetidos a tratamento prévio, com prontuários disponíveis no H2TC e que aceitaram participar do estudo previamente.

### 4.2.2 *Critérios de exclusão*

Pacientes com outras neoplasias renais diferentes do CRCC, amostras com presença excessiva de fibrose no material do TMA, pacientes sem amostra disponível em bloco de parafina e pacientes diagnosticados com outros sítios de tumor primário.

### 4.2.3 *Pacientes*

Os dados dos pacientes foram coletados de seus prontuários disponíveis no H2TC, um sistema de prontuário eletrônico do Hospital AC Camargo Cancer Center, após aprovação prévia de participação no estudo. Estes dados foram coletados e mantidos em tabelas do Excel, e foram utilizados em outros projetos de pós-graduação no Departamento de Urologia do Hospital AC Camargo Cancer Center. As amostras dos pacientes foram organizadas em *tissue microarrays* (TMA) (seção 7 apresentada na metodologia) e os blocos de parafina estão arquivados no Departamento de Anatomia Patológica sob supervisão da Dra. Stephania Bezerra, médica patologista da instituição. Por ser um estudo retrospectivo, o TCLE foi previamente assinado pelos pacientes. Os dados coletados dos prontuários foram revisados, as tabelas já existentes foram atualizadas e os dados foram armazenados usando a ferramenta de captura de dados eletrônica REDCap (135,136) hospedados no servidor do Hospital AC Camargo Cancer Center. As variáveis analisadas nessa casuística foram: idade, sexo, histórico familiar de câncer, estadiamento clínico, estadiamento patológico pelo TNM AJCC/UICC 2017, grau histológico tumoral ISUP (*International Society of Urological Pathology*), presença de metástase sincrônica no primeiro diagnóstico, comprometimento de linfonodos,

recorrência/recidiva, componente sarcomatoide, invasão perineural, invasão vascular microscópica, necrose tumoral, situação do paciente ao final do estudo e o tempo de seguimento desde o primeiro diagnóstico até o final do estudo. Este estudo tem caráter retrospectivo e não ocorreu nenhuma interação direta com os pacientes do estudo, sendo assim, não foi necessário adotar o termo de consentimento pós-informado. As amostras utilizadas neste estudo são de material arquivado em blocos de parafina no Hospital AC Camargo Cancer Center, não havendo nenhum prejuízo ao paciente. O projeto está inscrito no Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente no AC Camargo Cancer Center sob o número 2440/17B como projeto afiliado no projeto temático intitulado “Controle Traducional no Carcinoma Renal de Células Claras” registrado no mesmo Comitê de Ética e Pesquisa sob o número 2440/17.

A casuística é composta por 728 pacientes no total, sendo 457 (62,7%) pacientes do sexo masculino e 271 (37,2%) pacientes do sexo feminino, com idade entre 21 e 89 anos, sendo a mediana de 56 anos. Para fins de análise, a idade dos pacientes foi redefinida para uma variável categórica com três grupos: 96 pacientes com até 40 anos (13,2%), 481 pacientes com idade entre 41 e 64 anos (66,1%) e 151 pacientes maiores de 65 anos (20,7%). Cerca de 15% dos pacientes sem metástase sincrônica com primeiro diagnóstico apresentaram recidiva da doença após tempo médio de 3 anos e 9 meses, e 31% dos pacientes apresentaram uma outra neoplasia diferente do CRCC em algum momento. ´

O estadiamento patológico é definido pelo patologista responsável que libera o resultado no prontuário anatomopatológico, disponível no H2TC, e pode ser dividido em 4 categorias: 478 pacientes apresentaram tumores de estadiamento I (65,6%), 56 pacientes apresentaram tumores de estadiamento II (7,1%), 116 pacientes apresentaram tumores de estadiamento III (16,3) e 62 pacientes foram diagnosticados com tumores de grau IV (8,7%). 3% (12) pacientes apresentaram ISUP 1, 50,7% (206) pacientes apresentaram ISUP 2, 34,7% (141) pacientes apresentaram ISUP grau 3 e 11,6% (47) pacientes apresentaram ISUP 4. Dos pacientes confirmados com a doença metastática após a biópsia, cerca de 88% haviam sido diagnosticados com metástases ainda no exame clínico.

Quanto ao tratamento, todos os pacientes incluídos neste estudo foram submetidos a nefrectomia parcial ou total entre 1990 e 2016, com uma taxa de cura de 72%. Dos pacientes que receberam outro tratamento além da cirurgia, 8,2% foram submetidos a radioterapia e 10,2% receberam inibidores de tirosina-quinase.

Das características anatomopatológicas, 3% dos pacientes apresentaram componente sarcomatoide, 1,7% apresentaram invasão perineural, 3,5% apresentaram invasão vascular linfática, 9,22% apresentaram invasão vascular sanguínea, e 44,6% apresentaram necrose (Tabela 2).

**Tabela 2. Variáveis clínicas e anatomopatológicas de pacientes da casuística.**

<b>Variável</b>	<b>Categoria</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Idade</b>	≤ 40	96	13,2
	41 a 64	481	66,1
	≥ 65	151	20,7
	<b>Total</b>	<b>728</b>	<b>100</b>
<b>Sexo</b>	Masculino	457	62,8
	Feminino	271	37,2
	<b>Total</b>	<b>728</b>	<b>100</b>
<b>Estadiamento Clínico</b>	I	478	67,1
	II	56	7,9
	III	116	16,3
	IV	62	8,7
	<b>Total</b>	<b>712</b>	<b>100</b>
<b>Estadiamento Clínico</b>	Baixo	534	73,3
	Alto	178	26,7
	<b>Total</b>	<b>712</b>	<b>100</b>
<b>ISUP</b>	1	12	3
	2	206	50,7
	3	141	34,7
	4	47	11,6
	<b>Total</b>	<b>406</b>	<b>100</b>
<b>ISUP</b>	Baixo	218	53,7
	Alto	188	46,3
	<b>Total</b>	<b>406</b>	<b>100</b>
<b>Recidiva</b>	Não	544	84,6
	Sim	99	15,4
	<b>Total</b>	<b>643</b>	<b>100</b>
<b>Estadiamento patológico (pT)</b>	T1a	338	46,4
	T1b	162	22,2
	T2a	52	7,1
	T2b	11	1,5
	T3a	132	18,1
	T3b	17	2,3

	T3c	3	0,4
	T4	11	1,5
	<b>Total</b>	<b>726</b>	<b>100</b>
<b>Estadiamento patológico (pT)</b>	T1	500	68,9
	T2	63	8,7
	T3	152	20,9
	T4	11	1,5
	<b>Total</b>	<b>726</b>	<b>100</b>
<b>Estadiamento patológico (pT)</b>	T1 e T2	563	77,5
	T3 e T4	163	22,5
	<b>Total</b>	<b>726</b>	<b>100</b>
<b>Metástase sincrônica</b>	Não	656	92,3
	Sim	55	7,7
	<b>Total</b>	<b>711</b>	<b>100</b>
<b>Comprometimento linfonodal</b>	Nx/N0	703	97,4
	N1	19	2,6
	<b>Total</b>	<b>722</b>	<b>100</b>
<b>Componenete Sarcomatoide</b>	Não	575	97
	Sim	18	3
	<b>Total</b>	<b>593</b>	<b>100</b>
<b>Invasão perineural</b>	Não	646	98,3
	Sim	11	1,7
	<b>Total</b>	<b>657</b>	<b>100</b>
<b>Invasão vascular linfática</b>	Não	661	96,5
	Sim	24	3,5
	<b>Total</b>	<b>685</b>	<b>100</b>
<b>Invasão vascular sanguínea</b>	Não	630	90,8
	Sim	64	9,2
	<b>Total</b>	<b>694</b>	<b>100</b>
<b>Necrose</b>	Não	232	55,4
	Sim	187	44,6
	<b>Total</b>	<b>419</b>	<b>100</b>
<b>Histórico familiar de câncer</b>	Não	149	33,3
	Sim	299	66,7
	<b>Total</b>	<b>448</b>	<b>100</b>
<b>Status último seguimento</b>	Vivo sem doença	528	72,6
	Vivo com doença	79	10,9
	Morte por câncer	89	12,2
	Morte não câncer	25	3,4
	Vivo status desconhecido	5	0,7

	Morte status desconhecido	1	0,1
	<b>Total</b>	<b>727</b>	<b>100</b>
<b>Radioterapia</b>	Não	669	91,8
	Sim	60	8,2
	<b>Total</b>	<b>729</b>	<b>100</b>
<b>HIF2a Cutoff60%</b>	<=60	357	60,8
	>60	230	39,2
	<b>Total</b>	<b>587</b>	<b>100</b>

---



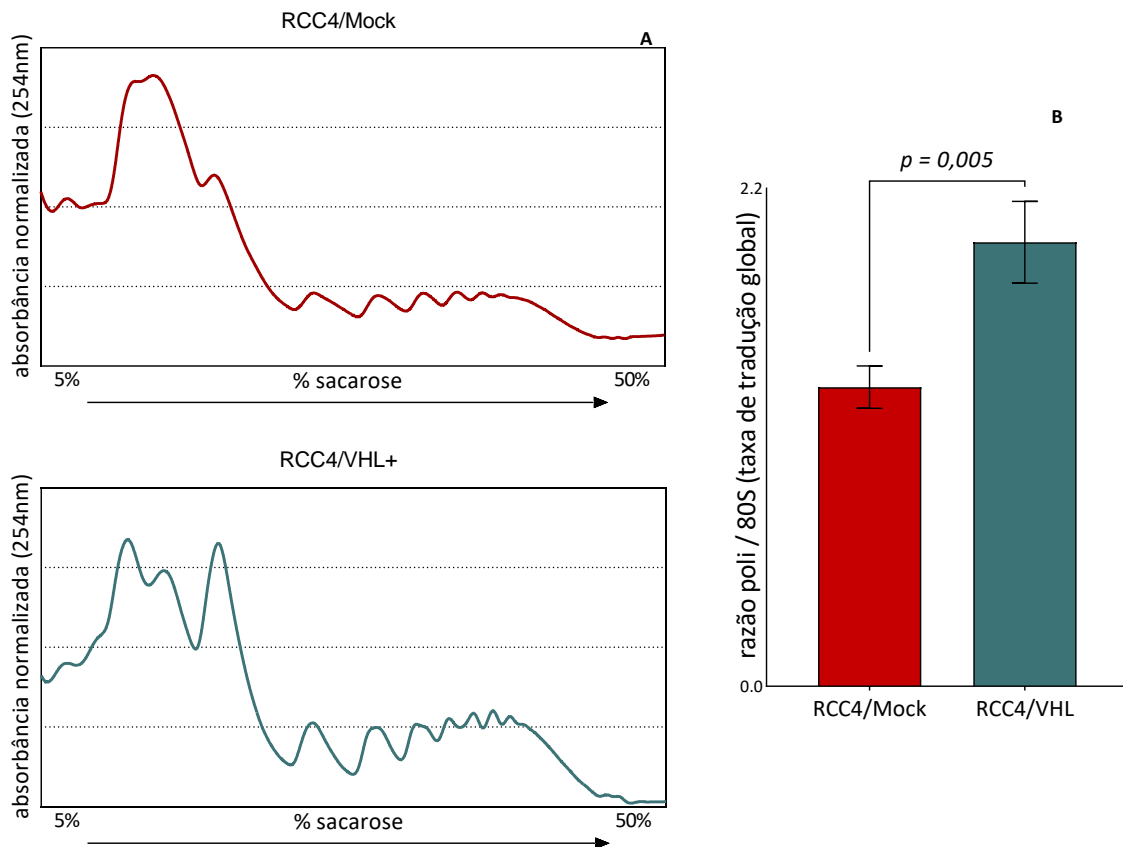
## 5. RESULTADOS

Os resultados desta tese estão separados em três tópicos: No primeiro tópico estão os experimentos com linhagens celulares e tecidos obtidos de xenoinxertos derivado de pacientes (PDX) com CRCC. Nas linhagens celulares foi possível observar as alterações no transloma dependentes do status de VHL. Também usamos o tratamento com rapamicina para observar as alterações que ocorrem em cada célula frente a inibição de mTORC1, um dos principais reguladores do controle da tradução. O PDX permite estudar o desenvolvimento tumoral e a resposta a diferentes tratamentos *in vivo*, de acordo com as características individuais de cada paciente. Até o momento, estão apresentadas as taxas de tradução global obtidas do perfil polissomal dos tecidos e a correlação com dados clínicos dos pacientes. No segundo tópico estão os resultados da correlação da tradução global com características clínicas de pacientes com CRCC. 116 amostras disponíveis no Biobanco do AC Camargo Cancer Center foram coletadas e processadas para obter as taxas de tradução global de cada paciente. Essas amostras serão enviadas para sequenciamento para uma análise mais aprofundada do transloma de pacientes com CRCC. O terceiro tópico inclui a expressão nuclear de HIF-2 $\alpha$  em amostras tumorais de CRCC. HIF-2 $\alpha$  é uma proteína importante no controle transcricional e traducional na deficiência de VHL. O estudo desta proteína vem crescendo na última década e seu papel tem sido relacionado com o desenvolvimento tumoral no CRCC. Com uma robusta casuística, obtemos resultados confiáveis da expressão de HIF-2 $\alpha$  no tecido primário dos pacientes com CRCC e correlacionamos com características clínicas importantes para a progressão tumoral, além de avaliar seu papel nos desfechos clínicos.

## 5.1 Modelos de linhagens celulares e PDX de Carcinoma Renal de Células Claras

### 5.1.1 *Perfil polissomal de linhagens celulares de CRCC*

Apesar da descoberta de mecanismos que favorecem a progressão tumoral do CRCC, pouco se sabe sobre o desbalanço do controle traducional neste tipo de tumor. Uma vez que a principal alteração molecular encontrada em tumores renais de células claras é a perda do supressor tumoral VHL (9), nosso objetivo foi observar o translatoma de linhagens celulares de CRCC na presença ou ausência deste gene. VHL é o principal regulador da resposta a hipóxia, onde diversas adaptações celulares ocorrem para manter a sobrevivência das células que estão em baixos níveis de oxigênio (137). Inicialmente, foi realizado um experimento piloto das linhagens celulares RCC4/Mock (célula deficiente em VHL) e RCC4/VHL (célula com VHL restituído). Essa etapa é importante para determinar a quantidade de material necessária para o experimento e ao mesmo tempo garantir que a confluência da placa não altere mecanismos de crescimento celular. As linhagens foram mantidas em cultura sob condições normais de crescimento, sem nenhum tipo de tratamento realizado previamente, e o perfil polissomal foi realizado para determinar as taxas de tradução global. As amostras foram processadas e submetidas a ultracentrifugação em um gradiente de sacarose contínuo com concentrações entre 5% e 50% para separação das frações não traduzidas daquelas com tradução ativa. No gráfico gerado pela leitura da absorbância, é possível observar picos bem definidos referentes aos monossomos e polissomos (**Figura 8A**). Dessa forma, podemos relativizar a área sob os picos de interesse e inferir a taxa de tradução global de cada célula. Já nessa etapa, foi possível observar que a perda de VHL afeta a tradução (**Figura 8B**).



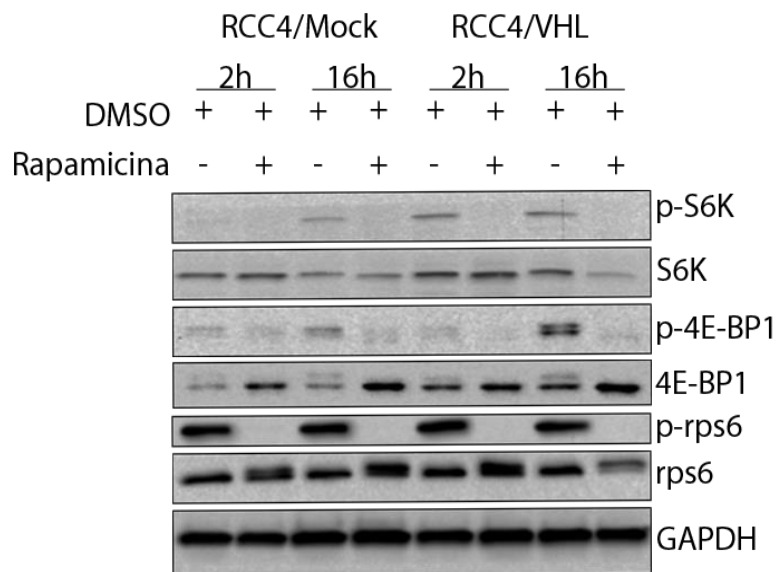
**Figura 8. Perfil polissomal e quantificação da taxa de tradução das linhagens celulares de CRCC.**

As células RCC4/Mock e RCC4/VHL foram semeadas em placas de 150 mm e após atingirem confluência de aproximadamente 90%, foi realizado o perfil polissomal. Após ultracentrifugação à 39.000 rpm por 2h à 4°C do extrato celular em gradiente de sacarose com concentrações entre 5% e 50%, as amostras foram fracionadas e os gráficos gerados a partir da absorbância normalizada de cada amostra foram quantificados para determinar a taxa traducional das células. (A) Perfil polissomal das células RCC4/Mock e RCC4/VHL sem tratamento. (B) Taxa traducional das células renais representadas pela média e desvio padrão. Quantificação da área do pico de 80S e de polissomos pelo ImageJ. As figuras foram geradas a partir de três experimentos distintos. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste *t* de Student para amostras independentes.

### 5.1.2 *Análise das taxas de tradução global, ativação da via de mTOR e crescimento celular das linhagens celulares de CRCC*

Durante o experimento piloto, observamos diferenças intrínsecas na tradução global das células dependendo do status de VHL. Como inibidores da via de mTOR são utilizados como segunda linha de tratamento para pacientes com CRCC (138) e mTOR é uma proteína chave no controle traducional, verificamos como esta proteína atua frente à presença ou ausência de VHL. mTOR é formado por dois complexos, mTORC1 e mTORC2. A rapamicina age em mTORC1, inibindo a fosforilação de S6K e 4E-BP1, afetando a tradução global e específica

de diversos genes (139). Por isso, avaliamos por *western blot* a expressão das proteínas alvo de mTORC1 após o tratamento com rapamicina. Confirmando a eficácia do tratamento, como esperado, ocorreu a desfosforilação das proteínas alvo de mTORC1: S6K, rpS6 e 4E-BP1 (**Figura 9**). As comparações realizadas entre as linhagens celulares foram feitas em dois tempos diferentes (2h e 16h) para avaliar mudanças agudas e crônicas das células.



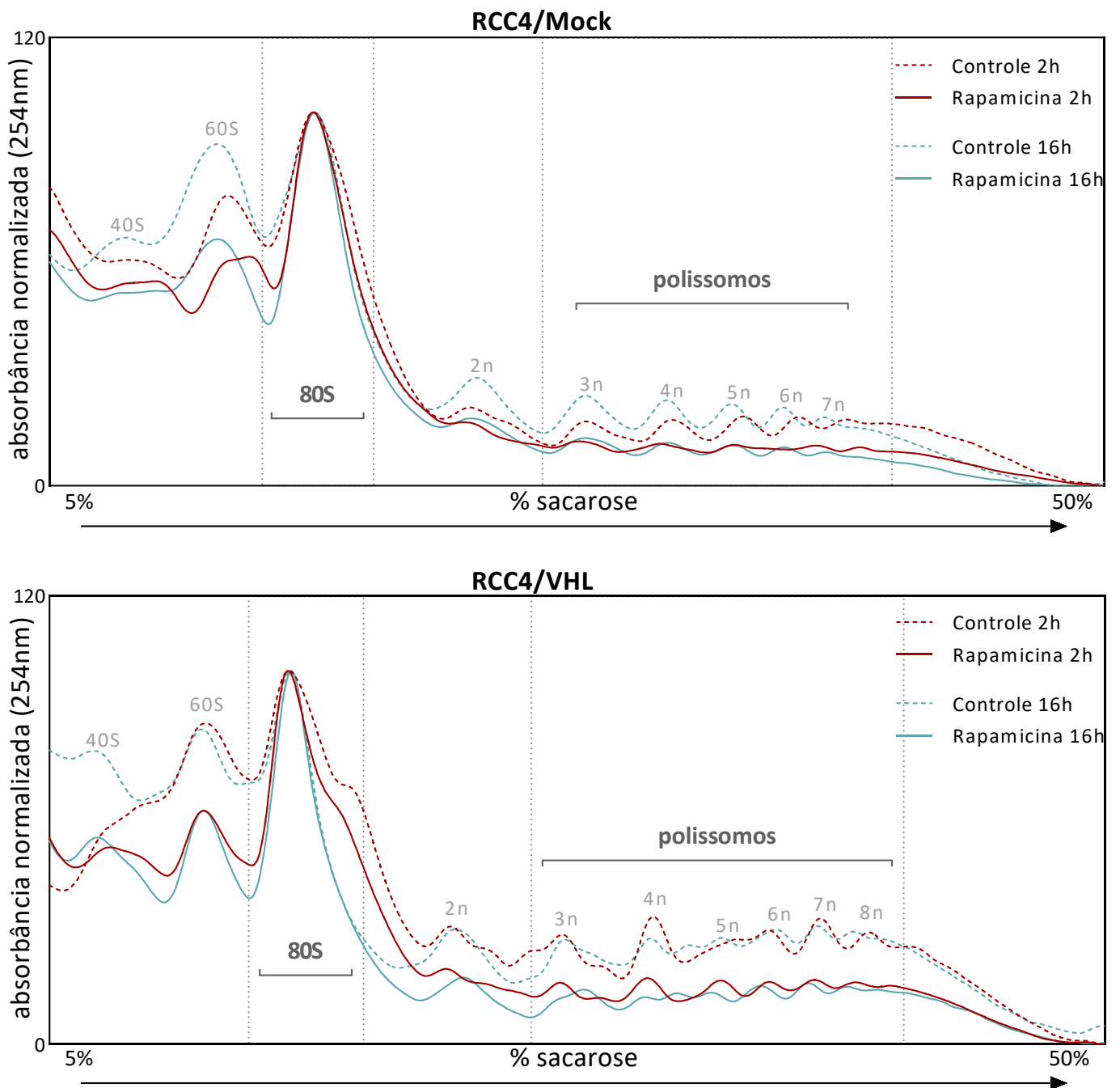
**Figura 9. Expressão e fosforilação de proteínas da via de mTOR em células renais.**

As células RCC4/Mock e RCC4/VHL foram carenciadas e tratadas com rapamicina (250 nM) por 2h e 16h para avaliar a inibição da via de mTOR nas células pelo tratamento. Em paralelo, as células foram tratadas apenas com o veículo (DMSO) para serem usadas como controle. O extrato de cada célula foi fracionado por eletroforese em gel de SDS-Page em diferentes concentrações a depender da proteína.

As células tratadas com rapamicina foram utilizadas para a realização dos perfis polissomais. A partir do perfil polissomal, além de determinar e comparar as taxas de tradução global entre as duas linhagens celulares, podemos avaliar como o status de VHL-HIF-mTOR interfere na tradução específica após o sequenciamento. As células foram carenciadas *overnight* e tratadas com rapamicina e soro fetal bovino por 2h ou 16h. Os extratos das amostras foram submetidos a ultracentrifugação para separar a população de mRNAs ativamente traduzidos. Na **figura 10** observamos a diminuição dos picos referentes aos polissomos nas duas linhagens celulares comparados com as células controle não tratadas ao longo do tempo, indicando que a rapamicina inibiu a tradução global tanto na fase aguda quanto na fase crônica. Apesar do efeito em ambas linhagens, as células RCC4/VHL foram mais

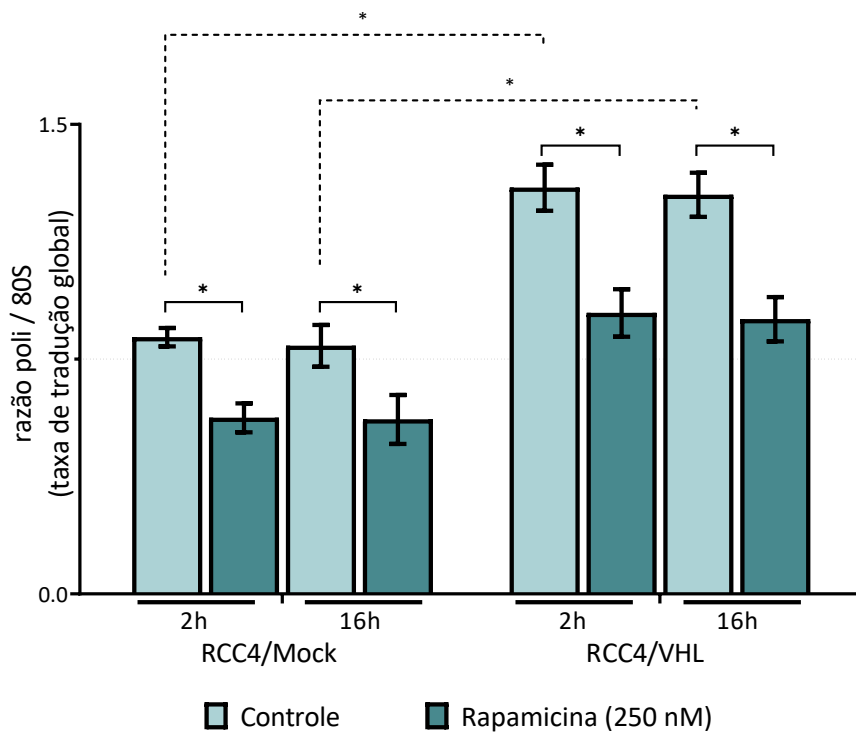
sensíveis ao tratamento com rapamicina, sugerindo que outros mecanismos podem estar ativados nas células RCC4/Mock para compensar a inativação de mTORC1, mantendo a tradução específica de genes necessários para a sobrevivência celular (**Figura 11**). Células com VHL mutado possuem autofagia basal alta, o que pode garantir o crescimento sob estresse (140). DEPTOR e mTOR fazem parte dos complexos mTORC1 e mTORC2, e trabalham em conjunto mantendo a homeostase. O aumento de HIF- $\alpha$  em carcinomas renais é capaz de suprimir a ação de DEPTOR, conferindo ativação da via *downstream* (141).

Assim como observado na **figura 9**, a tradução global nas células RCC4/VHL é maior quando comparadas às células RCC4/Mock mesmo apenas na presença de soro. Essa diferença na taxa de tradução global das células renais pode ser explicada pela ativação constitutiva de HIF- $\alpha$  nas células RCC/Mock. O acúmulo de HIF-1 $\alpha$  inibe mTORC1 via REDD1 (142), induzindo a parada do ciclo celular (143). Além disso, células com VHL mutado também podem apresentar níveis reduzidos de p53 e da *RNA-binding protein* HuR (*Human antigen R*). HuR, na presença de VHL, se associa ao mRNA de p53 no citoplasma da célula, aumentando sua tradução. Quando alterados, os níveis de *RNA-binding proteins* podem interferir nas taxas de tradução global e/ou específica (144,145).



**Figura 10. Perfil polissomal de linhagens celulares de CRCC após tratamento com rapamicina.**

As células RCC4/Mock e RCC4/VHL foram tratadas com rapamicina (250 nM) e/ou apenas com o veículo para controle (DMSO) por 2h e 16h, após carência de SFB por 20h. Os extratos celulares foram centrifugados à 39.000 RPM por 2h à 4°C em gradiente de sacarose contínuo com concentrações entre 5% e 50% e as amostras foram fracionadas (colocar o aparelho aqui). Os gráficos gerados a partir da absorbância normalizada de cada amostra foram quantificados para determinar a taxa traducional destas células. Foram usadas seis placas para cada condição testada e a DO foi medida por NanoDrop® para normalização das amostras antes da ultracentrifugação. Gráficos representativos de quatro experimentos. As figuras foram geradas a partir de quatro experimentos distintos.

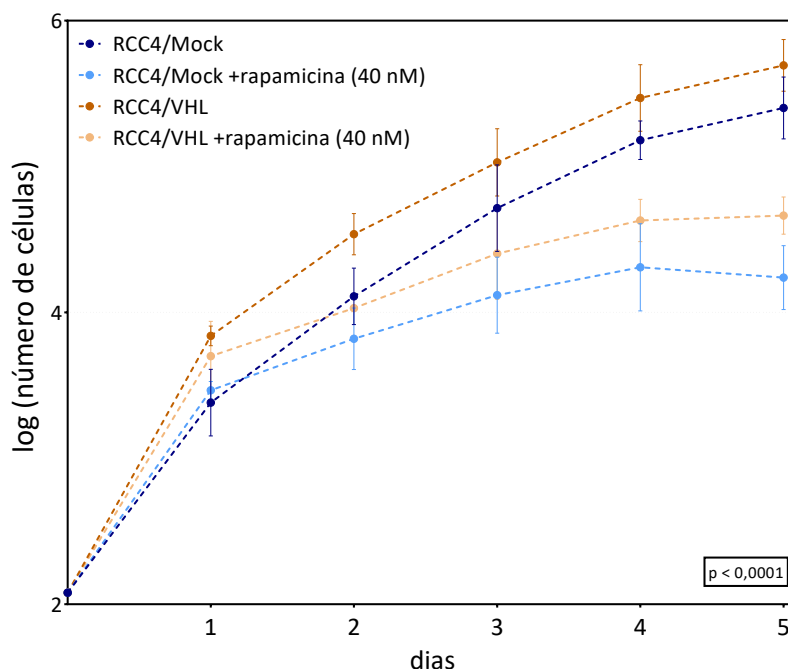


**Figura 11. Taxa de tradução global das linhagens celulares de CRCC.**

Taxa traducional das células RCC4/Mock e RCC4/VHL tratadas com rapamicina e/ou DMSO por 2h e 16h. O gráfico foi gerado pelo cálculo da área abaixo dos picos de 80S e de polissomos ( $\geq 3n$ ) representados na **figura 11**. A quantificação da área foi calculada pelo ImageJ. A figura representa quatro experimentos distintos. As amostras foram comparadas pelo teste de Análise de variância (ANOVA) two-way e as comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Foi encontrado efeito de interação significativo entre linhagens e tratamentos. As linhas preenchidas mostram as comparações dentro do mesmo grupo e as linhas pontilhadas mostram as comparações entre grupos diferentes. \* indicam  $p$ -valor significativo ( $<0,001$ ) dentro das comparações múltiplas.

Para observar as consequências funcionais da inibição de mTORC1 na presença ou ausência de VHL, a taxa de proliferação celular foi avaliada nas células RCC4 tratadas com rapamicina. A rapamicina reduziu o crescimento celular, porém de forma mais acentuada na presença de VHL (**Figura 12 e Apêndice 1**). A tradução global na ausência de VHL foi menor ao longo de todo período, o que causa um atraso no crescimento celular. Células RCC4/VHL tratadas com rapamicina sentem os efeitos no crescimento a partir do segundo dia (controle  $\bar{x} = 9 \times 10^4$  vs rapamicina  $\bar{x} = 5 \times 10^4$ ;  $p = 0,0041$ ), enquanto as células RCC4/Mock só apresentam resultado semelhante a partir do terceiro dia de tratamento com rapamicina ( $\bar{x} = 18 \times 10^4$  vs  $0,8 \times 10^4$ ;  $p = 0,0006$ ) (**Figura 12 – dia 2 e dia 3**), sugerindo maior sensibilidade a rapamicina na presença de VHL. Assim como ocorreu na tradução global nas células RCC4/Mock, o crescimento celular diminuiu em comparação com as células RCC4/VHL durante todo tempo de tratamento. Entretanto, essa diferença é observada durante as primeiras 48h do

experimento e, após esse período, ambas as linhagens crescem de forma similar. Esses dados em conjunto mostram que linhagens celulares de CRCC apresentam características distintas dependentes do status de VHL. O papel de mTOR e VHL na tradução específica de mRNAs será observado através do sequenciamento dos RNAs totais e polissomais dos experimentos demonstrados acima.



**Figura 12. Curva de crescimento das linhagens celulares de CRCC.**

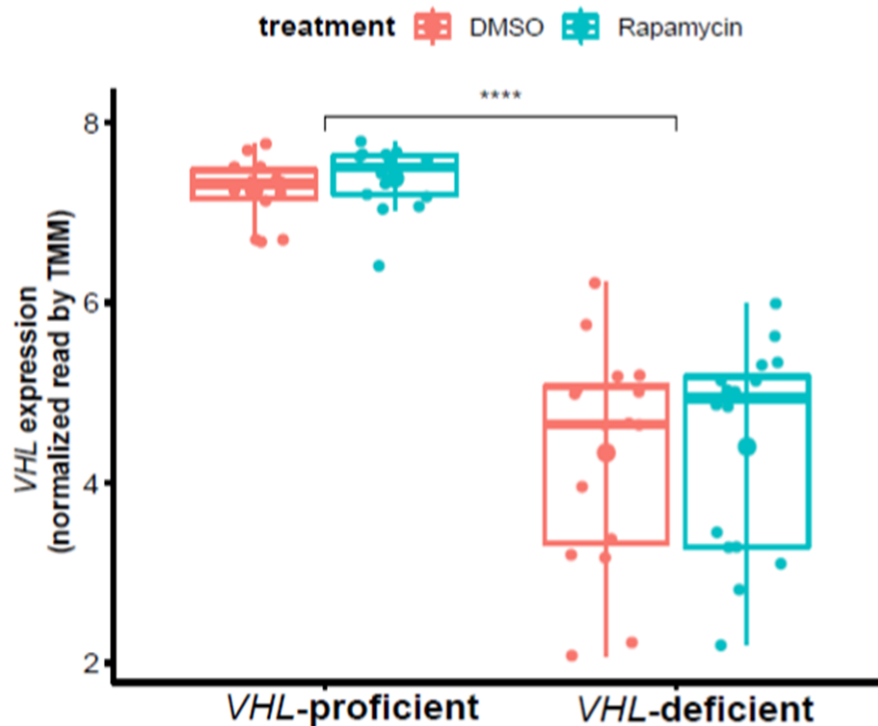
Curva de crescimento das células RCC4/Mock e RCC4/VHL tratadas com rapamicina e/ou DMSO por cinco dias. Foram plaqueadas  $8 \times 10^3$  células no dia 0 do experimento e tratadas no dia 1 com 40 nM de rapamicina e/ou com o veículo (DMSO). As células foram contadas por mais 5 dias para plotar os dados. O gráfico é representativo de 3 replicatas biológicas realizadas em duplicatas técnicas cada dia do experimento. *p*-valor referente ao teste ANOVA two-way onde foi detectado efeito de interação entre tratamento e linhagem. No **Apêndice 1** está a tabela de comparações múltiplas pelo método de Tukey.

### 5.1.3 Análise do translatooma das linhagens celulares de CRCC

Com o perfil polissomal podemos identificar e coletar apenas os mRNAs ativamente traduzidos e comparar com a população total de mRNAs para identificar alterações na eficiência da tradução. O RNA das amostras correspondentes aos polissomos, ou seja, os picos com mais de 3 ribossomos associados ao mRNA, foram extraídos. Em paralelo, extraímos também o RNA total das amostras para comparação. Após a extração, as amostras foram enviadas para o laboratório do Dr. Ola Larsson no Instituto Karolinska, onde foram realizados



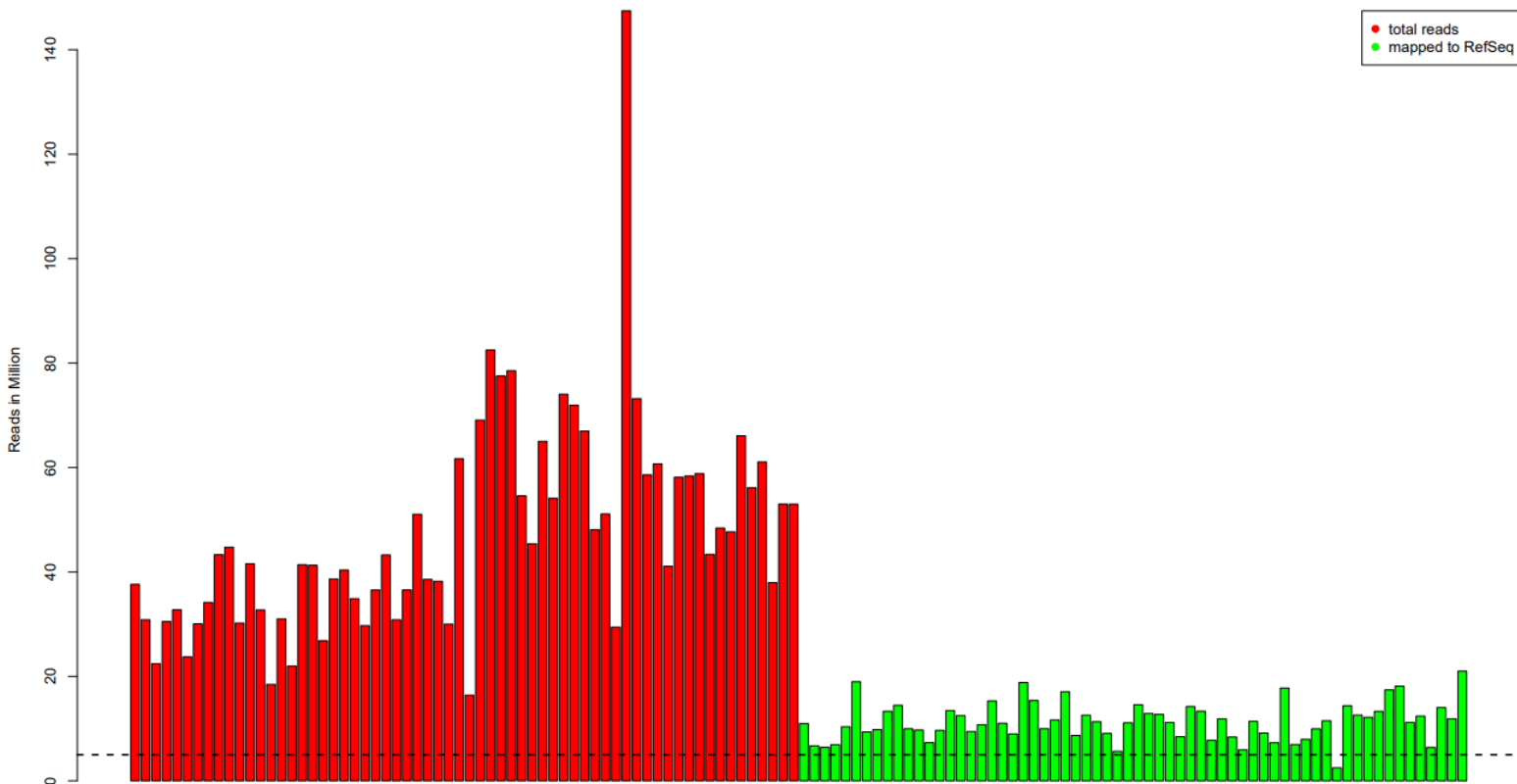
o sequenciamento e análises estatísticas desta seção, em colaboração com suas alunas Hui Liu e Kathleen Watts. Para fins informativos, a **figura 13** mostra a expressão de VHL nas linhagens RCC4/Mock (denominada como **VHL-deficient**) e RCC4/VHL (denominada como **VHL-proficient**) nas células controle e tratadas com rapamicina.



**Figura 13. Expressão de VHL nas linhagens celulares de CRCC.**

Expressão de VHL normalizada pelo método TMM (*trimmed mean of M values*) nas linhagens celulares RCC4/Mock (*VHL-deficient*) e RCC4/VHL (*VHL-proficient*) tratadas com rapamicina (*rapamycin* – azul) e/ou com o veículo (DMSO – vermelho).

Os sequenciamentos do mRNA total e do mRNA polissomal das células RCC4/Mock e RCC4/VHL tratadas ou não com rapamicina por 2h e 16h geraram uma grande quantidade de dados. Para analisar o sequenciamento com o algoritmo *anota2seq*, foi determinado um *cutoff* de 5 milhões de leituras por amostra. Uma das amostras ficou abaixo do *cutoff* determinado, porém não foi excluída por ter obtido pelo menos o mínimo de leituras necessárias (2 milhões de leituras) (**Figura 14**).



**Figura 14. Número de leituras obtidas pelo sequenciamento.**

O gráfico mostra o número de leituras brutas obtidas por amostra em comparação com o número de leituras mapeadas definidas pelo *gene refseq* após o pré-processamento.

A partir destes conjuntos de dados, foi realizada a análise de componente principal (PCA) com o objetivo de encontrar os componentes que melhor expliquem a diferença entre as amostras. O PCA reduz a dimensão de todos os genes encontrados no sequenciamento até chegar a um gráfico que explique a variação entre as amostras. Os componentes principais responsáveis pelo maior número de variabilidade entre os genes agregam as amostras similares entre si: o componente principal 1 (PC1) possui a maior variação entre os dados, o componente principal 2 (PC2) apresenta a segunda maior variação entre os dados, e assim por diante. A partir dos quatro experimentos realizados, os resultados mostraram que a maior variabilidade é explicada pelo status de VHL nas linhagens celulares e pelo tipo de mRNA (total ou polissomal) (**Figura 15**).

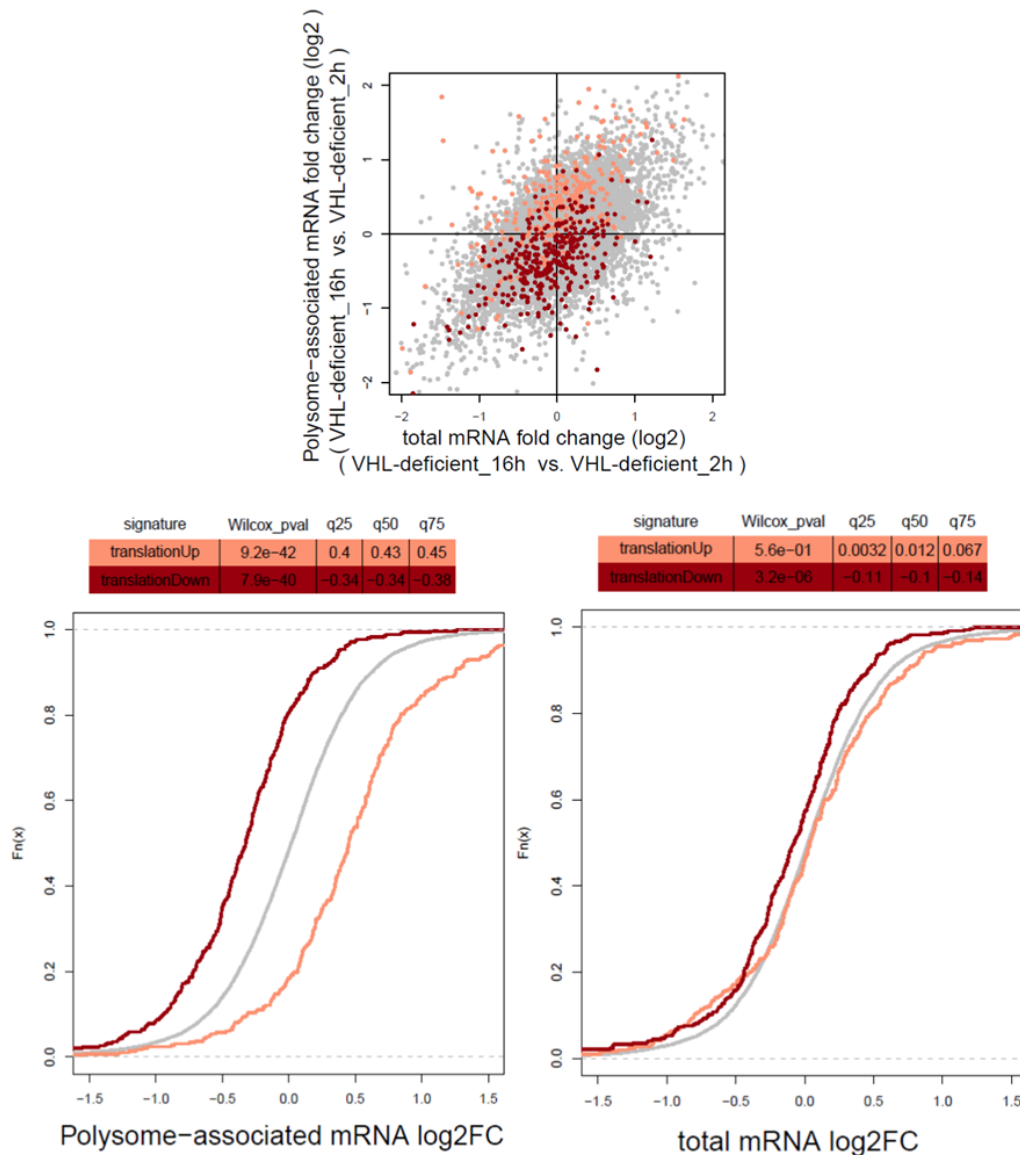


**Figura 15. Análise de componente principal (PCA).**

As amostras de mRNA total e mRNA polissomal extraídas foram utilizadas para definir a maior variabilidade entre as células RCC4/Mock e RCC4/VHL após tratamento com rapamicina e/ou veículo (DMSO) por 2h ou 16h. No eixo x encontra-se o componente principal 1 e no eixo y encontra-se o componente principal 2. Em azul estão as amostras obtidas do mRNA total (símbolo de triângulo) e do mRNA polissomal (símbolo de círculo) das células RCC4/VHL e em vermelho estão as amostras obtidas do mRNA total e mRNA polissomal das células RCC4/Mock.

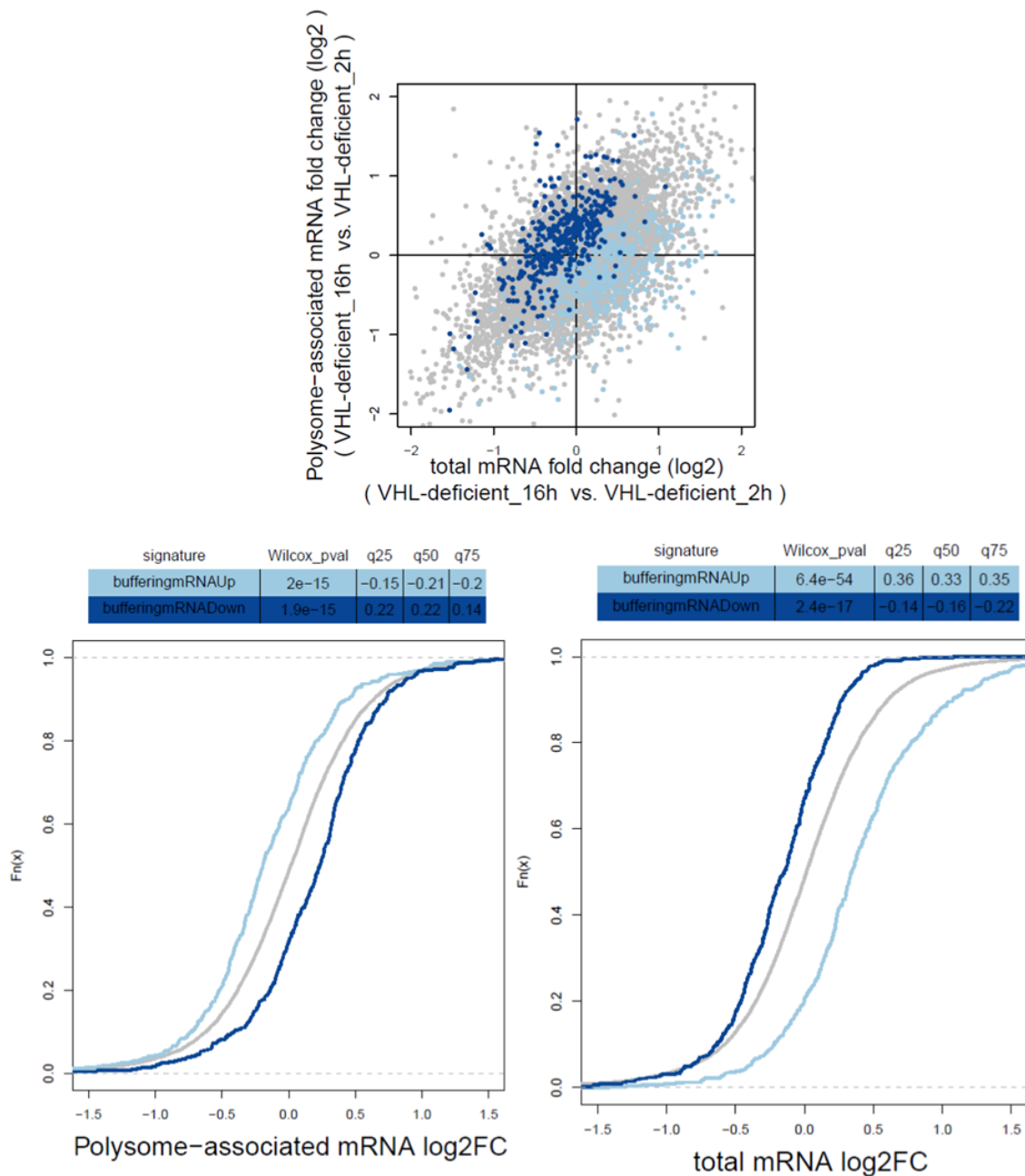
O próximo passo foi caracterizar as alterações no translatoema dependentes do status de VHL. Para isso, os sequenciamentos foram analisados com o algoritmo *anota2seq*. Com ele podemos classificar a regulação da expressão gênica em três modos diferentes: mudanças no mRNA polissomal que não correspondem a alterações no mRNA total (denominada *translation*), mudanças equivalentes no mRNA total e mRNA polissomal (denominada *abundance*), e mudanças no mRNA total que não afetam mRNAs polissomais (denominada *buffering*) (134). Alterações nos modos *translation* ou *abundance* podem causar alterações dos níveis proteicos – a depender dos controles pós-traducionais e da estabilidade da proteína – porém, alterações no modo *buffering* limitam o impacto das alterações observadas no mRNA na composição do proteoma (146). Inicialmente, foi avaliada a regulação global dos transcritos via modos *translation* e *buffering* nas células RCC4/Mock e RCC4/VHL. Os padrões de direção observados nas figuras 16, 17, 19 e 20 oferecem uma visão geral da regulação dependendo

do modo indicado (*translation* ou *buffering*). O conjunto total de transcritos encontrados após 16h de tratamento com soro foram comparados com o grupo de transcritos encontrados após 2h de tratamento com soro. A mediana da expressão do tempo final foi subtraída da mediana da expressão do tempo inicial. A diferença entre as medianas foi calculada pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas. A hipótese nula deste teste diz que a diferença da mediana entre as amostras pareadas é zero. Uma diferença maior que zero indica que a expressão do gene aumentou no tempo final em relação ao tempo inicial. Uma diferença negativa indica que a expressão do gene diminuiu no tempo final em relação ao tempo inicial. No gráfico, a direção das linhas coloridas demonstra se a população de genes estudada aumentou ou diminuiu em relação a linha cinza, que representa a diferença zero entre as medianas. Uma alteração para a direita indica maior associação e uma alteração para a esquerda indica menor associação aos níveis de mRNA polissomal ou mRNA total no grupo de transcritos em comparação com o background (em cinza). Transcritos que tiveram sua tradução associada com o status de VHL após tratamento com SFB mostraram regulação na mesma direção quando comparados o 16h com 2h de estímulo com SFB nas células VHL deficientes (**Figura 16**). Ou seja, os transcritos up-regulados no mRNA total ou no mRNA polissomal das células deficientes em VHL permanecem no mesmo modo de regulação quando comparamos o tratamento de 16h com o tratamento de 2h. Da mesma forma que esse efeito foi observado no modo *translation*, o grupo de transcritos encontrados no modo *buffering* durante a fase aguda permanecem na mesma direção após 16h de estímulo com soro nas células RCC4/Mock (**Figura 17**). As diferenças na expressão gênica dependendo do status de VHL após estímulo com soro parece potencializar ao longo do tempo nas células deficientes em VHL. Além disso, foi encontrado um conjunto de 206 transcritos com transcrição up- ou down-regulada modulados traducionalmente após 16h de tratamento com soro (**Figura 18**).



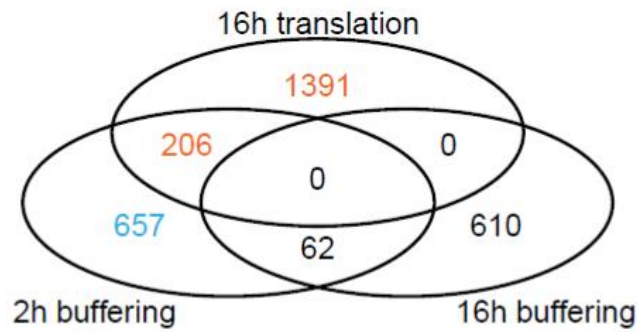
**Figura 16. Visão geral das alterações nas células deficientes em VHL reguladas via *translation*.**

Os gráficos mostram o grupo de transcritos com regulação alterada via modo *translation* nas células RCC4/Mock. No *scatter plot* (acima) contém o  $\log_2$  do *fold change* dos genes encontrados no mRNA polissomal vs. o  $\log_2$  do *fold change* dos genes encontrados no mRNA total após 16h em comparação com 2h de tratamento com SFB. Estão indicados os grupos de genes up- e down-regulados e a população de genes inalterados (em cinza). Nos dois gráficos abaixo contém a distribuição cumulativa do *fold change* no mRNA polissomal (esquerda) e no mRNA total (direita). Uma alteração para a direita indica maior associação e uma alteração para a esquerda indica menor associação aos níveis de mRNA polissomal ou mRNA total no grupo de transcritos em comparação com o background (em cinza).



**Figura 17. Visão geral das alterações nas células deficientes em VHL reguladas via *buffering*.**

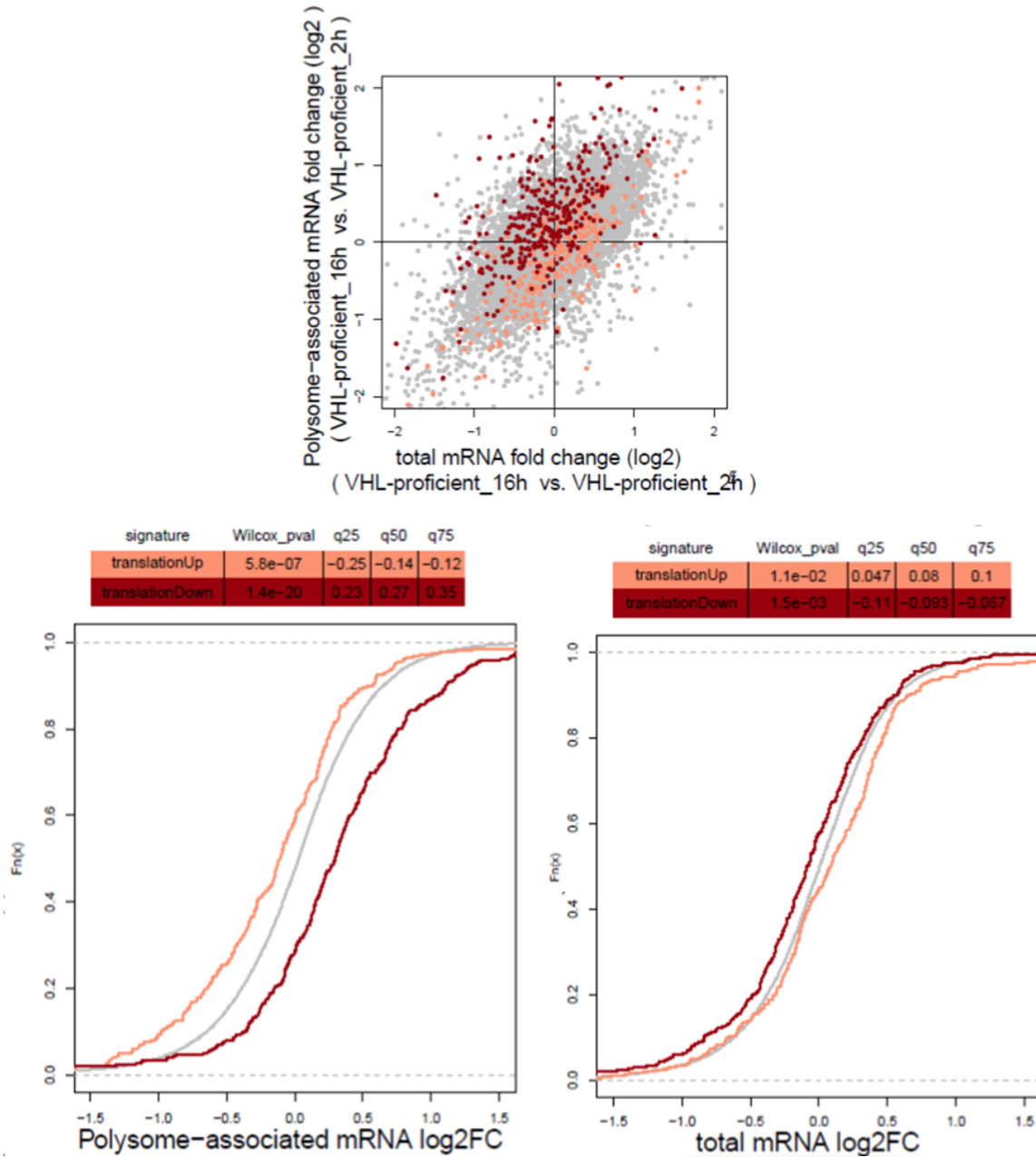
Os gráficos mostram o grupo de transcritos com regulação alterada via modo *buffering* nas células RCC4/Mock. No *scatter plot* (acima) contém o  $\log_2$  do *fold change* dos genes encontrados no mRNA polissomal vs. o  $\log_2$  do *fold change* dos genes encontrados no mRNA total após 16h em comparação com 2h de tratamento com SFB. Estão indicados os grupos de genes up- e down-regulados e a população de genes inalterados (em cinza). Nos dois gráficos abaixo contém a distribuição cumulativa do *fold change* no mRNA polissomal (esquerda) e no mRNA total (direita). Uma alteração para a direita indica maior associação e uma alteração para a esquerda indica menor associação aos níveis de mRNA polissomal ou mRNA total no grupo de transcritos em comparação com o background (em cinza).



**Figura 18. Transição entre os modos de regulação gênica nas células deficientes em VHL.**

Diagrama de Venn comparando o número de transcritos sobrepostos entre os modos de regulação genética indicados na figura.

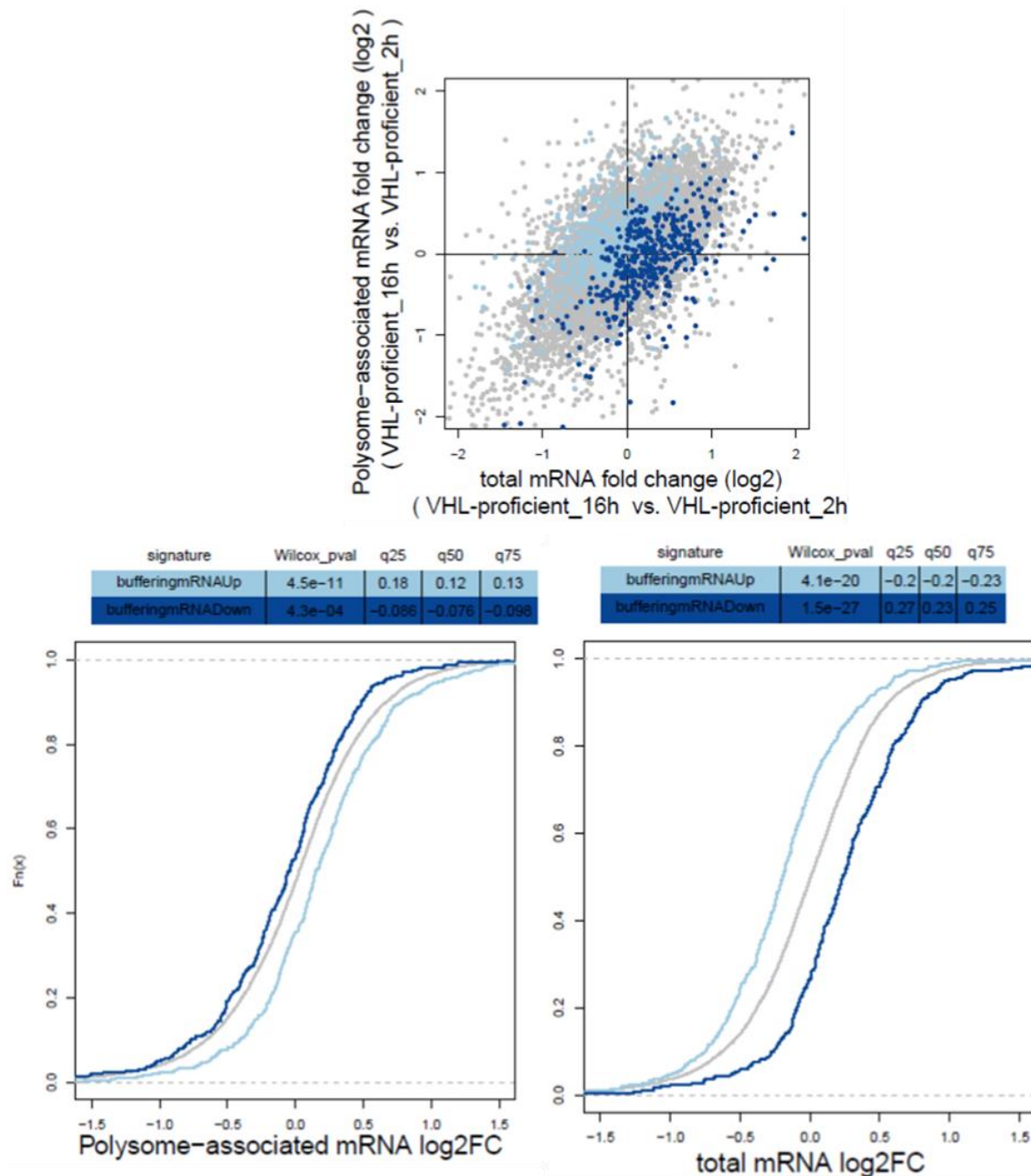
Ao contrário das células RCC4/Mock, nas células RCC4/VHL observamos que a transição da fase aguda para a fase crônica acontece na direção oposta tanto no modo *translation* (**Figura 19**) quanto no modo *abundance* (**Figura 20**). Em resumo, essas comparações sugerem que as diferenças na tradução entre as células ocorrem ao longo do tempo de formas opostas dependendo do status de VHL – por exemplo, transcritos tradicionalmente ativados nas células RCC4/Mock são tradicionalmente suprimidos nas células RCC4/VHL, e vice versa. Entretanto, diferentemente das células VHL-deficientes, as células com VHL restituído não apresentaram genes envolvidos nas transições entre os modos de regulação.



**Figura 19. Visão geral das alterações nas células com VHL restituído reguladas via *translation*.**

Os gráficos mostram o grupo de transcritos com regulação alterada via modo *translation* nas células RCC4/VHL. No *scatter plot* (acima) contém o  $\log_2$  do *fold change* dos genes encontrados no mRNA polissomal vs. o  $\log_2$  do *fold change* dos genes encontrados no mRNA total após 16h em comparação com 2h de tratamento com SFB. Estão indicados os grupos de genes up- e down-regulados e a população de genes inalterados (em cinza). Nos dois gráficos abaixo contém a distribuição cumulativa do *fold change* no mRNA polissomal (esquerda) e no mRNA total (direita). Uma alteração para a direita indica maior associação e uma alteração para a esquerda indica menor associação aos níveis de mRNA polissomal ou mRNA total no grupo de transcritos em comparação com o background (em cinza).





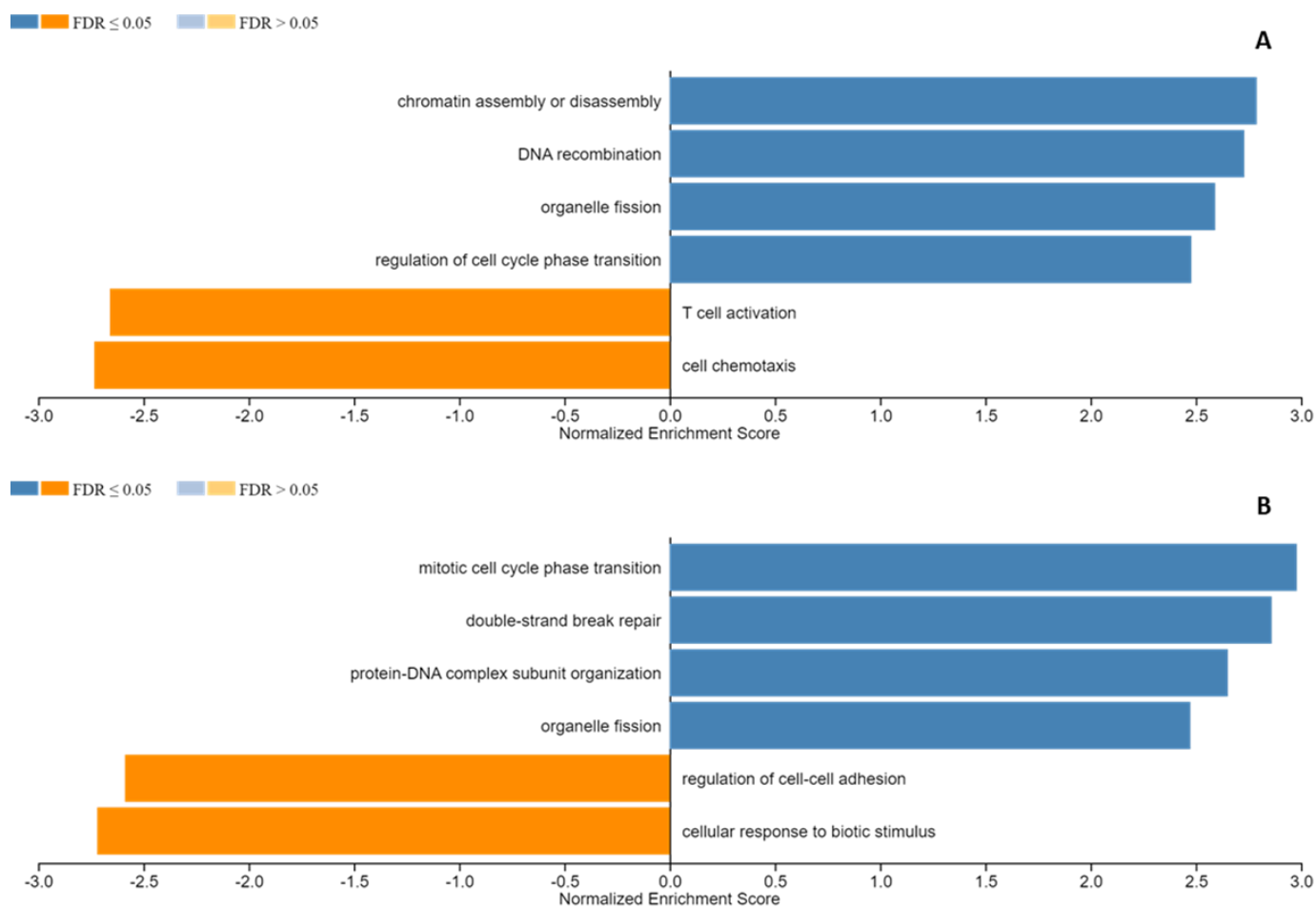
**Figura 20. Visão geral das alterações nas células com VHL restituído reguladas via *buffering* após uso prolongado de soro.**

Os gráficos mostram o grupo de transcritos com regulação alterada via modo *buffering* nas células RCC4/VHL. No *scatter plot* (acima) contém o  $\log_2$  do *fold change* dos genes encontrados no mRNA polissomal vs. o  $\log_2$  do *fold change* dos genes encontrados no mRNA total após 16h em comparação com 2h de tratamento com SFB. Estão indicados os grupos de genes up- e down-regulados e a população de genes inalterados (em cinza). Nos dois gráficos abaixo contém a distribuição cumulativa do *fold change* no mRNA polissomal (esquerda) e no mRNA total (direita). Uma alteração para a direita indica maior associação e uma alteração para a esquerda indica menor associação aos níveis de mRNA polissomal ou mRNA total no grupo de transcritos em comparação com o background (em cinza).

Para visualizar a função dos genes encontrados nos modos de regulação gênica, foram utilizadas ferramentas disponíveis no site WebGestalt (*WEB-based Gene Set Analysis Toolkit*).

Inicialmente, o método de enriquecimento GSEA (*gene set enrichment analysis*) foi utilizado para a análise dos processos biológicos up- ou down-regulados que estão enriquecidos nas células de acordo com o *gene ontology* (147). O *gene ontology* facilita a interpretação de dados em larga escala através de um vocabulário controlado para a análise de processos biológicos. A partir da comparação entre os modos de regulação, conseguimos capturar diferenças entre os genes que estão presentes no mRNA total e comparar com aqueles encontrados no mRNA polissomal, estendendo o conhecimento sobre a complexidade da expressão gênica. Inicialmente buscamos as características de cada linhagem celular pelas vias enriquecidas após estímulo com SFB. As vias enriquecidas foram consideradas significativas quando o FDR < 0,05.

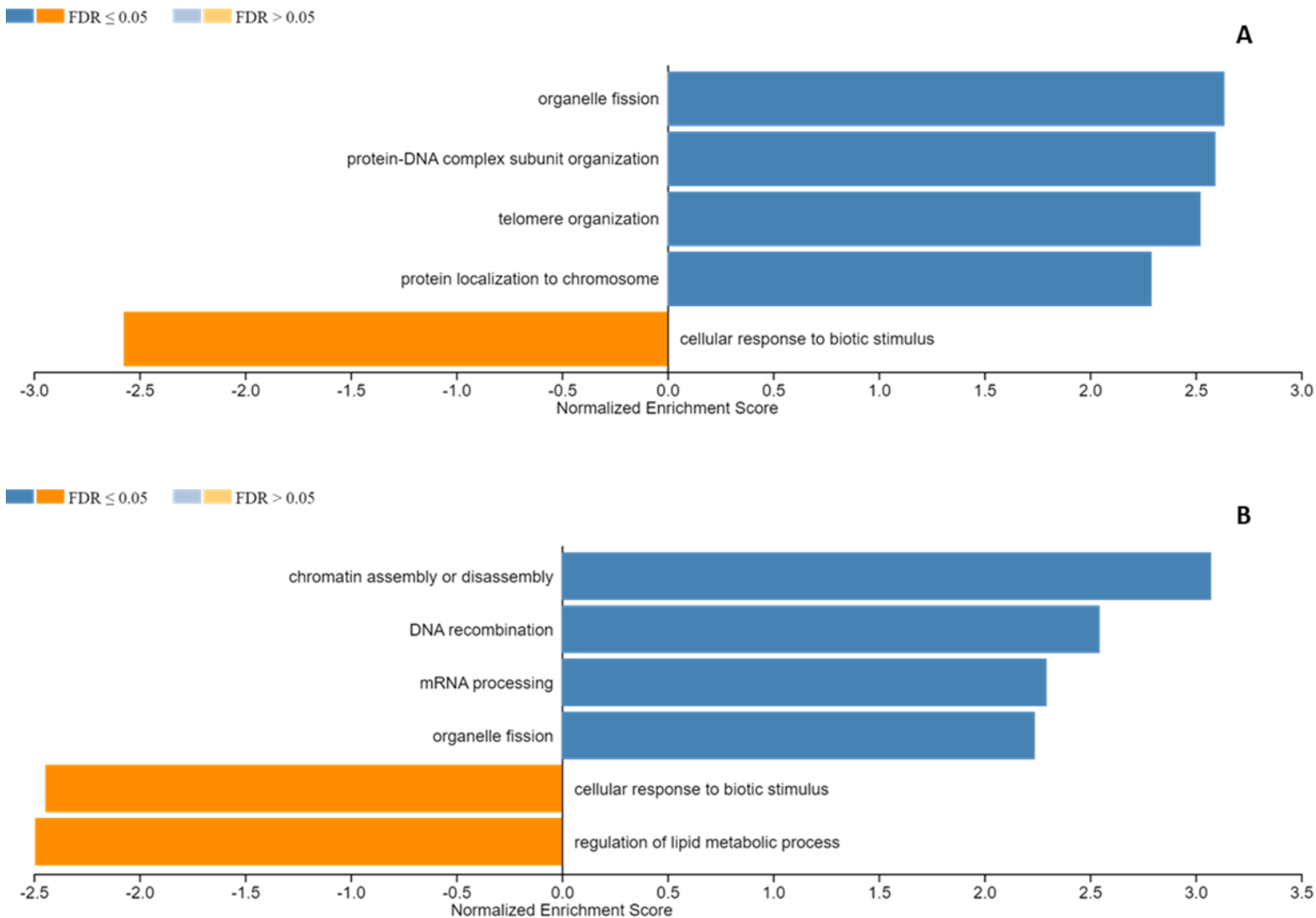
Inicialmente foram observadas as vias enriquecidas nas células RCC4/Mock ou RCC4/VHL tratadas apenas com soro fetal bovino. Essa análise foi feita a partir da população total de genes encontrados nas células que foram tratadas por 16h com soro em comparação com os genes encontrados nas células tratadas por 2h com soro. No mRNA total, após as 16h de tratamento, as células RCC4/Mock apresentam genes up-regulados enriquecidos nos processos de montagem ou desmontagem de cromatina, recombinação de DNA, fissão de organelas e do ciclo celular; e genes down-regulados enriquecidos nos processos de ativação de células T e quimiotaxia (**Figura 21A**). No mRNA polissomal os genes up-regulados estão enriquecidos nos processos de transição do ciclo celular, reparo de dupla-fita, organização de complexo DNA-proteína e fissão de organelas; e os genes down-regulados estão enriquecidos nos processos de adesão célula-célula e resposta celular a estímulo biótico (**Figura 21B**).



### Figura 21. Vias enriquecidas nas células deficientes em VHL.

Representação da análise funcional pelo *gene ontology* a partir da expressão diferencial de genes nas células RCC4/Mock. (A) Vias enriquecidas no mRNA total das células RCC4/Mock. (B) Vias enriquecidas no mRNA polissomal das células RCC4/Mock. Em azul estão representadas as vias up-reguladas nas células RCC4/Mock após 16h de tratamento com SFB e em laranja estão as vias down-reguladas nas células RCC4/Mock após 16h de tratamento com SFB que apresentaram  $FDR < 0,05$ .

No mRNA total das células RCC4/VHL, após as 16h de tratamento com soro, foram encontrados genes up-regulados em processos de fissão de organelas, organização de complexo DNA-proteína, organização de telômeros e localização de proteína no cromossomo no mRNA total (**Figura 22A**). Já no mRNA polissomal, as células RCC4/VHL apresentaram genes up-regulados que estão enriquecidos em processos de montagem e desmontagem de cromatina, recombinação de DNA, processamento de mRNA e fissão de organelas; e genes down-regulados que estão enriquecidos nos processos de resposta celular a estímulo biótico e regulação do metabolismo de lipídeos (**Figura 22B**).

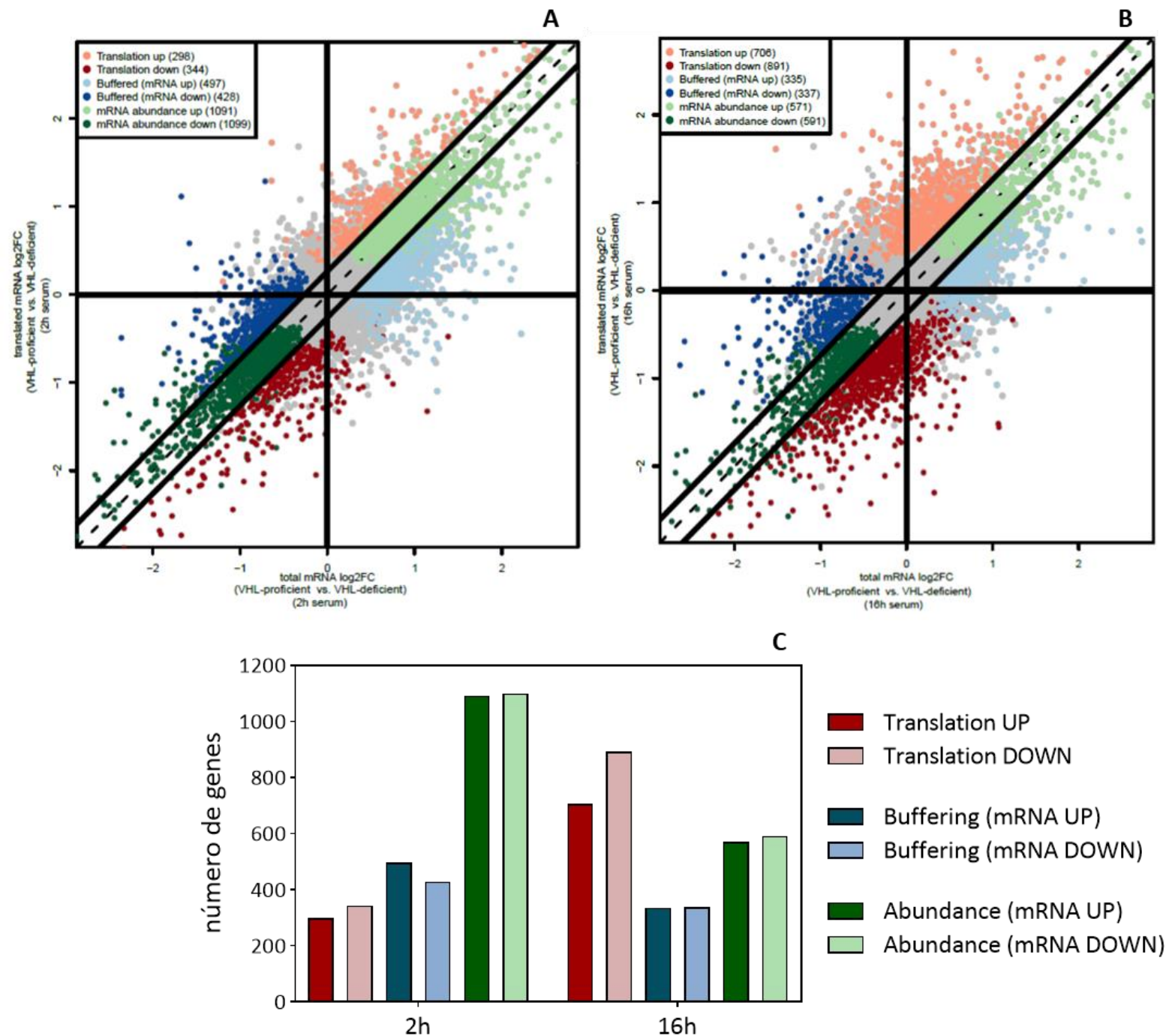


### Figura 22. Vias enriquecidas nas células com VHL restituído.

Representação da análise funcional pelo *gene ontology* a partir da expressão diferencial de genes nas células RCC4/VHL. (A) Vias enriquecidas no mRNA total das células RCC4/VHL. (B) Vias enriquecidas no mRNA polissomal das células RCC4/VHL. Em azul estão representadas as vias up-reguladas nas células RCC4/Mock após 16h de tratamento com SFB e em laranja estão as vias down-reguladas nas células RCC4/Mock após 16h de tratamento com SFB que apresentaram FDR < 0,05.

A seguir, foram comparadas as diferenças entre as células RCC4/VHL e RCC4/Mock nos dois tempos de tratamento apenas com soro. Mais genes estão regulados via modo *abundance* (1091 genes up-regulados e 1099 down-regulados) e menos genes estão regulados via *translation* (298 e 344 transcritos com tradução ativa ou não, respectivamente) quando comparamos as células RCC4/VHL com as células RCC4/Mock no tratamento com 2h de SFB (Figura 23A e 23C). O contrário é observado após 16h de tratamento, onde a regulação ocorre principalmente via *translation*, sugerindo que as mudanças a nível transcricional que ocorrem

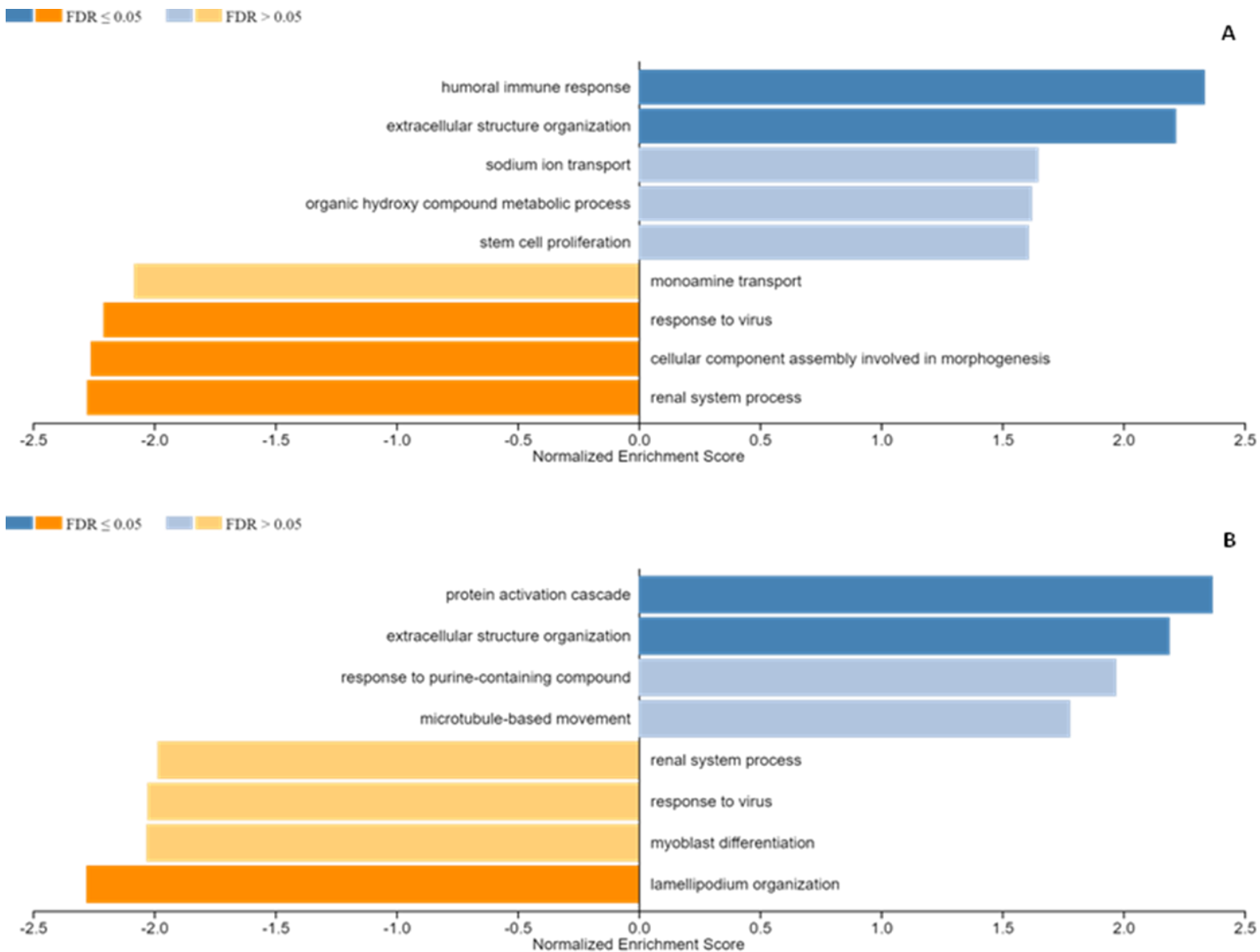
após as 2h de tratamento modulam alterações na tradução de mRNAs após 16h de tratamento (Figura 23B e 23C).



**Figura 23. Alterações nos diferentes modos de expressão gênica nas linhagens celulares de CRCC.**

Nos *scatter plots* contém o  $\log_2$  do fold change dos genes encontrados nos modos *translation*, *buffering* e *abundance*. As comparações são entre as células RCC4/VHL (VHL-*proficient*) e RCC4/Mock (VHL-*deficient*) após (A) 2h ou (B) 16h de tratamento com SFB. Os pontos representam transcritos diferencialmente regulados a partir das análises dos modos *translation*, *abundance* ou *buffering* de expressão gênica pelo anota2seq. (C) Número de transcritos regulados dentro de cada modo de expressão gênica.

A seguir analisamos os processos enriquecidos no mRNA total e no mRNA polissomal das células RCC4/Mock em comparação com as células RCC4/VHL. Os genes up-regulados no mRNA total das células RCC4/Mock após 2h de tratamento com SFB estão enriquecidos nos processos biológicos de resposta imune humoral e organização de estrutura extracelular, enquanto os genes down-regulados no mRNA total das células RCC4/Mock após 2h de tratamento com SFB estão dentro dos processos biológicos de resposta a vírus, na montagem de componentes celulares envolvidos na morfogênese e em processos do sistema renal (**Figura 24A**). Os genes regulados no mRNA polissomal das células RCC4/Mock após 2h de tratamento com SFB, estão enriquecidos no processo de ativação de cascata de proteínas e na organização de estrutura extracelular. Já os genes down-regulados no mRNA polissomal das células RCC4/Mock após 2h de tratamento com SFB, estão enriquecidos no processo de organização de lamelipodia (**Figura 24B**).

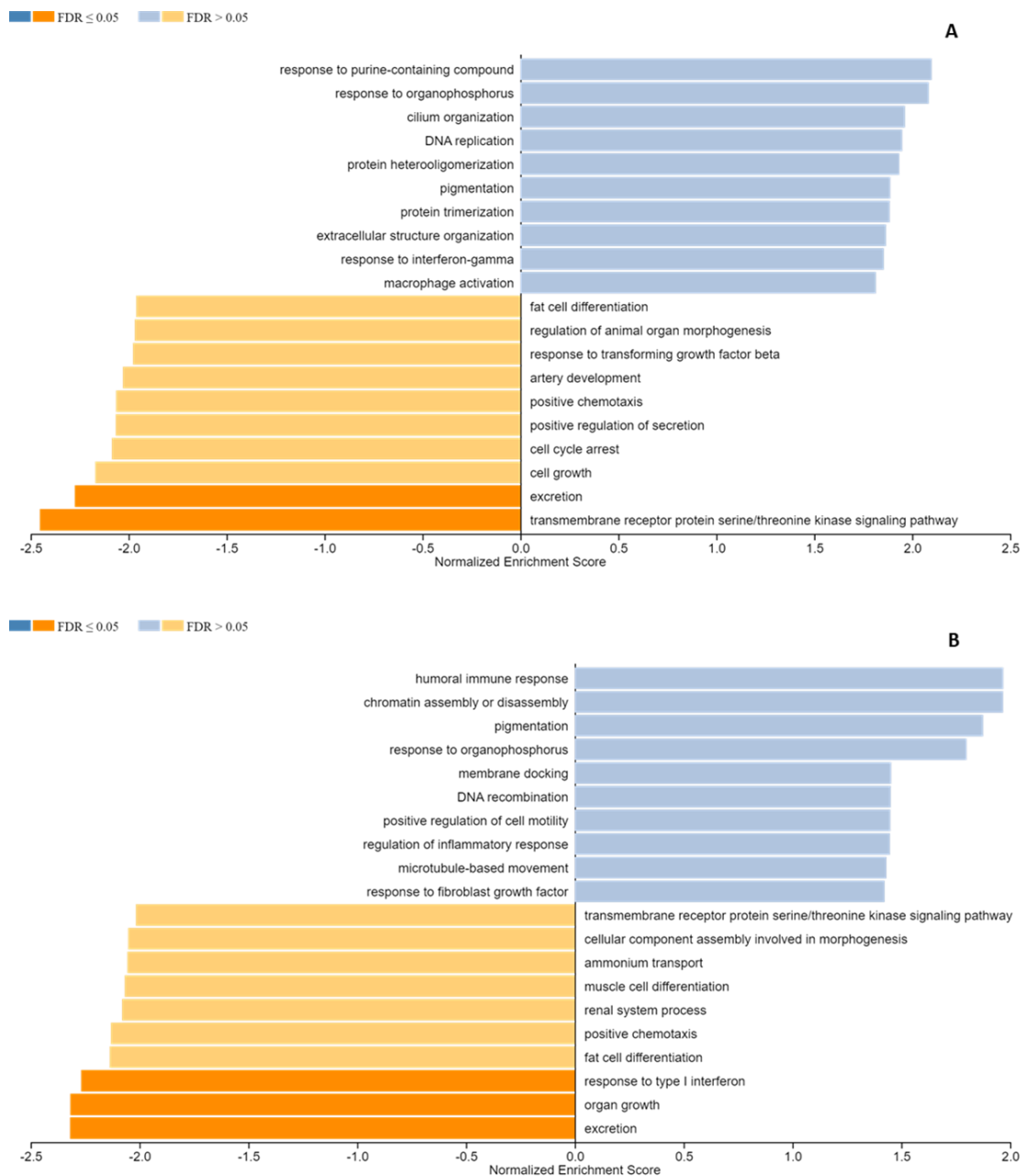


**Figura 24. Vias enriquecidas nas células RCC4/Mock em comparação com as células RCC4/VHL após tratamento apenas com SFB por 2h.**

Representação da análise funcional pelo *gene ontology* a partir da expressão diferencial de genes nas células RCC4/Mock em comparação com as células RCC4/VHL após 2h de tratamento com SFB. (A) Vias enriquecidas no mRNA total das células RCC4/Mock. (B) Vias enriquecidas no mRNA polissomal das células RCC4/Mock. Em azul escuro estão representadas as vias up-reguladas nas células RCC4/Mock após tratamento com SFB por 2h e em laranja escuro estão representadas as vias down-reguladas nas células RCC4/Mock após tratamento com SFB por 2h com FDR < 0,05.

Após 16h de tratamento com SFB, os genes encontrados diferencialmente expressos no mRNA total que estão down-regulados na linhagem RCC4/Mock participam de processos de excreção e da via de sinalização da proteína do receptor transmembrana serina/treonina quinase (**Figura 25A**). Já no mRNA polissomal, os genes down-regulados em RCC4/Mock após

16h de tratamento com SFB participam dos processos de resposta a interferon do tipo I, crescimento de órgão e excreção (**Figura 25B**).

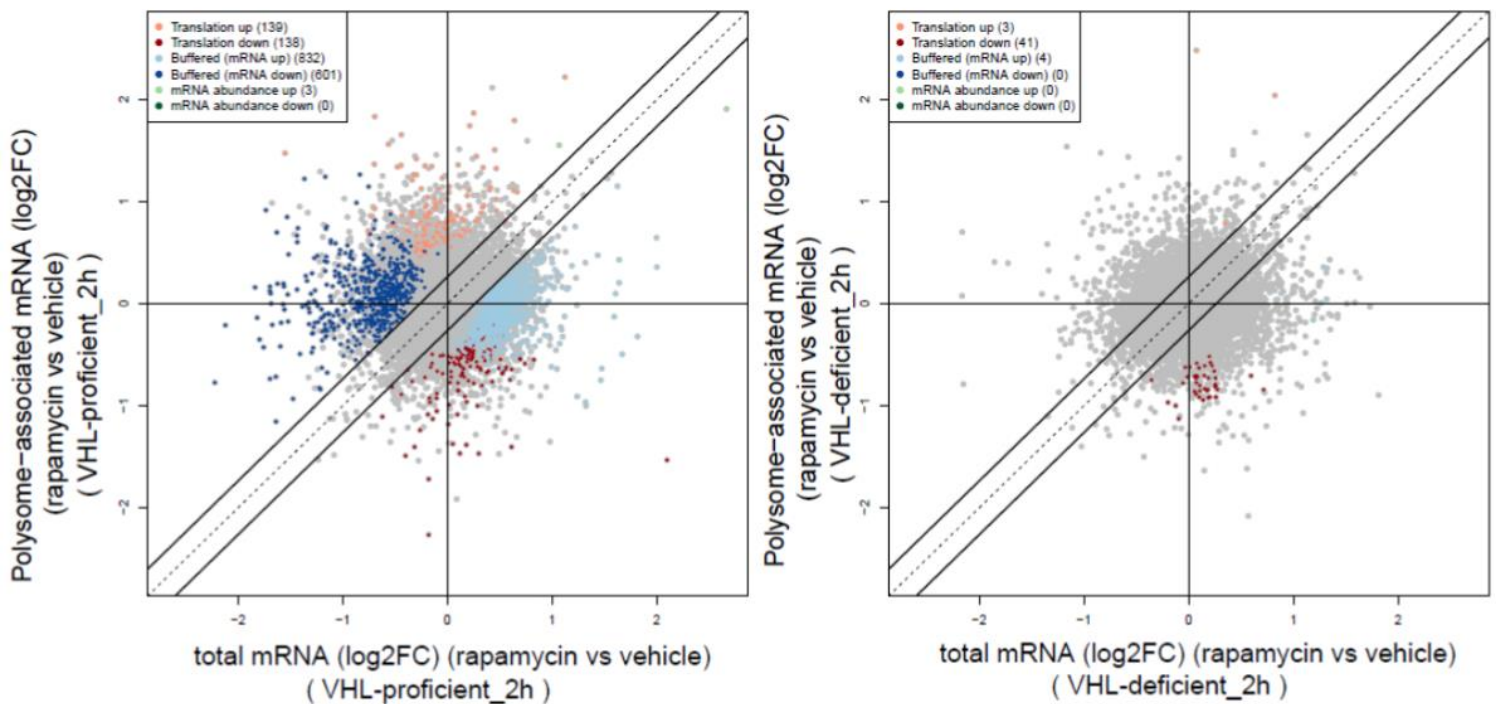


**Figura 25. Vias enriquecidas nas células RCC4/Mock em comparação com as células RCC4/VHL após tratamento apenas com SFB por 16h.**

Representação da análise funcional pelo *gene ontology* a partir da expressão diferencial de genes nas células RCC4/Mock em comparação com as células RCC4/VHL após 16h de tratamento com SFB. (A) Vias enriquecidas no mRNA total das células RCC4/Mock. (B) Vias enriquecidas no mRNA polissomal das células RCC4/Mock. Em azul escuro estão representadas as vias up-reguladas nas células RCC4/Mock após tratamento com SFB por 16h e em laranja escuro estão representadas as vias down-reguladas nas células RCC4/Mock após tratamento com SFB por 16h com FDR < 0,05.

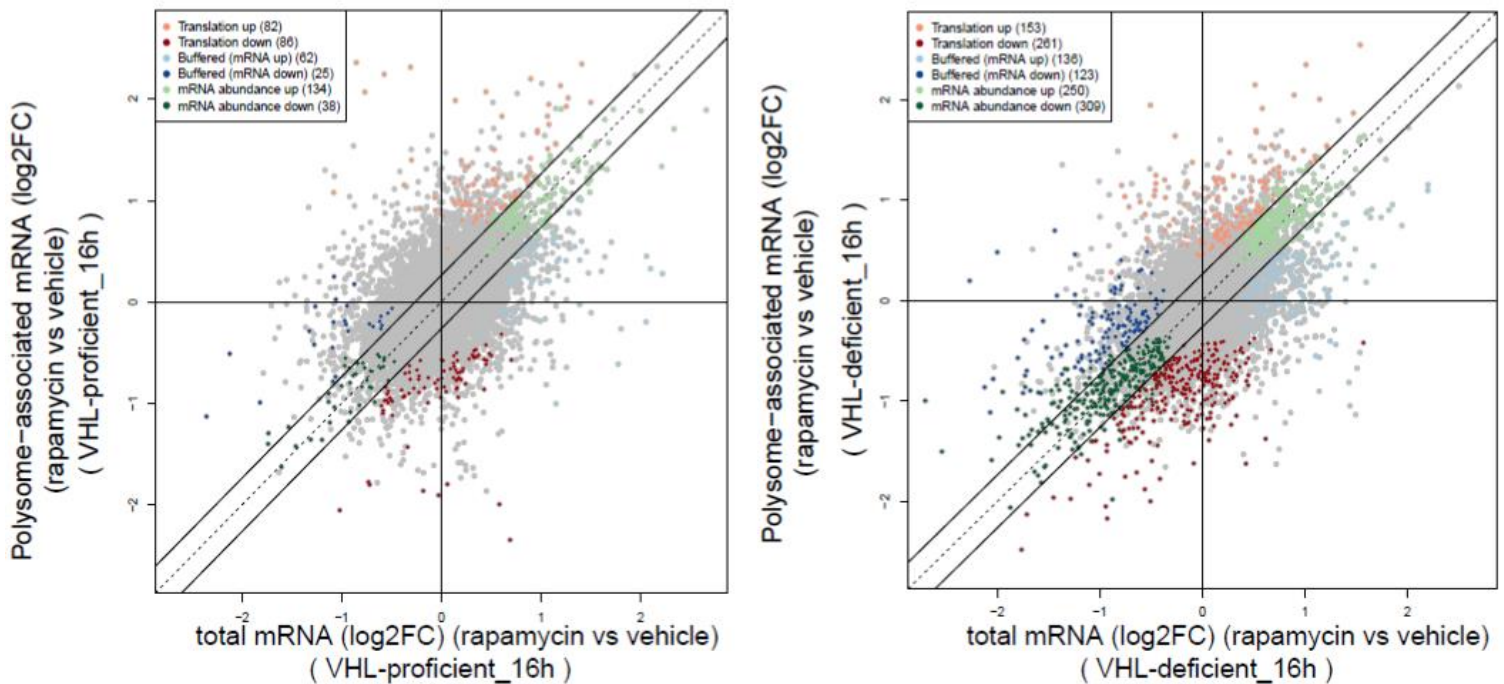


Para determinar se a expressão nas células RCC4/Mock e RCC4/VHL é modulado via mTORC1, comparamos as células tratadas com SFB na presença de rapamicina com as células tratadas apenas com soro. As células RCC4/VHL apresentaram alterações nos modos *translation* e *buffering* após tratamento com 2h enquanto as células VHL deficientes apenas mostraram modulação via *translation* em um grupo muito limitado de transcritos (**Figura 26**), sugerindo respostas diferentes a rapamicina dependendo do status de VHL. Depois foram realizadas as mesmas análises para determinar os efeitos da rapamicina na expressão gênica dependente do status de VHL após 16h de tratamento. O resultado indica que as células deficientes em VHL possuem uma maior regulação da expressão gênica em comparação com as células com VHL restituído depois das 16h de tratamento com rapamicina (**Figura 27**).



**Figura 26. Alterações nos modos de regulação gênica após tratamento com rapamicina por 2h.**

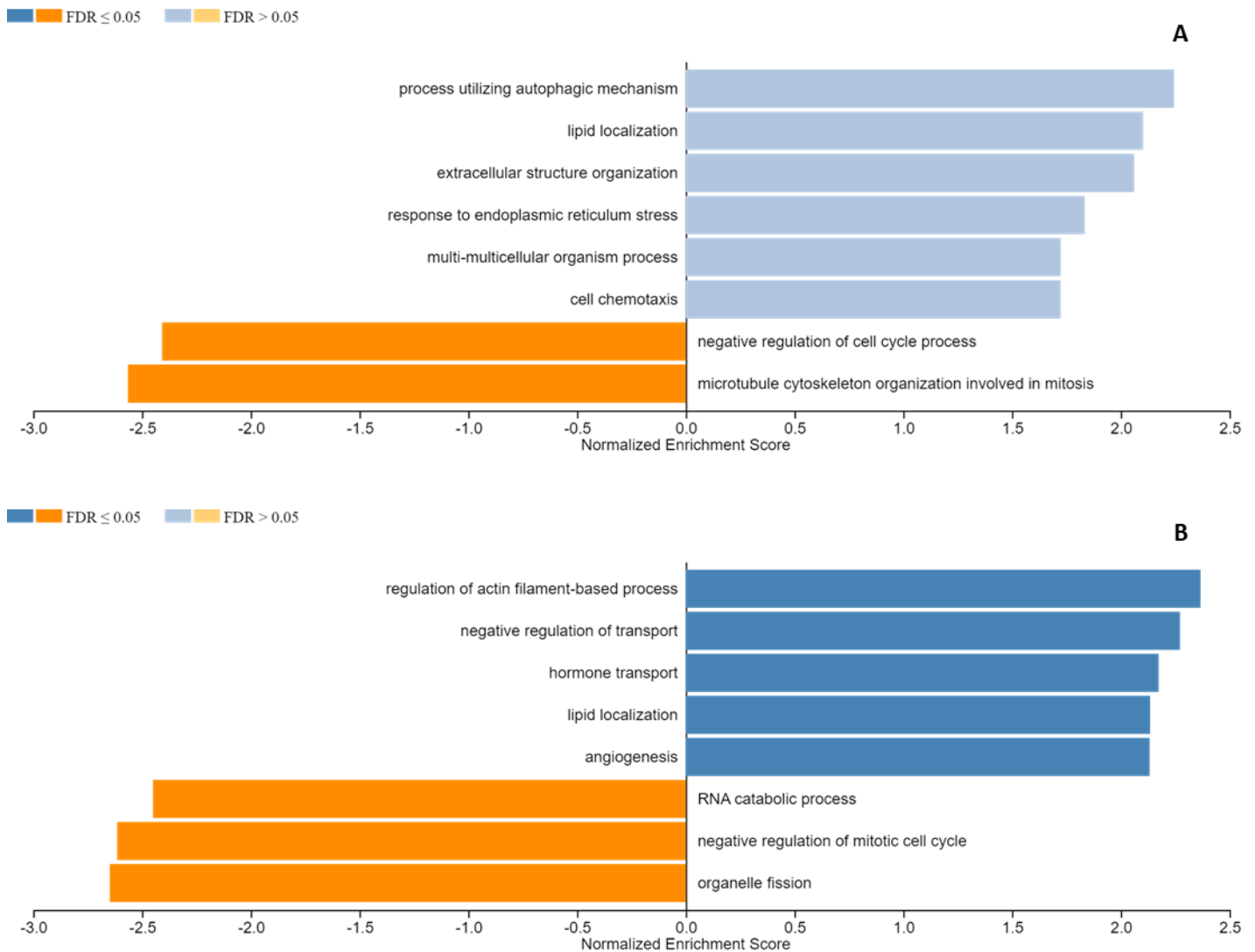
Scatter plots comparando alterações no mRNA polissomal e mRNA total entre as células RCC4/VHL (VHL-*proficient*) (esquerda) e RCC4/Mock (VHL-*deficient*) (direita) após 2h de tratamento com SFB e rapamicina. Os pontos representam transcritos diferencialmente regulados a partir das análises dos modos *translation*, *abundance* ou *buffering* de expressão gênica pelo *anota2seq*.



**Figura 27. Alterações nos modos de regulação gênica após tratamento com rapamicina por 16h.**

Scatter plots comparando alterações no mRNA polissomal e mRNA total entre as células RCC4/VHL (*VHL-proficient*) (esquerda) e RCC4/Mock (*VHL-deficient*) (direita) após 16h de tratamento com SFB e rapamicina. Os pontos representam transcritos diferencialmente regulados a partir das análises dos modos *translation*, *abundance* ou *buffering* de expressão gênica pelo *anota2seq*.

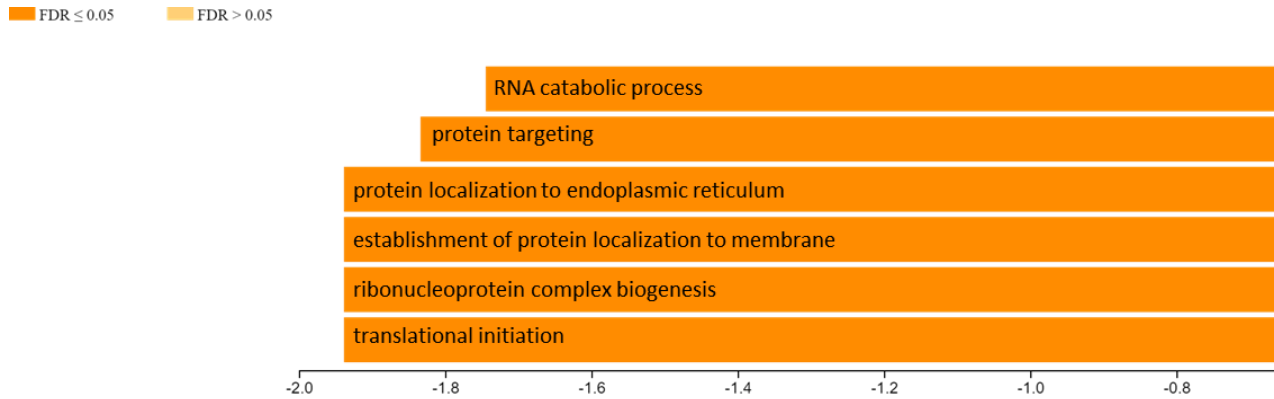
O próximo passo foi entender as funções dos transcritos encontrados nas células tratadas com rapamicina dependendo do status de VHL. Após o tratamento com rapamicina por 2h, não foram encontrados genes diferencialmente expressos nas células RCC4/Mock em comparação com o tratamento apenas com SFB. Após 16h de tratamento com rapamicina, podemos observar que as células RCC4/Mock apresentam down-regulação de genes envolvidos nos processos de regulação negativa do ciclo celular e organização do citoesqueleto de microtúbulos envolvida na mitose no mRNA total (**Figura 28A**). No mRNA polissomal os genes up-regulados estão enriquecidos na regulação do processo de filamentos de actina, na regulação negativa de transporte, de transporte de hormônios, na localização de lipídeos, e na angiogênese, enquanto os genes down-regulados participam de processos de catabolização de RNA, regulação negativa do ciclo celular mitótico e da fissão de organelas (**Figura 28B**).



### Figura 28. Vias enriquecidas nas células deficientes em VHL após inibição de mTORC1.

Representação da análise funcional pelo *gene ontology* a partir da expressão diferencial de genes nas células RCC4/Mock após tratamento com rapamicina. (A) Vias enriquecidas no mRNA total das células RCC4/Mock após o tratamento por 16h com rapamicina em comparação com as células tratadas apenas com SFB. (B) Vias enriquecidas no mRNA polissomal das células RCC4/Mock após o tratamento por 16h com rapamicina em comparação com as células tratadas apenas com SFB. Em azul escuro estão representadas as vias up-reguladas nas células RCC4/Mock após tratamento com rapamicina e em laranja escuro estão representadas as vias down-reguladas nas células RCC4/Mock após tratamento com rapamicina com FDR < 0,05.

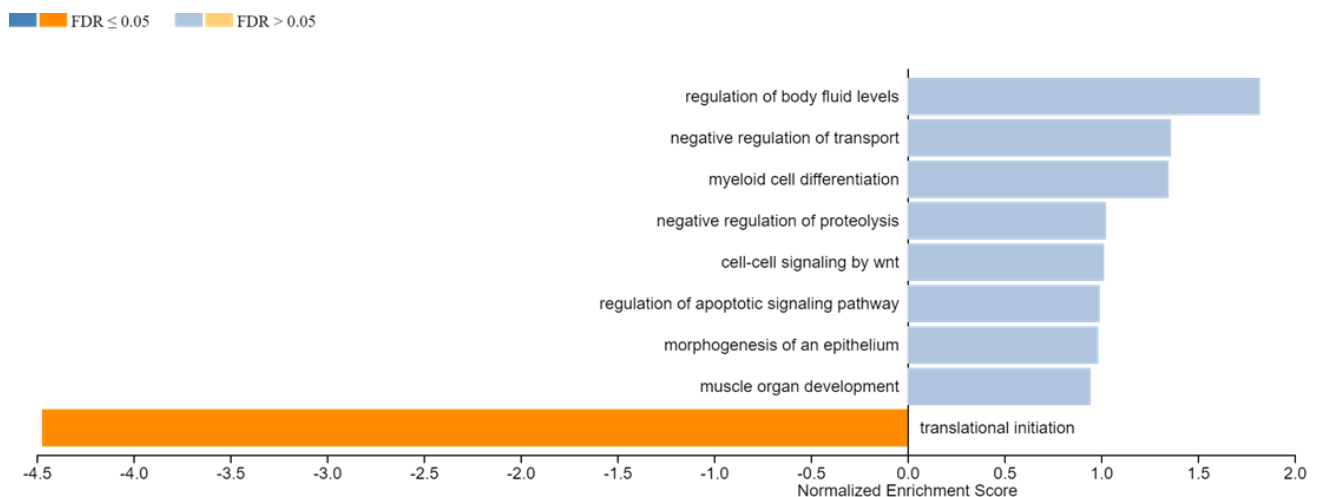
As células RCC4/VHL tratadas com rapamicina por 2h não apresentaram processos enriquecidos dentro do *gene ontology* com valor de FDR significativo (< 0,05) no mRNA total. No mRNA polissomal, genes down-regulados após 2h de tratamento com rapamicina participam de processos de catabolização de RNA, localização proteica para o retículo endoplasmático, estabelecimento da localização da proteína para a membrana, biogênese do complexo ribonucleoproteico e início da tradução (Figura 29).



**Figura 29. Vias enriquecidas nas células com VHL após inibição de mTORC1 por 2h.**

Representação da análise funcional pelo *gene ontology* a partir da expressão diferencial de genes nas células RCC4/VHL após tratamento com rapamicina. No gráfico estão as vias enriquecidas no mRNA polissomal das células RCC4/VHL após o tratamento por 2h com rapamicina em comparação com as células tratadas apenas com SFB. Em laranja estão representadas as vias down-reguladas nas células RCC4/VHL após tratamento com rapamicina por 2h com FDR < 0,05.

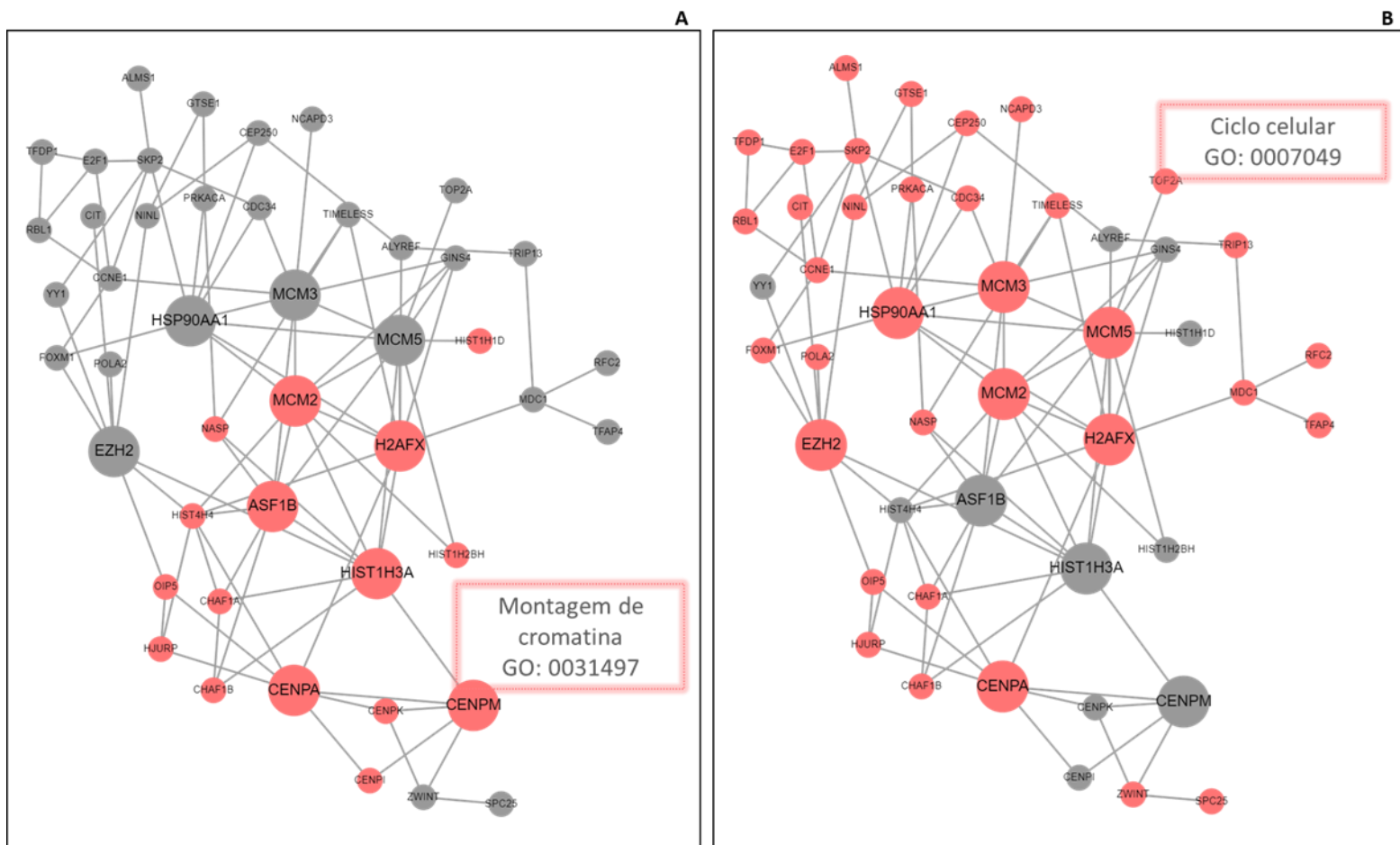
Após 16h de tratamento com rapamicina, os genes down-regulados no mRNA polissomal nas células RCC4/VHL participam do processo de início da tradução (**Figura 30**), enquanto nenhum processo está enriquecido no mRNA total. Esses resultados nos demonstram que o processo de tradução via mTOR pode ser dependente da presença de VHL, ou seja, da sinalização celular em normóxia. Em uma situação onde a sinalização de hipóxia é constante (ausência de VHL), os mecanismos de início de tradução estão prejudicados.



**Figura 30. Vias enriquecidas nas células com VHL após inibição de mTORC1 por 16h.**

Representação da análise funcional pelo *gene ontology* a partir da expressão diferencial de genes nas células RCC4/VHL após tratamento com rapamicina. No gráfico estão as vias enriquecidas no mRNA polissomal das células RCC4/VHL após o tratamento por 16h com rapamicina em comparação com as células tratadas apenas com SFB. Em laranja escuro estão representadas as vias down-reguladas nas células RCC4/VHL após tratamento com rapamicina por 16h com FDR < 0,05.

Após identificar as vias enriquecidas nas amostras de interesse, os genes encontrados diferencialmente expressos apenas no mRNA polissomal das células RCC4/Mock e RCC4/VHL foram selecionados para análise pelo método de enriquecimento *network topology-based analysis* (NTA) no WebGestalt. Com esse método, é possível incluir uma lista de genes no software e o algoritmo constrói uma rede de interações entre os genes de interesse e seus elos, formando uma sub-rede baseada nos mesmos processos biológicos do *gene ontology* utilizados para as análises de enriquecimento de vias pelo método GSEA. Desta forma, podemos identificar os processos envolvidos regulados preferencialmente pela tradução e que não foram encontrados no mRNA total. Após 16h de tratamento com soro, as células RCC4/Mock apresentaram genes up-regulados que participam da montagem de cromatina (Figura 31A) e do ciclo celular (Figura 31B).

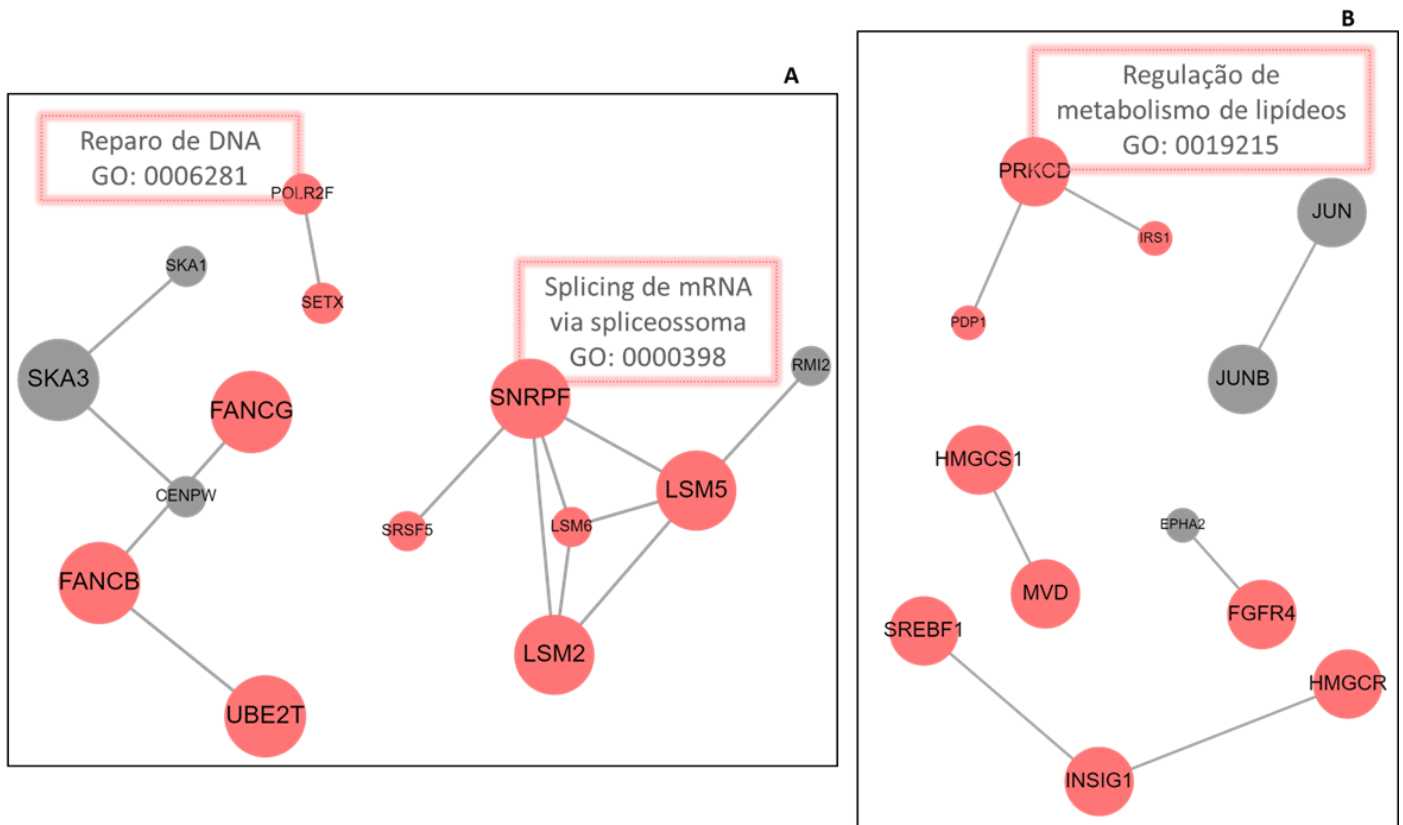


**Figura 31. Análise de redes baseadas em topologia (NTA) em células deficientes em VHL.**

Análise de redes baseadas em topologia caracterizadas pelo *gene ontology* (GO) a partir da expressão diferencial de genes no mRNA polissomal das células RCC4/Mock. Os genes foram incluídos em forma de lista e o algoritmo retornou valores de  $p$  significativo ( $< 0,05$ ) para vias relacionadas a (A) montagem de cromatina e (B) ciclo celular. Os genes que participam de cada via estão destacados em vermelho. Os círculos maiores indicam os genes

encontrados em nossas análises e os círculos menores indicam os genes que interagem diretamente em cada via.

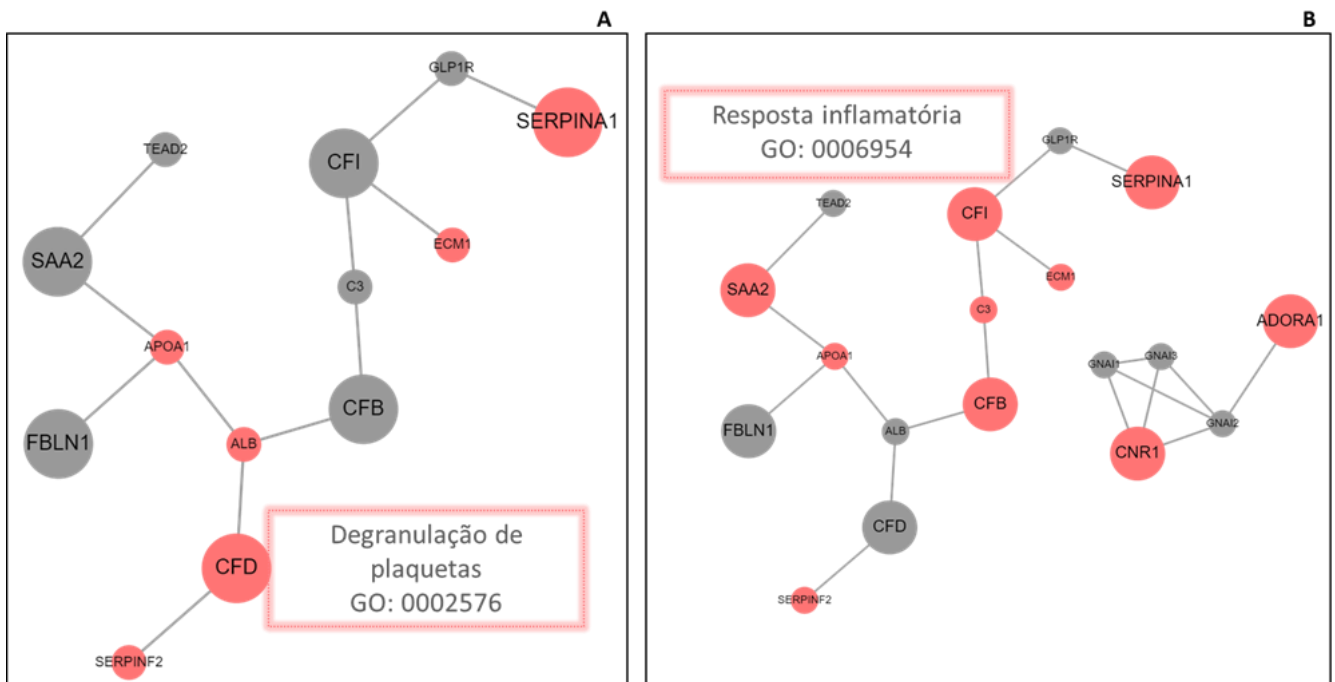
Já as células RCC4/VHL apresentaram genes down-regulados no mRNA polissomal enriquecidos na regulação de metabolismo de lipídeos (**Figura 32B**) e up-regulados nos processos de reparo de DNA e splicing de mRNA via spliceossoma após 16h de estímulo com soro (**Figura 32A**).



**Figura 32. Análise de redes baseadas em topologia (NTA) em células com VHL.**

Análise das redes baseadas em topologia caracterizadas pelo *gene ontology* (GO) a partir da expressão diferencial de genes no mRNA polissomal das células RCC4/VHL após tratamento com SFB. Os genes foram inseridos em forma de lista e o algoritmo retornou valores de  $p$  significativo ( $< 0,05$ ) para vias (A) up-reguladas e (B) down-reguladas. Os genes que participam de cada via estão destacados em vermelho. Os círculos maiores indicam os genes encontrados em nossas análises e os círculos menores indicam os genes que interagem diretamente em cada via.

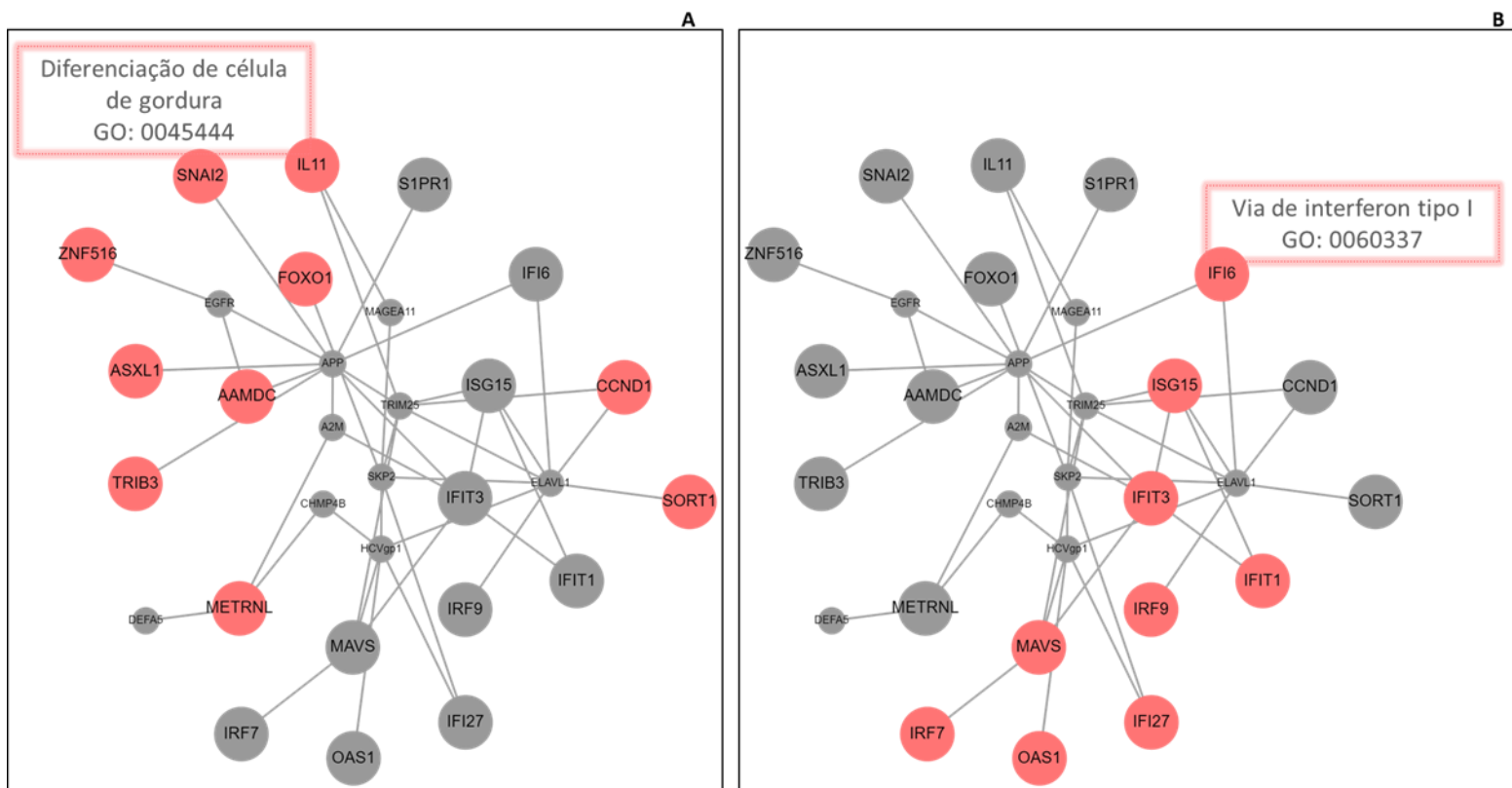
Os genes up-regulados nas células RCC4/Mock em comparação com as células RCC4/VHL estão enriquecidos no processo de degranulação de plaquetas (**Figura 33A**) e na resposta inflamatória (**Figura 33B**).



**Figura 33. Análise de redes baseadas em topologia (NTA) up-reguladas nas células deficientes em VHL em comparação com as células com VHL restituído.**

Análise das redes baseadas em topologia caracterizadas pelo *gene ontology* (GO) a partir da expressão diferencial de genes no mRNA polissomal das células RCC4/Mock em comparação com as células RCC4/VHL após tratamento com SFB por 2h. Os genes foram inseridos em forma de lista e o algoritmo retornou valores de  $p$  significativo ( $< 0,05$ ) para vias relacionadas a (A) degranulação de plaquetas e (B) resposta inflamatória. Os genes que participam de cada via estão destacados em vermelho. Os círculos maiores indicam os genes encontrados em nossas análises e os círculos menores indicam os genes que interagem diretamente em cada via.

Após 16h de estímulo com SFB, encontramos o processo de diferenciação de célula de gordura (**Figura 34A**) e a via de interferon do tipo I (**Figura 34B**) down-regulados nas células RCC4/Mock, a partir dos genes diferencialmente expressos no mRNA polissomal.

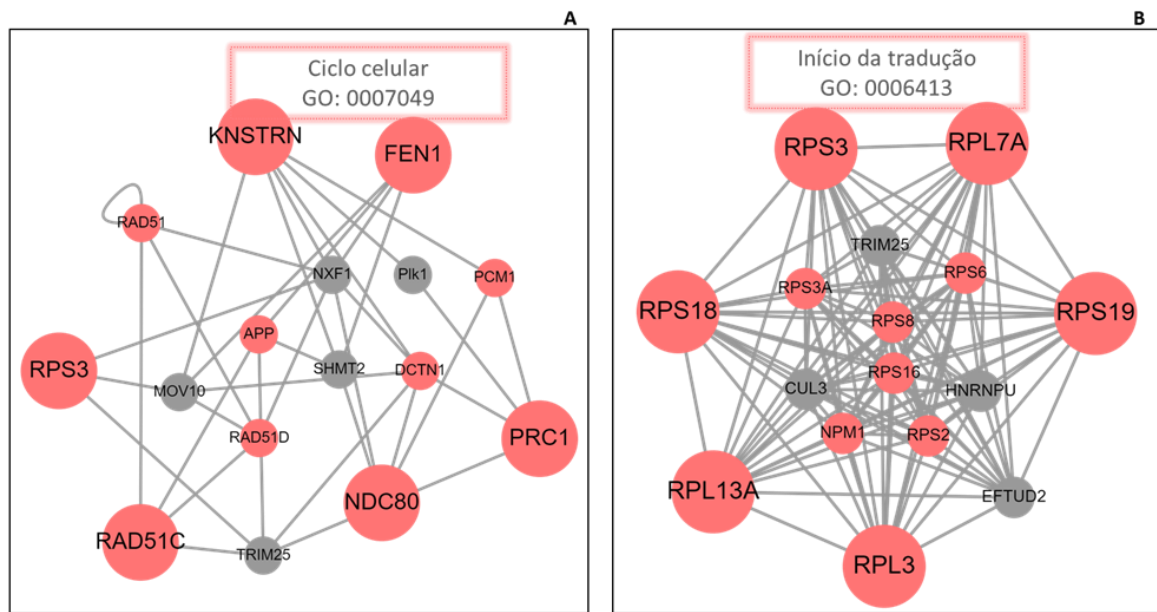


**Figura 34. Análise de redes baseadas em topologia (NTA) down-reguladas nas células deficientes em VHL em comparação com as células com VHL restituído.**

Análise das redes baseadas em topologia caracterizadas pelo *gene ontology* (GO) a partir da expressão diferencial de genes no mRNA polissomal das células RCC4/VHL em comparação com as células RCC4/Mock após tratamento com SFB por 16h. Os genes foram imputados em forma de lista e o algoritmo retornou valores de  $p$  significativo ( $< 0,05$ ) para vias relacionadas a (A) diferenciação de célula de gordura e (B) via de interferon tipo I. Os genes que participam de cada via estão destacados em vermelho. Os círculos maiores indicam os genes encontrados em nossas análises e os círculos menores indicam os genes que interagem diretamente em cada via.

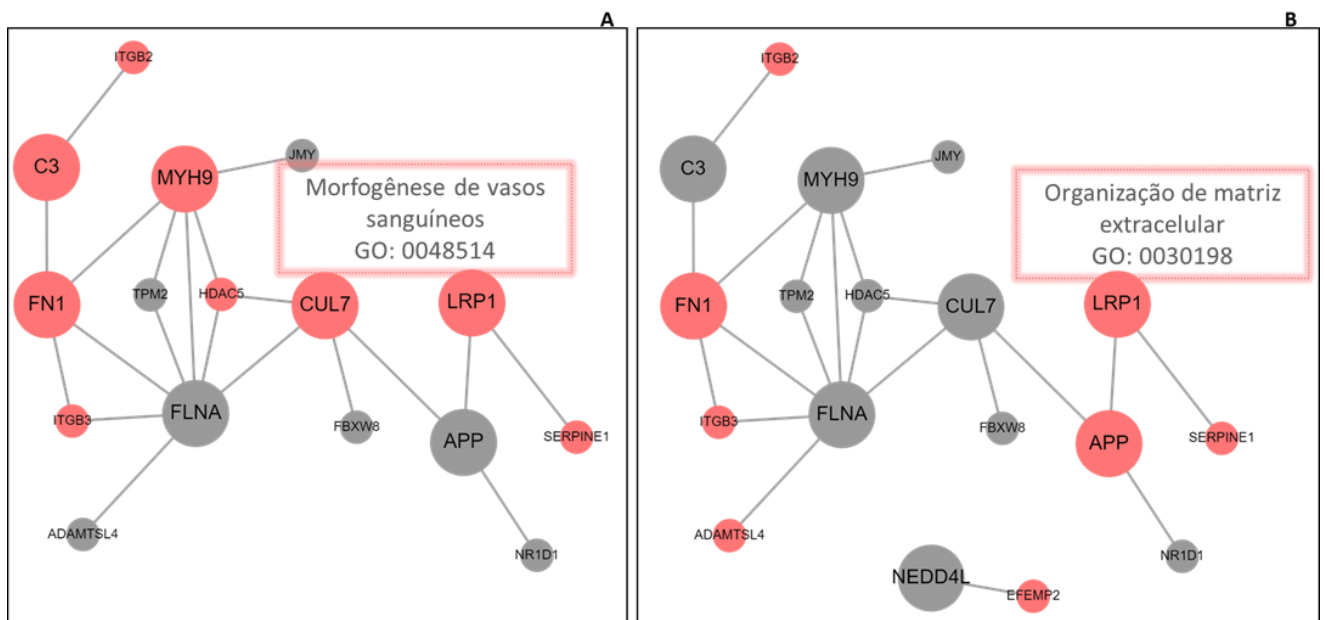
Após o tratamento com rapamicina, ambas as linhagens celulares apresentaram diminuição da regulação dos genes pela tradução e encontramos genes down-regulados nas células RCC4/Mock enriquecidos no processo de ciclo celular (**Figura 35A**) e no início da tradução nas células RCC4/VHL (**Figura 35B**). Os genes encontrados up-regulados nas células RCC4/Mock estão enriquecidos nos processos de morfogênese de vasos sanguíneos (**Figura 36A**) e organização de matriz extracelular (**Figura 36B**).





**Figura 35. Análise de redes baseadas em topologia (NTA) down-reguladas nas células RCC4 após inibição de mTORC1.**

Análise das redes baseadas em topologia caracterizadas pelo *gene ontology* (GO) a partir da expressão diferencial de genes no mRNA polissomal das células (A) RCC4/Mock e (B) RCC4/VHL após inibição da via de mTORC1 com tratamento com rapamicina por 16h. Os genes foram imputados em forma de lista e o algoritmo retornou valores de  $p$  significativo ( $< 0,05$ ) para as vias destacadas nas figuras. Os genes que participam de cada via estão destacados em vermelho.



**Figura 36. Análise de redes baseadas em topologia (NTA) up-reguladas nas células RCC4/Mock após inibição de mTORC1.**

Análise das redes baseadas em topologia caracterizadas pelo *gene ontology* (GO) a partir da expressão diferencial de genes no mRNA polissomal das células RCC4/Mock após inibição da via de mTORC1 com tratamento com rapamicina por 16h. Os genes foram imputados em forma de lista e o algoritmo retornou valores de  $p$  significativo

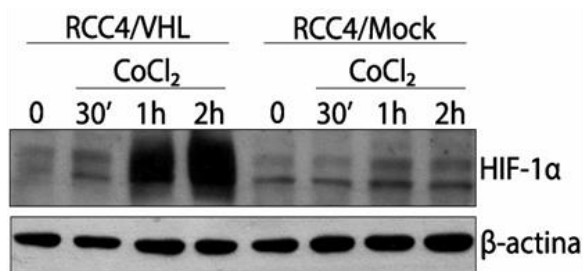
(< 0,05) para as vias relacionadas a (A) morfogênese de vasos sanguíneos e (B) organização de matriz extracelular. Os genes que participam de cada via estão destacados em vermelho.

O perfil polissomal e o translatoema das células RCC4/Mock e RCC4/VHL indicam diferenças significativas na expressão gênica tanto nas células apenas estimuladas com SFB quanto após o tratamento com rapamicina. O gene VHL é frequentemente inativado em CRCC, sendo o primeiro passo na tumorigênese. A via de mTOR é um fator central na modulação da tradução global e específica, e sua atividade é alterada durante a resposta a hipóxia e mutações em VHL, onde ocorre a estabilização das proteínas HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ . Nosso objetivo principal foi comparar as diferenças na tradução global e os genes diferencialmente expressos nas células deficientes em VHL tratadas com rapamicina. Nossos resultados mostraram diferenças nas assinaturas diferencialmente expressas relacionadas principalmente com o status de VHL, apesar de ambas as linhagens mostrarem mudanças na tradução de mRNAs após inibição da via de mTOR. Dessa forma, é possível concluir que as alterações na tradução associadas a perda de VHL dependem apenas parcialmente de fatores *downstream* a via de mTOR.

#### 5.1.4 Efeito do cloreto de cobalto (CoCl<sub>2</sub>) na via de mTOR e na estabilização de HIF-1 $\alpha$ e HIF-2 $\alpha$ nas linhagens celulares de CRCC.

O cloreto de cobalto (CoCl<sub>2</sub>) é um mimetizador químico de hipóxia. Ele age se ligando aos domínios dependentes de oxigênio nas subunidades HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  e inibe a degradação mediada por pVHL (148). Existem diferenças entre os mecanismos envolvidos em hipóxia e no acúmulo de HIF- $\alpha$  induzido por mimetizadores. O tratamento com CoCl<sub>2</sub> diminui a proliferação celular inibindo a síntese de DNA, que causa um acúmulo de células na fase G2, independente da estabilização de HIF- $\alpha$ , por exemplo (149). Para avaliar o papel de HIF-1 $\alpha$  na interação com a via de mTOR e na taxa traducional, as células RCC4 foram tratadas com CoCl<sub>2</sub>, que inibe a ação das enzimas polil-hidroxilase – responsáveis por marcar a proteína para a degradação via VHL – causando seu acúmulo na célula (148). As células RCC4 foram tratadas por diferentes tempos com CoCl<sub>2</sub> e a quantidade de HIF-1 $\alpha$  em cada célula foi determinada por Western Blot (**Figura 37**). A estabilização de HIF-1 $\alpha$  nas células RCC4/VHL ocorre a partir de 30 minutos de tratamento e é intensificada com 2 horas. Já nas células RCC4/Mock a quantificação de HIF-

HIF-1 $\alpha$  permaneceu semelhante ao controle não tratado. É importante ressaltar que a estabilização de HIF-1 $\alpha$  pelo cloreto de cobalto ocorre a nível proteico, não interferindo nas quantidades totais de mRNA. Também deve-se levar em consideração que outros mecanismos podem estar envolvidos na regulação de HIF na ausência de pVHL, apesar da regulação de HIF ser majoritariamente por essa proteína. P53 também é capaz de marcar HIF- $\alpha$ , mediado por Mdm2, para degradação via proteassoma após tratamento com CoCl<sub>2</sub> (150,151). A manutenção da expressão de HIF- $\alpha$  também ocorre pela fosfolipase D (PLD). O tratamento com CoCl<sub>2</sub> induz HIF- $\alpha$  em células com pVHL, dependente da ação de PLD. Em glioblastoma, por exemplo, PLD ativa a via de HIF-VEGF, induzindo a expressão de angiogenina (proteína que estimula o surgimento de novos vasos sanguíneos), favorecendo a sobrevivência do tumor (152).

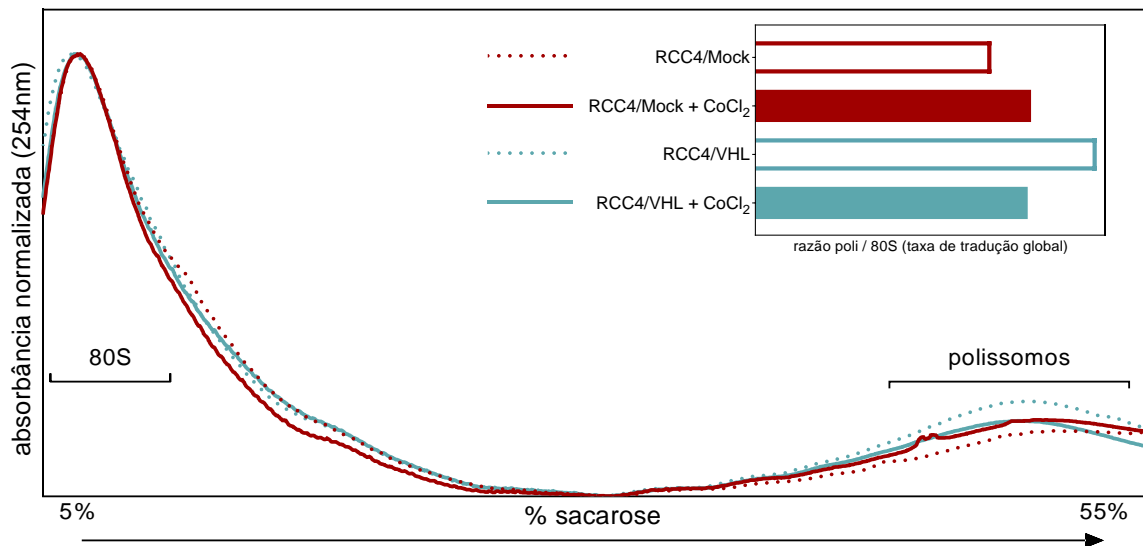


**Figura 37. Expressão de HIF-1 $\alpha$  em linhagens celulares de CRCC.**

As células RCC4/VHL e RCC4/Mock foram tratadas com CoCl<sub>2</sub> 150  $\mu$ M por 30 min, 1 h ou 2 h para determinar os níveis de HIF-1 $\alpha$  após estabilização da proteína. Em paralelo, células sem tratamento foram usadas como controle. Os extratos celulares foram fracionados por eletroforese em gel de SDS-Page. A quantidade de HIF-1 $\alpha$  foi normalizada a partir do controle endógeno ( $\beta$ -actina).

Nosso próximo passo foi avaliar a taxa de tradução das células RCC4/Mock e RCC4/VHL tratadas com CoCl<sub>2</sub> através do perfil polissomal (**Figura 38**). O objetivo foi avaliar se a taxa de tradução global das células RCC4/VHL apresentariam níveis parecidos com os observados nas células RCC4 Mock, as quais não possuem um mecanismo de degradação de HIF-1 $\alpha$  via pVHL. As células não tratadas continuam a apresentar os mesmos dados vistos anteriormente, onde a taxa traducional das células RCC4/Mock é menor que as taxas das células com VHL. Porém, ao tratar as células com cloreto de cobalto e estabilizar HIF-1 $\alpha$  nessas células, observamos uma redução da tradução para níveis semelhantes às células com VHL mutado. Ao contrário, as células RCC4/Mock não parecem ter sofrido com o efeito do cloreto de cobalto, assim como os níveis de HIF-1 $\alpha$ . Mecanismos de regulação de HIF independente de VHL não devem ser afetados no tratamento com cloreto de cobalto pelo efeito desse reagente apenas na

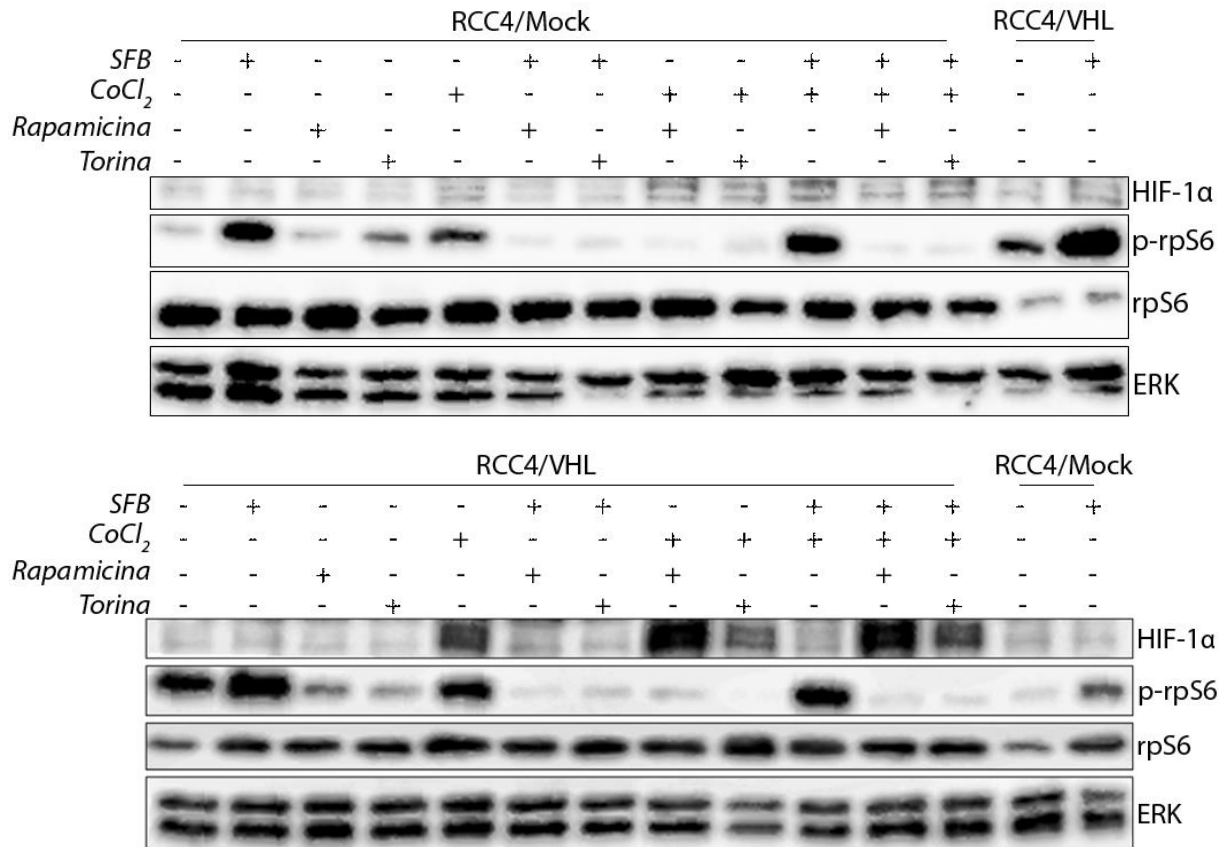
regulação clássica dessas proteínas. Com isso, as taxas de tradução não apresentaram uma queda assim como observada nas células com VHL já que a estabilização de HIF-1 $\alpha$  afeta mecanismos de regulação da tradução.



**Figura 38. Perfil polissomal das linhagens celulares de CRCC após tratamento com cloreto de cobalto.**

As células RCC4/Mock e RCC4/VHL foram tratadas com CoCl<sub>2</sub> 150  $\mu$ M por 2h e os extratos celulares foram centrifugados à 39.000 RPM por 2h à 4°C em gradiente de sacarose. As amostras foram fracionadas e os gráficos gerados a partir da absorvância normalizada de cada amostra foram quantificados para determinar a taxa traducional das células. Quantificação da área do pico de 80S e de polissomos pelo ImageJ.

A via de mTOR é responsável pelo controle da tradução de HIF-1 $\alpha$ , mas em um mecanismo de feedback negativo, o acúmulo de HIF-1 $\alpha$  causa inibição da via de mTOR, para controlar o gasto celular de ATP (142,153). A tradução de HIF-1 $\alpha$  é modulada pelos alvos de mTORC1, as proteínas 4E-BP1 e S6K, e a transcrição é regulada pela fosforilação de STAT3 (153). Como a rapamicina é um dos inibidores da via de mTOR, analisamos seu efeito nas células renais tratadas com cloreto de cobalto (**Figura 39**).



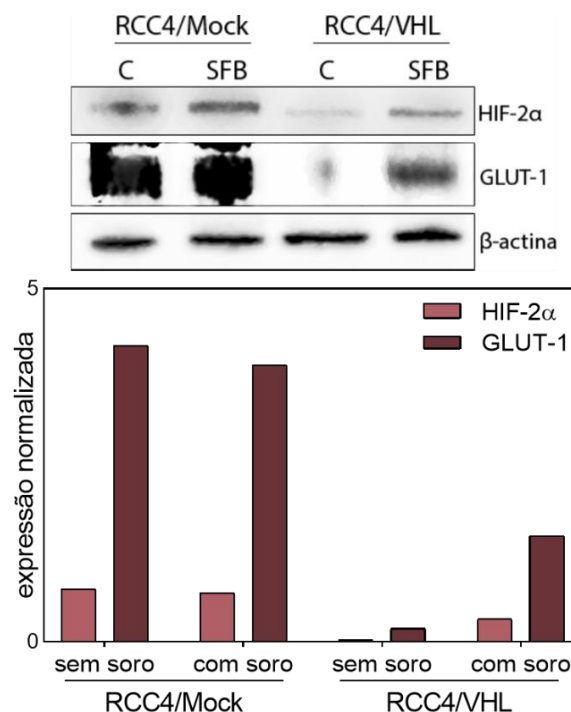
**Figura 39. Expressão de HIF-1 $\alpha$  e fosforilação de rpS6 em linhagens celulares de CRCC.**

As células RCC4/Mock e RCC4/VHL foram carenciadas e tratadas apenas com SFB, cloreto de cobalto, rapamicina e torina; com combinações distintas de dois ou três tratamentos; e seus controles não tratados.

Nas células RCC4/VHL, o tratamento com rapamicina não foi capaz de reduzir totalmente a expressão de HIF-1 $\alpha$  após tratamento com cloreto de cobalto. A rapamicina é um inibidor de mTORC1, enquanto a torina inibe ambos mTORC1 e mTORC2. Nas células RCC4/VHL, o tratamento com torina foi capaz de inibir o acúmulo de HIF-1 $\alpha$ , sugerindo uma participação de mTORC2 na regulação de HIF-1 $\alpha$ . Esse resultado ainda confirma o que foi observado anteriormente que as células com VHL possuem uma ativação basal maior da via de mTOR, visto pelo um aumento na expressão de p-rpS6, o que explica os níveis de tradução global maiores em comparação com as células RCC4/Mock (154,155).

Nos resultados anteriores, verificamos menores taxas de tradução global nas células RCC4/Mock, independente do tratamento com a rapamicina, sugerindo que a inativação do VHL influencia na tradução. Apesar disso, os tratamentos realizados nessas células não se mostraram tão eficientes quanto nas células RCC4/VHL. Alguns tumores sólidos se adaptam em situações similares à hipóxia, onde o influxo de O<sub>2</sub> é menor que o consumo. Um desses mecanismos é a presença do complexo eIF4F<sup>H</sup>, formado por HIF-2 $\alpha$ , RBM4 (*RNA Binding Motif*

*Protein 4*) e eIF4E2 (*eukaryotic translation initiation factor 4E family member 2*). Esse complexo ativa seletivamente a tradução de mRNAs que contenham HREs (do inglês, *hypoxic response elements*). O complexo eIF4F<sup>H</sup> é capaz de capturar o cap m7G e interagir com eIF4G3 (homólogo de eIF4G) e com eIF4A, (156) iniciando a tradução e evadindo da repressão da síntese proteica induzida por hipóxia. Dentre mRNAs que possuem HREs e são regulados por eIF4F<sup>H</sup> estão receptores de fatores de crescimento (157,158) e moléculas de adesão célula-célula (118,158). Nas células RCC4/Mock os níveis de expressão de HIF-2 $\alpha$  são maiores que nas células com RCC4/VHL. Também analisamos os níveis de GLUT-1, um transportador de glicose que está frequentemente alterado em carcinomas renais e é um alvo direto de HIF-2 $\alpha$ . Essa proteína está mais elevada nas células RCC4/Mock do que nas células RCC4/VHL (**Figura 40**). Baixos níveis de ATP podem ativar a via de AMPK, responsável por processos como aumento da captação de glicose e da autofagia. Células com VHL mutado dependem da disponibilidade de glicose para crescer, já que o aporte de oxigênio é menor (144). Nossos resultados sugerem que o controle traducional nas células RCC4/Mock pode estar influenciando tanto na tradução global quanto na tradução específica.

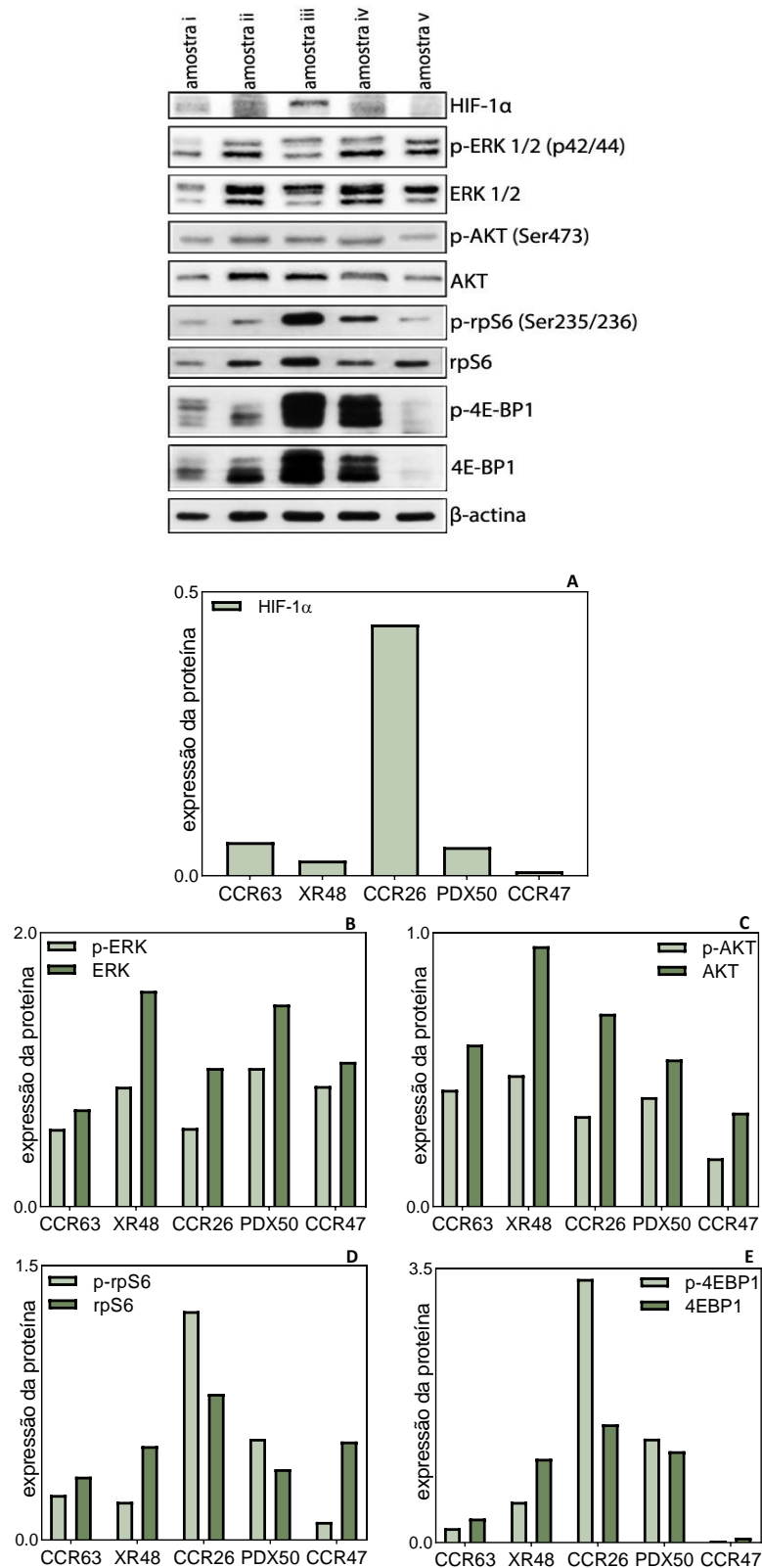


**Figura 40. Expressão e quantificação de HIF-2 $\alpha$  e GLUT-1 em linhagens celulares de CRCC.**

As células RCC4/Mock e RCC4/VHL foram carenciadas *overnight* e tratadas ou não com SFB por 2h e os extratos das amostras foram utilizados para determinar a expressão das proteínas de interesse por Western Blot. As bandas correspondentes a cada proteína foram quantificadas pelo ImageJ e normalizadas pelo controle endógeno ( $\beta$ -actina).

### 5.1.5 Taxas de tradução global, expressão de HIF-1 $\alpha$ , e de proteínas da via de mTOR e ERK em PDX.

Experimentos com linhagens celulares são modelos funcionais que nos ajudam a direcionar os objetivos do projeto, porém modelos *in vivo* ainda são boas ferramentas para reproduzir situações que mais se aproximem da realidade. Por isso, em colaboração com o Dr. Tiago Góss e seu aluno de doutorado Adriano Beserra, experimentos com *patient-derived xenograft* (PDX) foram desenvolvidos com excelência pelo grupo. Este modelo permitirá observar diferenças entre taxas traducionais antes e após tratamentos com as principais terapias-alvo utilizadas em pacientes com CRCC. A partir destes ensaios, poderemos avaliar alvos diferencialmente expressos em tecidos de pacientes ou células para um estudo mais detalhado da biologia deste tumor. Inicialmente separamos cinco tumores provindos de diferentes PDX com graus clínicos altos e baixos no momento da coleta e avaliamos a expressão de proteínas envolvidas na via de mTOR, via de ERK e da proteína HIF-1 $\alpha$  (**Figura 41**). Desta forma, podemos escolher tecidos com características diferentes e observar como cada tratamento irá atuar na expressão destas proteínas e conseqüentemente em alvos específicos desta via.



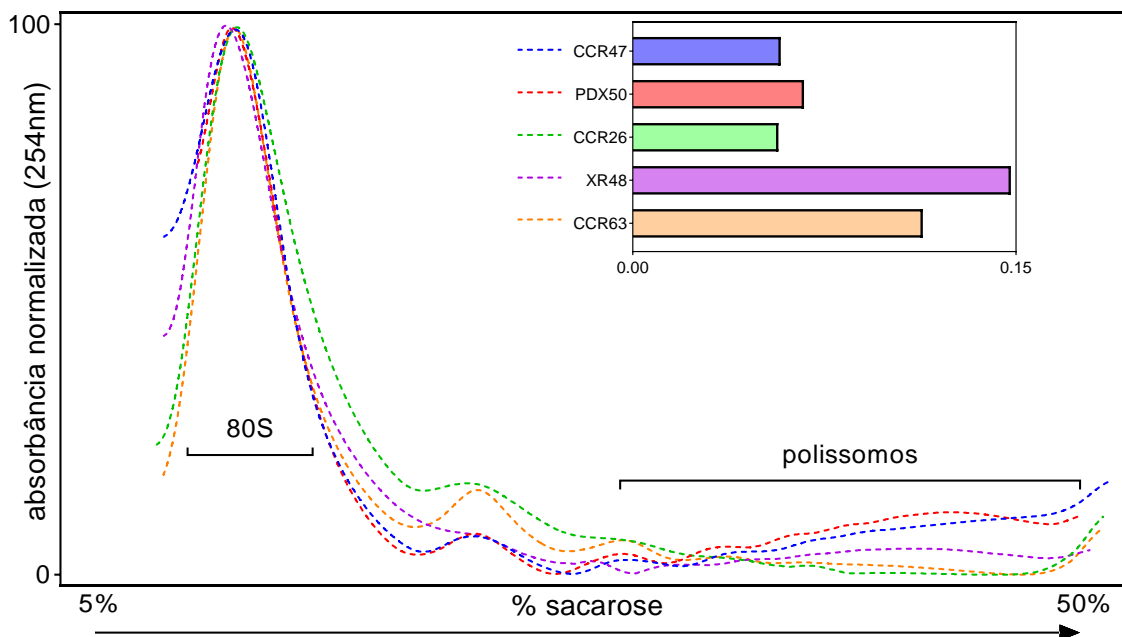
**Figura 41. Expressão de HIF-1 $\alpha$ , da via de ERK e da via de mTOR em PDX.**

Cinco tecidos de PDX foram selecionados de acordo com o grau clínico no momento do diagnóstico e a expressão das proteínas foram avaliadas por Western Blot. Com os extratos celulares obtidos, foram determinadas a presença ou ausência de (A) HIF-1 $\alpha$  proteínas (B) ERK 1/2, (C) AKT, (D) rpS6, (E) 4E-BP1, e suas formas fosforiladas. O extrato de cada tecido foi fracionado por eletroforese em gel de SDS-Page em diferentes concentrações a



dependem da proteína. As bandas correspondentes a cada proteína foram quantificadas pelo ImageJ e relativizadas pelo controle endógeno ( $\beta$ -actina). Cada coluna corresponde a uma amostra obtida de diferentes PDX.

Os tecidos coletados apresentaram diferentes taxas de tradução, onde foi possível observar maiores taxas traducionais em tecidos com maior estadiamento. Os tecidos com taxas mais baixas de tradução demoraram um tempo maior para crescer no camundongo. O inverso aconteceu nos tecidos com maiores taxas de tradução global, que cresceram em menor tempo. O caso CCR36 apresentou uma expressão mais alta de HIF-1 $\alpha$  e uma taxa de tradução global, ao contrário dos outros casos onde não foi observada uma expressão significativa da proteína patológica (**Figura 42 e Tabela 3**). Ao contrário das linhagens celulares com pVHL mutado, a expressão de HIF-1 $\alpha$  no tecido (**Figura 41A**) acompanha a expressão da via de mTOR enquanto a fosforilação de ERK (**Figura 41B**) é inversamente proporcional a ativação dos subprodutos de mTORC1, rps6 e 4E-BP1 (**Figura 41D e 41E**).



**Figura 42. Perfil polissomal e taxa traducional de PDX.**

Amostras de diferentes PDX foram centrifugadas à 39.000 RPM por 2h à 4°C em gradiente com concentrações de sacarose entre 5% a 50% para separação do RNA polissomal. A absorbância dos gradientes foi lida a 254 nm. Os gráficos foram gerados pelo GraphPad Prism e a área abaixo dos picos de 80S e do pico dos polissomos foram quantificadas pelo ImageJ.

As informações sobre características anatomopatológicas e do tempo de crescimento do PDX foram fornecidas pelo aluno de doutorado Adriano Beserra. O caso CCR26 apresentou

uma baixa taxa de tradução global, apesar de ser um tumor com características mais agressivas. Apesar da ativação da via de mTOR presente neste tecido, foi encontrada uma expressão maior de HIF-1 $\alpha$ , o que pode estar interferindo na tradução global neste tecido. Além disso, o caso XR48 que apresentou as maiores taxas de tradução global em comparação com os outros casos cresceu no camundongo em menos tempo quando comparado com os tecidos com baixas taxas de tradução global. Apesar disso, o paciente não apresentou metástase e nem veio a óbito, ao contrário do caso CCR26. Este tipo de análise nos indica que diversos mecanismos de crescimento e sobrevivência celular podem estar envolvidos em casos de CRCC e que, para alcançar melhores resultados nos tratamentos personalizados, o uso de ferramentas como o PDX pode fornecer informações moleculares valiosas. Também é possível testar diferentes tratamentos nos modelos animais após o crescimento do tumor para melhor avaliação da resposta às terapias (Tabela 3).

**Tabela 3. Características anatomopatológicas e moleculares dos tecidos de PDX.**

ID	ISUP	Sarc	Rab	Necr	cm	pT	Tempo	Meta	Óbito	HIF1 $\alpha$	ERK	AKT	RPS6	4EBP1	Poly/80S
CCR63	3	N	N	N	8.0	T3b	5	N	N	-	=	↓	↓	↓	0,113
XR48	4	S	S	S	14.5	T3a	3	N	N	-	↓	↓	↓	↓	0,148
CCR26	4	S	S	S	9.5	T3a	1	S	S	+	↓	↓	↑	↑	0,057
PDX50	2	N	N	N	2.0	T1a	12	N	N	-	↓	↓	↑	↑	0,067
CCR47	3	N	N	N	2.3	T1a	6	N	N	-	=	↓	↓	↓	0,057

ID: identificação do tecido; ISUP: grau histológico ISUP; Sarc: presença de componente sarcomatoide; Rab: presença de componente rabdoide; cm: tamanho do tumor; tempo: tempo até o crescimento do tumor no camundongo; Meta: presença de metástase no diagnóstico; HIF-1 $\alpha$ : positivo ou negativo; ERK, AKT, RPS6, 4EBP1: = (expressão da proteína total e fosforiladas em níveis iguais), ↑ (maior expressão da proteína fosforilada em comparação com a proteína total), ↓ (menor expressão da proteína fosforilada em comparação com a proteína total); Poly/80S: taxa de tradução global.

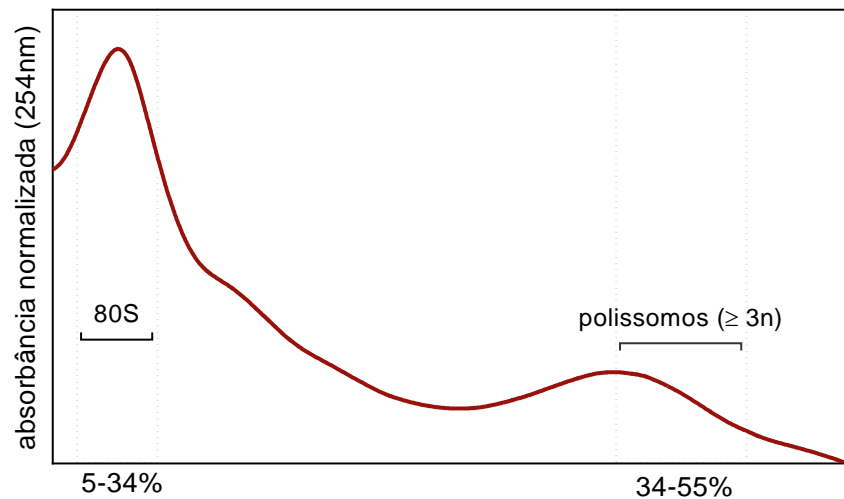
## 5.2 Tumores congelados do BioBanco do A.C. Camargo Cancer Center

### 5.2.1 Perfil polissomal two-steps das amostras dos pacientes com CRCC.

Após utilizar os modelos celulares para observar a diferença da eficiência da tradução nos modelos *in vitro*, iremos comparar as assinaturas encontradas em tecidos tumorais humanos. Assim como realizado nos experimentos com as células RCC4, as amostras de pacientes com CRCC foram selecionadas e o perfil polissomal. Porém, para conseguir a separação polissomal eficiente de tecidos com pouca quantidade de material, utilizamos o

gradiente *two-steps*. Este gradiente de sacarose é composto por três concentrações diferentes e, após a ultracentrifugação, é possível separar as amostras em dois picos contendo os ribossomos que não estão associados a moléculas de mRNA daqueles que estão participando ativamente da tradução no momento da coleta do tecido (**Figura 43**). Inicialmente, podemos inferir a taxa de tradução global destes pacientes e, após a extração de RNA e sequenciamento, serão analisados os conjuntos de genes diferencialmente expressos em cada paciente para determinar a tradução específica e correlacionar com características e desfechos clínicos.

Nesta tese estão apresentados apenas os resultados da tradução global correlacionadas com os dados obtidos dos prontuários eletrônicos de cada paciente. Posteriormente, as amostras serão enviadas para o Instituto Karolinska onde serão sequenciadas. Para esta etapa do projeto foram selecionados 116 pacientes com diagnóstico de carcinoma renal de células claras. Desses, 108 possuíam tecido congelado no BioBanco de Tecidos Tumoriais do AC Camargo Cancer Center. Foram extraídos o RNA total e polissomal das amostras após fracionamento de polissomos. Os pacientes foram selecionados a partir do estadiamento clínico no primeiro diagnóstico, onde separamos em grupos diferentes para avaliar os resultados a partir da translatoômica. No primeiro grupo foram incluídos os pacientes de estadiamento clínico baixo I e II que apresentaram ou não recidiva local ou metástase à distância; no segundo grupo foram incluídos os pacientes de estadiamento III que apresentaram ou não recidiva local ou metástase à distância; e no último grupo foram incluídos pacientes de estadiamento IV, com doença metastática sincrônica. Nosso objetivo é avaliar quais o perfil de mRNAs diferencialmente traduzidos em cada grupo e correlacionar com os dados clínicos disponíveis nos prontuários dos pacientes. Após selecionarmos os pacientes pelo sistema de prontuários e a partir das amostras disponíveis no BioBanco de Tecidos Tumoriais do A.C. Camargo Cancer Center, os tecidos congelados foram processados e as amostras foram submetidas a ultracentrifugação em gradiente de sacarose não-linear (*two-steps*).



**Figura 43. Perfil polissomal de amostras tumorais de pacientes com CRCC.**

O gráfico é um exemplo representativo do perfil polissomal *two-steps* e dos picos correspondentes ao 80S e aos polissomos ( $\geq 3$  ribossomos acoplados à uma molécula de mRNA) das amostras de tecidos congelados obtidas para este projeto. As amostras coletadas no BioBanco de Tecidos Tumorais do A.C Camargo Cancer Center foram submetidas à ultracentrifugação por 39000 rpm por 2h à 4°C em gradiente de sacarose não linear com concentrações de 5%-34%-55%. Após a leitura da absorvância a 254 nm é possível observar a presença de dois picos distintos. As amostras coletadas do fracionamento polissomal foram congeladas para posterior extração de RNA e futuras análises. Na figura também está indicada a intersecção no gradiente onde cada pico está localizado de acordo com a porcentagem de sacarose.

O RNA total e polissomal extraído das amostras de tecidos de pacientes com CRCC serão posteriormente quantificados e a qualidade das amostras será avaliada pelo TapeStation. O equipamento determina a qualidade do RNA isolado da amostra a partir do RIN (*RNA integrity number*). Em colaboração com o Dr. Ola Larsson do Instituto Karolinska em Estocolmo – Suécia, será construída a biblioteca por meio da metodologia SmartSeq2 (que permite o sequenciamento de amostras de RNA com baixas quantidades) e, finalmente, o sequenciamento do RNA total e polissomal. As assinaturas encontradas nas amostras de tecidos tumorais serão, então, correlacionadas com os dados clínicos dos pacientes.

### 5.2.2 *Correlação da taxa global de tradução e características clínicas e patológicas de pacientes com CRCC.*

Além de separar o material que será posteriormente analisado por sequenciamento para análise do perfil de expressão dos diferentes grupos, foi determinada a taxa traducional de cada amostra. As amostras fracionadas pela técnica de perfil polissomal *two-steps* gera um cromatograma com dois picos distintos: o primeiro pico é referente à separação dos

ribossomos maduros 80S e o segundo pico é referente aos mRNAs que estão sendo ativamente traduzidos (polissomos). A área sob a curva gerada pode ser quantificada pelo *software* ImageJ nos dois momentos gerando a informação a partir do pico de 80S (onde contém mRNAs com baixa tradução ou no final da tradução e, conseqüentemente, com baixa expressão proteica) e do pico de polissomos. Após calcular a área sob a curva, é possível determinar a razão polissomo / 80S e encontrar a taxa traducional específica de cada amostra independentemente da quantidade de material utilizada inicialmente. Dessa forma, é possível identificar as amostras que possuem altas taxas traducionais ou baixas taxas traducionais e correlacionar essas informações com dados clínicos e patológicos da doença. Após realizar o perfil polissomal das amostras e determinar a taxa de tradução global de cada tecido, foram realizados testes não-paramétricos para comparar a taxa de tradução global entre os diferentes aspectos clínicos e anatomopatológicos dos pacientes (**Tabela 4**).

**Tabela 4. Comparações não paramétricas entre os dados demográficos, clínicos e anatomopatológicos dos pacientes com CRCC e mediana das taxas de tradução global.**

Variável	Categoria	n	Mediana	Min-Máx	Dp	p
<b>Idade</b>	≤ 40	14	0,187	0,052 – 0,406	0,116	0,063
	41 a 64	78	0,209	0,004 – 0,610	0,114	
	≥ 65	24	0,276	0,078 – 0,520	0,139	
<b>Sexo</b>	Masculino	66	0,209	0,004 – 0,610	0,119	0,546
	Feminino	50	0,224	0,004 – 0,515	0,125	
<b>Estadiamento clínico</b>	I	41	0,194	0,004 – 0,51	0,11	<b>0,01**</b>
	II	13	0,194	0,111 – 0,61	0,13	
	III	48	0,268	0,077 – 0,52	0,12	
	IV	14	0,217	0,118 – 0,341	0,07	
<b>Estadiamento clínico</b>	Baixo	54	0,194	0,004 – 0,61	0,11	<b>0,03*</b>
	Alto	62	0,24	0,077 – 0,52	0,12	
<b>ISUP</b>	2	25	0,19	0,004 – 0,412	0,1	0,137
	3	38	0,205	0,077 – 0,503	0,09	
	4	16	0,268	0,078 – 0,518	0,13	
<b>ISUP</b>	2	28	0,188	0,004 – 0,412	0,108	0,180
	3 e 4	54	0,211	0,077 – 0,518	0,114	
<b>Recidiva</b>	Não	64	0,216	0,004 – 0,520	0,126	0,868
	Sim	37	0,215	0,077 – 0,610	0,131	

<b>Sobrevida</b>	Vivo	92	0,216	0,004 – 0,520	0,117	0,763
	Óbito	24	0,212	0,123 – 0,610	0,136	
<b>Estadiamento patológico (pT)</b>	pT1	42	0,200	0,004 – 0,510	0,118	0,055
	pT2	13	0,190	0,108 – 0,610	0,131	
	pT3	59	0,240	0,077 – 0,520	0,119	
	pT4	2	0,223	0,118 – 0,327	0,148	
<b>Estadiamento patológico (pT)</b>	T1 e T2	55	0,194	0,004 – 0,610	0,120	<b>0,008*</b>
	T3 e T4	61	0,240	0,077 – 0,520	0,118	
<b>Metástase sincrônica</b>	Não	103	0,215	0,004 – 0,61	0,13	0,838
	Sim	13	0,220	0,129 – 0,341	0,07	
<b>Comprometimento linfonodal</b>	Nx/N0	112	0,215	0,004 – 0,610	0,121	0,853
	N1	4	0,271	0,097 – 0,405	0,154	
<b>Componente sarcomatoide</b>	Não	78	0,217	0,004 – 0,610	0,123	0,352
	Sim	3	0,205	0,078 – 0,237	0,084	
<b>Necrose</b>	Não	27	0,215	0,052 – 0,61	0,12	0,67
	Sim	53	0,206	0,004 – 0,52	0,12	
<b>Invasão perineural</b>	Não	110	0,214	0,004 – 0,610	0,123	0,752
	Sim	4	0,218	0,097 – 0,327	0,104	
<b>Invasão vascular sanguínea</b>	Não	95	0,212	0,004 – 0,61	0,12	0,924
	Sim	19	0,22	0,097 – 0,506	0,08	
<b>Invasão vascular linfática</b>	Não	108	0,215	0,004 – 0,61	0,12	0,84
	Sim	5	0,264	0,163 – 0,295	0,05	
<b>Histórico familiar de câncer</b>	Não	29	0,240	0,080 – 0,518	0,121	0,432
	Sim	55	0,228	0,004 – 0,515	0,114	
<b>Outra neoplasia</b>	Não	86	0,215	0,004 – 0,518	0,11	0,34
	Sim	20	0,273	0,052 – 0,61	0,15	

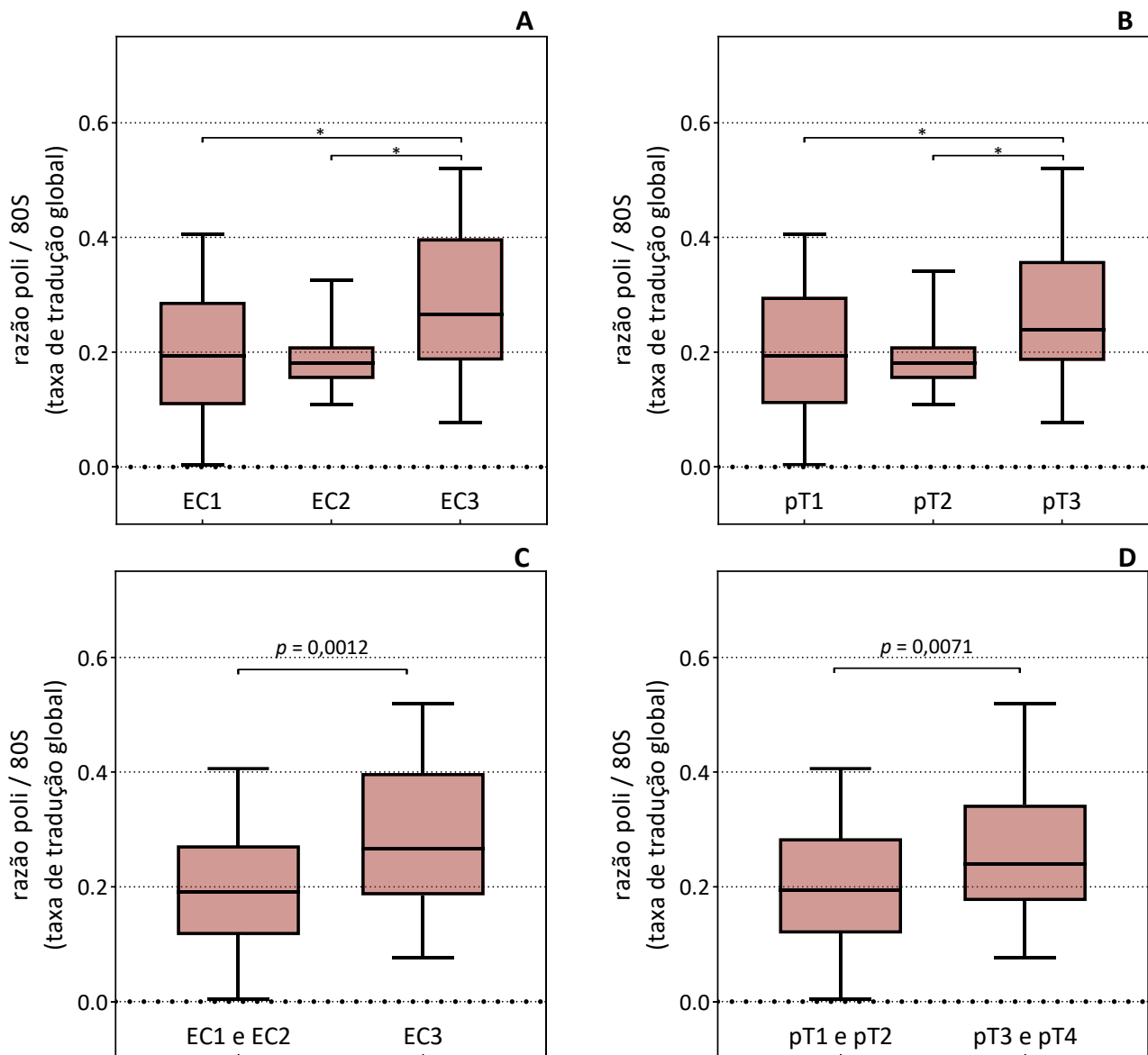
\* Teste não paramétrico U de Mann-Whitney para amostras independentes.

\*\* Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para amostras independentes.

Nas análises foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos das variáveis de estadiamento. Para avaliar em quais grupos estão as diferenças, testes *post hoc* foram realizados após o teste de Kruskal-Wallis. Inicialmente, as análises foram realizadas com os quatro grupos das variáveis que mostraram diferenças entre os grupos denominados EC 1 e EC 2 em comparação com o grupo denominado EC 3, e entre os grupos

denominados pT1 e pT2 em comparação com o grupo denominado pT3. Não foram encontradas diferenças significativas nas comparações com os grupos EC 4 e pT4, porém o número menor de pacientes neste grupo pode prejudicar as análises.

Comparando os grupos sem metástase no primeiro diagnóstico, foram encontradas as mesmas diferenças, onde os grupos com menor estadiamento clínico apresentaram menores taxas de tradução em comparação com o grupo com estadiamento clínico mais avançado (**Figura 44A**). Da mesma forma, o estadiamento patológico dos pacientes com menores taxas de tradução global é menor do que os pacientes com taxas de tradução global mais altas (**Figura 44B**). Como não houveram diferenças significativas entre os grupos de estadiamento I e II, e entre os grupos pT1 e pT2, os pacientes foram agrupados em uma só categoria (baixo). As comparações foram realizadas com pacientes que não apresentaram metástase sincrônica no primeiro diagnóstico (**Figura 44C e 44D**).



**Figura 44. Taxas de tradução global dos pacientes com CRCC não metastáticos correlacionadas com dados clínicos e anatomopatológicos.**

(A) Comparação da taxa de tradução global determinada pela quantificação dos perfis polissomais dos pacientes com CRCC sem diagnóstico de metástase no primeiro laudo com o estadiamento clínico coletado dos prontuários eletrônicos. (B) Comparação da taxa de tradução global determinada pela quantificação dos perfis polissomais dos pacientes com CRCC sem diagnóstico de metástase com o estadiamento patológico do tumor coletado dos prontuários eletrônicos. (C) Comparação da taxa de tradução global determinada pela quantificação dos perfis polissomais dos pacientes com CRCC sem diagnóstico de metástase no primeiro laudo com o estadiamento clínico coletado dos prontuários eletrônicos. Os pacientes foram separados entre estadiamento clínico baixo (EC1 e EC2) e estadiamento clínico alto (EC3). (D) Comparação da taxa de tradução global determinada pela quantificação dos perfis polissomais dos pacientes com CRCC sem diagnóstico de metástase com o estadiamento patológico do tumor coletado dos prontuários eletrônicos. Os pacientes foram separados entre tumores com dimensões limitadas ao rim (pT1 e pT2) e tumores que se estendem para grandes veias ou invadem outras estruturas renais (pT3 e pT4). As comparações entre dois grupos foram realizadas pelo teste U de Mann-Whitney para amostras não pareadas e as comparações entre 3 grupos foram realizadas pelo teste de análise de variância



(ANOVA) one-way seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey. \* indica diferenças significativas entre as comparações ( $p < 0,01$ ).

Para fazer as curvas de sobrevida apresentadas no próximo tópico, foi determinado um ponto de corte onde houve separação de dois grupos com sobrevidas distintas no teste de Log-Rank. As mesmas variáveis que foram utilizadas nos testes não paramétricos para comparar os diferentes grupos de pacientes de acordo com a mediana das taxas de tradução global (**Tabela 4**) apresentaram diferenças significativas quando realizado o teste de associação de Qui-quadrado para verificar a associação entre as variáveis nominais (**Tabela 5**). A variável estadiamento patológico não mostrou diferenças significativas quando analisadas as quatro categorias presentes no banco de dados, porém esse fato pode ter acontecido por ter apenas duas amostras na categoria T4 desta variável.

**Tabela 5. Associação entre as taxas de tradução global e estadiamento do tumor dos pacientes com CRCC.**

Variável	Categoria	Taxa de tradução global [n (%)]		p-valor
		Baixa	Alta	
Estadiamento clínico	I	25 (39,1)	15 (30)	<b>0,05*</b>
	II	10 (15,6)	2 (4)	
	III	21(32,8)	27 (54)	
	IV	8 (12,5)	6 (12)	
Estadiamento patológico (pT)	T1	25 (39,1)	16 (32)	0,10
	T2	10 (15,6)	2 (4)	
	T3	28 (43,8)	31 (62)	
	T4	1 (1,6)	1 (2)	
Estadiamento clínico	Baixo	35 (54,7)	17 (34)	<b>0,02*</b>
	Alto	29 (45,3)	33 (66)	
Estadiamento patológico (pT)	Baixo	35 (54,7)	18 (36)	<b>0,03*</b>
	Alto	29 (45,3)	32 (64)	

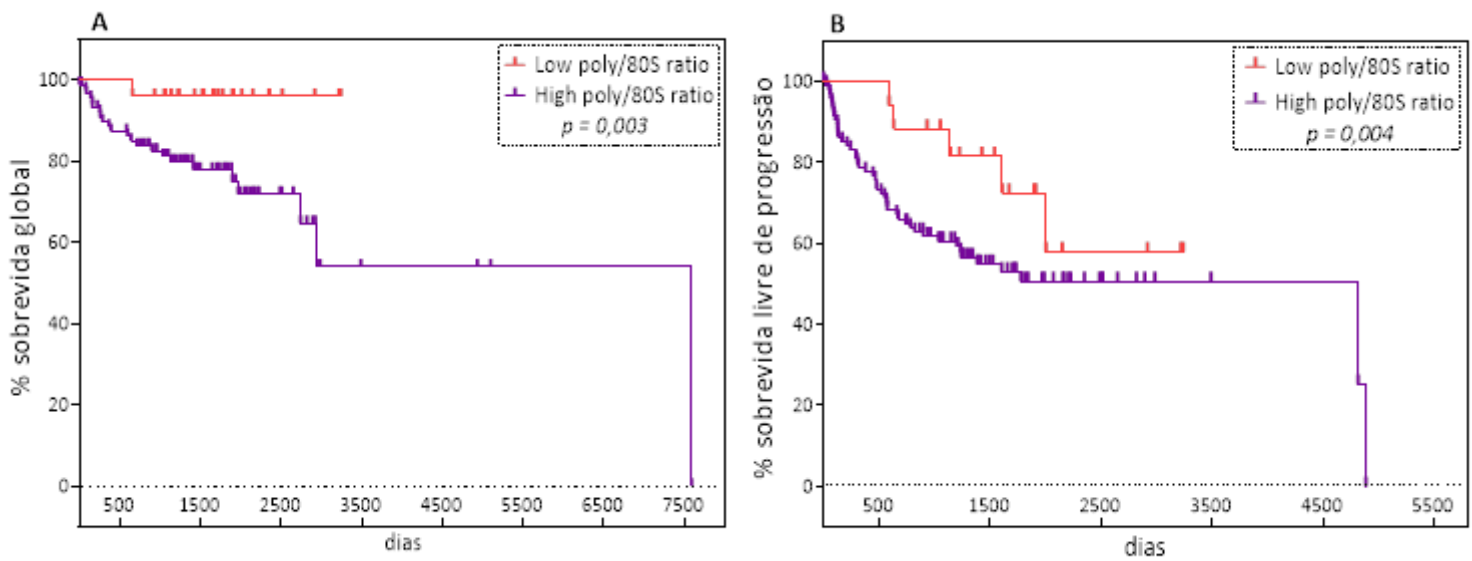
\*Qui-quadrado de Pearson

Foi possível observar uma associação entre o estadiamento clínico baixo com taxas de tradução mais baixas e estadiamentos clínicos mais altos com taxas de tradução mais altas. Além disso, nos grupos separados apenas em duas categorias foi possível visualizar que não apenas existe esta diferença entre os grupos, como também dentro de cada grupo o número

de pacientes com taxas altas de tradução global no grupo com estadiamento clínico baixo foi menor, enquanto o número de pacientes com baixas taxas de tradução foram ainda menores em comparação com os pacientes com altas taxas de tradução dentro do grupo de pacientes com estadiamento clínico mais avançado. O mesmo foi observado quando comparados os grupos com tumores confinados ao rim (denominado baixo) e com tumores que se expandem para outras estruturas renais (denominado alto).

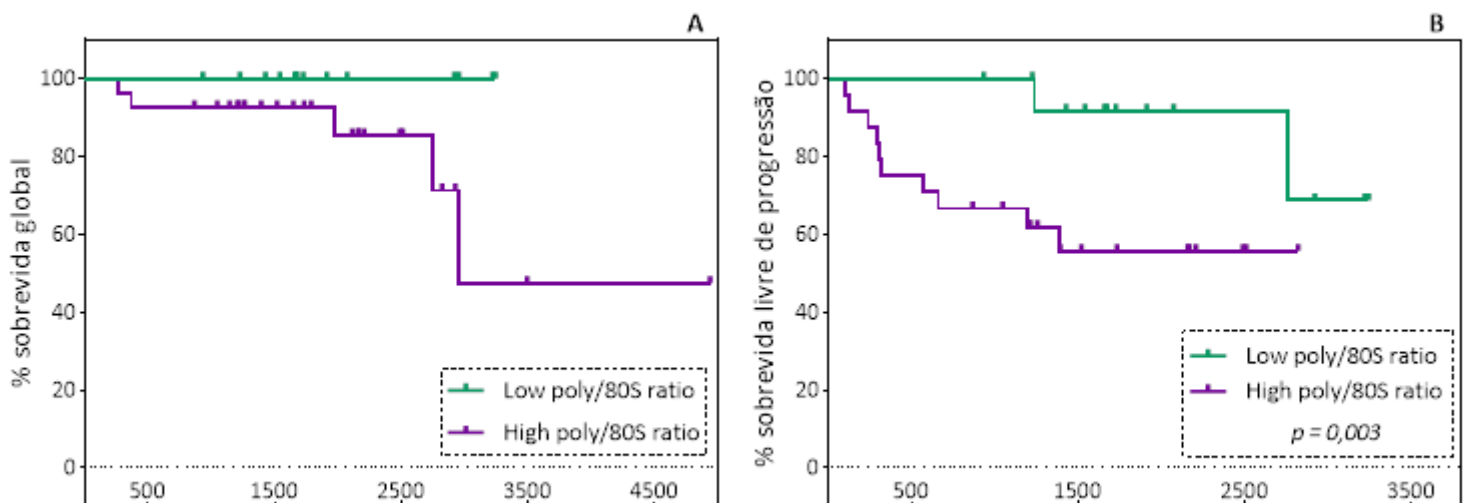
### *5.2.3 Correlação da taxa global de tradução e sobrevida de pacientes com CRCC*

Pacientes com altas taxas traducionais apresentaram uma pior sobrevida global (**Figura 45A**) e livre de progressão (**Figura 45B**). Essa diferença na sobrevida livre de progressão também foi observada quando separamos apenas os pacientes com baixo estadiamento clínico no momento do primeiro diagnóstico, indicando que o controle traducional pode ter importância na progressão do CRCC (**Figura 46A**). Apesar disso, a sobrevida global dos pacientes com baixo estadiamento clínico não mostrou diferença estatística significativa entre baixas e altas taxas de tradução (**Figura 46B**). As diferenças na sobrevida nos pacientes com CRCC podem indicar que processos relacionados a progressão tumoral são regulados por mecanismos globais de tradução e necessitam de maior investigação para determinar assinaturas presentes no mRNA polissomal que possam prever os desfechos clínicos. As análises de sequenciamento desses pacientes serão realizadas posteriormente e não foram incluídas nesta tese. Entretanto, podemos observar que mesmo em pacientes com estadiamentos mais baixos existe uma correlação entre as altas taxas de tradução global e a recidiva da doença, indicando que processos relacionados a migração celular e invasão podem estar sendo regulados via tradução. As futuras análises também irão determinar as assinaturas presentes de acordo com o estadiamento tumoral afim de comparar perfis diferencialmente expressos em pacientes com altos e baixos graus clínicos da doença e que estejam envolvidos na progressão, auxiliando na busca de biomarcadores confiáveis regulados pela tradução de mRNAs em pacientes com CRCC.



**Figura 45. Impacto da tradução na sobrevida global e sobrevida livre de progressão dos pacientes com CRCC.**

(A) Porcentagem de sobrevida global estratificada pela alta ou baixa taxa de tradução. (B) Porcentagem de sobrevida livre de progressão estratificada pela alta ou baixa taxa de tradução. As curvas foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-Rank.



**Figura 46. Impacto da tradução na sobrevida global e sobrevida livre de progressão dos pacientes com CRCC com baixo estadiamento clínico.**

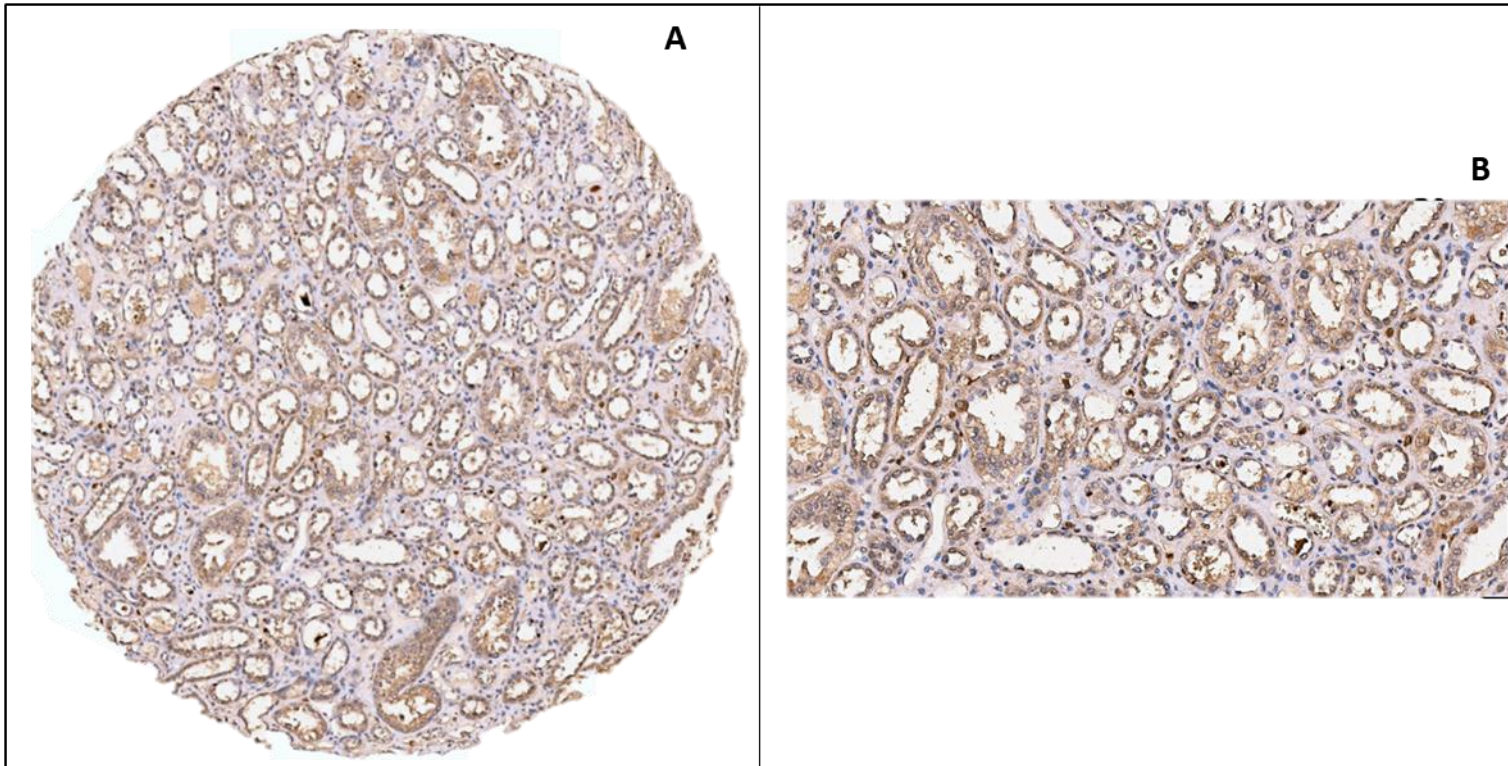
(A) Sobrevida global e (B) sobrevida livre de progressão dos pacientes de baixo estadiamento clínico (I e II) com baixas (low poly) ou altas (high poly) taxas traducionais. As curvas foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-Rank.

### 5.3 Expressão de HIF-2 $\alpha$ em tecidos tumorais de carcinoma renal de células claras

#### 5.3.1 *Expressão de HIF-2 $\alpha$ em tecidos tumorais e tecidos adjacentes não neoplásicos*

A mutação em VHL causa a estabilização de seus principais alvos, HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ . Como observado nos experimentos anteriores, VHL e HIF podem modular a tradução global e específica de vias que estão associadas com crescimento, migração e invasão tumoral. Diversos trabalhos tem sido realizados afim de entender o papel de ambas as proteínas HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  durante a progressão tumoral em pacientes com CRCC, porém os resultados ainda são controversos. Inibidores de HIF-2 $\alpha$  têm sido utilizados em ensaios clínicos tanto sozinho quanto em combinações com outros tratamentos da prática clínica (NCT04169711, NCT03634540, NCT04195750, NCT05119335, NCT02293980, NCT03108066, NCT04627064, NCT04846920). Em contraste com HIF-1 $\alpha$ , o papel de HIF-2 $\alpha$  parece ser mais relevante na progressão tumoral (62,67,71,159–161). Entretanto, alguns estudos avaliando a expressão da proteína em tecidos de pacientes com CRCC também sugerem um papel protetor de HIF-2 $\alpha$  superexpresso no núcleo (162,163). Determinar biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico e na escolha de terapias adequadas para cada paciente, é fundamental para entender a progressão do CRCC e melhorar a qualidade de vida de quem possui a doença metastática. Com técnicas de imuno-histoquímica, é possível acessar características do tumor de forma simples e rápida. A imuno-histoquímica em *tissue microarray* permite ampliar a quantidade de amostras analisada de uma só vez, sendo uma importante ferramenta para estudar grandes casuísticas.

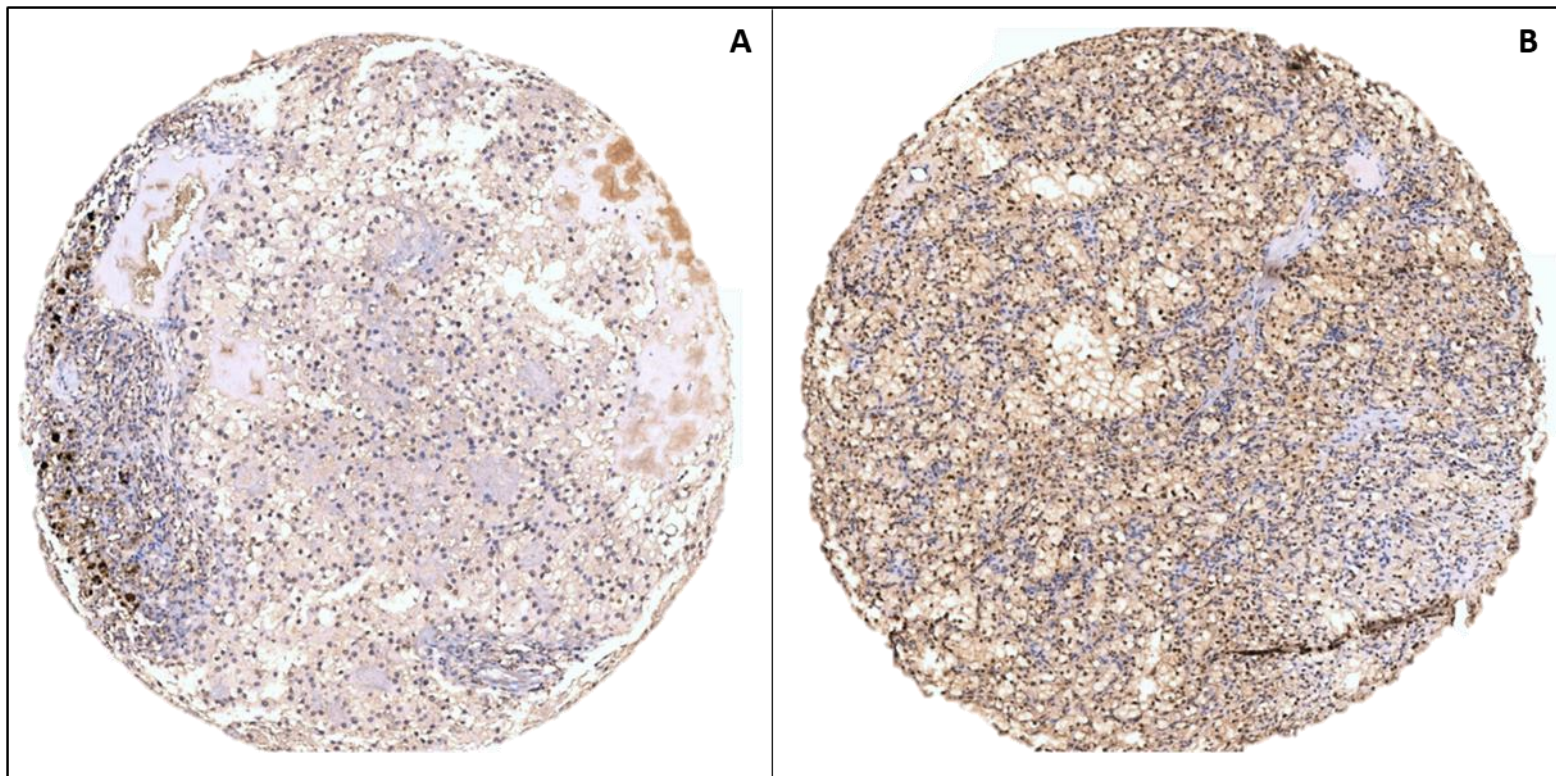
Em nossas análises, centenas de *spots* em duplicata de pacientes com CRCC foram marcados com HIF-2 $\alpha$  no TMA. As expressões foram quantificadas manualmente em conjunto com a patologista responsável, após padronização das reações nas lâminas controle tanto para o tecido tumoral quanto para o tecido normal renal não neoplásico. Cada *spot* contendo pelo menos 10% da amostra foi quantificado entre 0 a 100% de acordo com a porcentagem de marcação de HIF-2 $\alpha$  nuclear. Os tecidos renais normais não neoplásicos também foram quantificados para comparar a expressão média em comparação com o tecido tumoral (**Figura 47**).



**Figura 47. Expressão de HIF-2 $\alpha$  em tecido renal não neoplásico.**

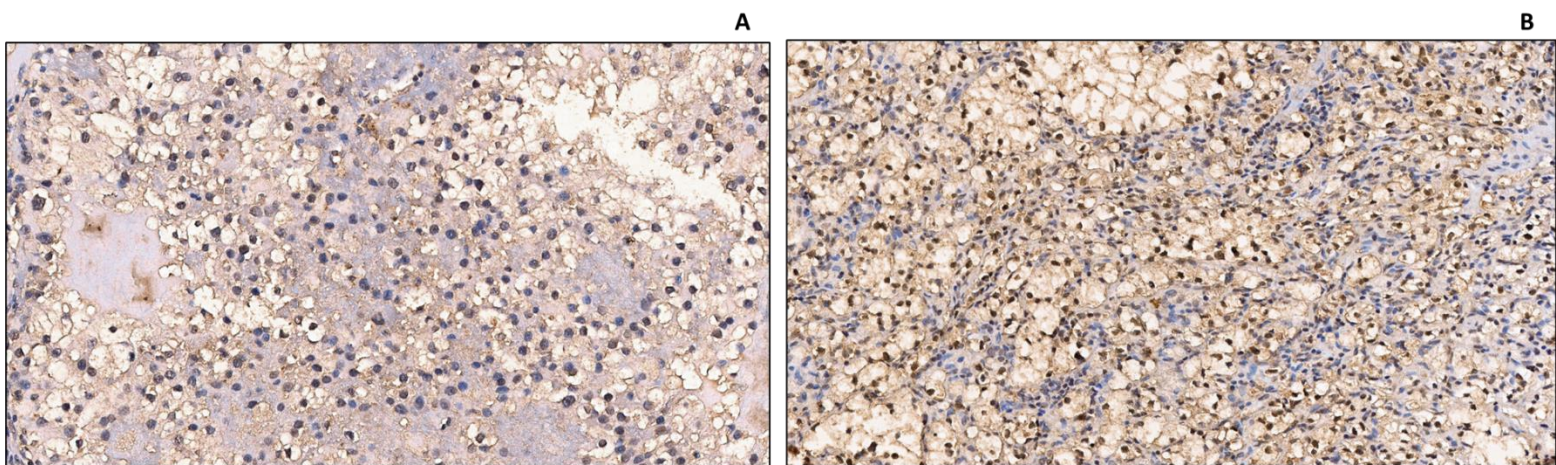
(A) Exemplo de *spot* de tecido renal após reação de IHQ em aumento de 7x. (B) Aumento de 20x.

Os tecidos neoplásicos apresentaram uma alta distribuição, com variação entre 0 e 100% de expressão (**Figura 48 e 49**). A quantificação nuclear da proteína HIF-2 $\alpha$  nos pacientes desta casuística mostraram inicialmente uma diferença na porcentagem de expressão entre os tecidos tumorais em comparação com os tecidos adjacentes não-neoplásicos (denominado 'normal' no gráfico abaixo). Enquanto tecidos com tumor apresentaram cerca de 50% de expressão em média, no tecido adjacente foi observado cerca de 10% da expressão desta proteína em média (**Figura 50**).



**Figura 48. Expressão de HIF-2 $\alpha$  em tecido tumoral de CRCC.**

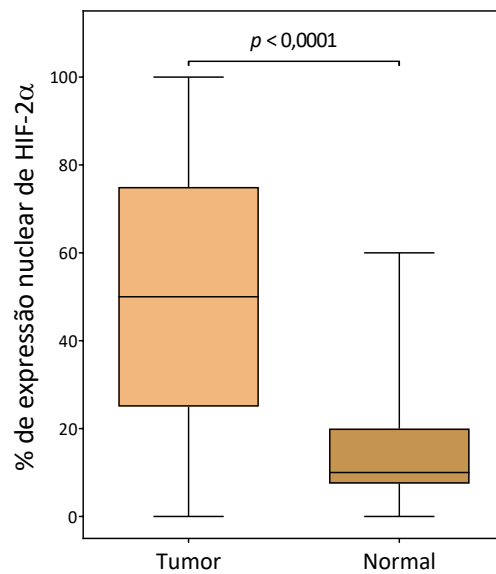
Exemplo de *spot* de tecido tumoral com (A) baixa e (B) alta expressão de HIF-2 $\alpha$  após reação de IHQ em aumento de 7x.



20x

**Figura 49. Expressão de HIF-2 $\alpha$  em tecido tumoral de CRCC em maior aumento.**

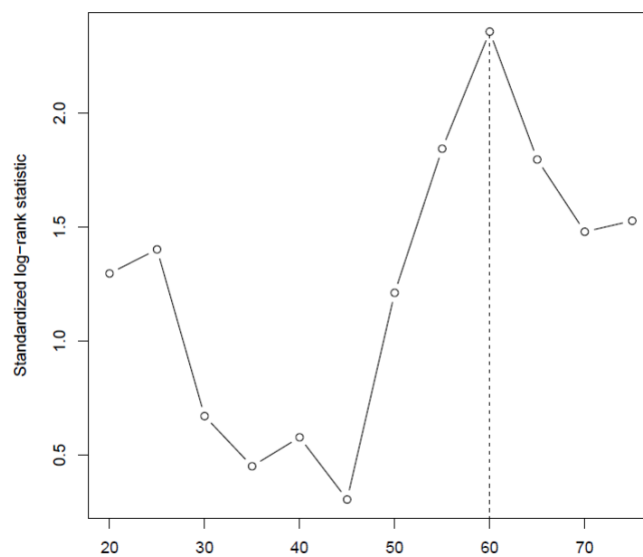
Exemplo de *spot* de tecido tumoral com (A) baixa e (B) alta expressão de HIF-2 $\alpha$  após reação de IHQ em aumento de 20x



**Figura 50. Expressão de HIF-2 $\alpha$  em tecidos tumorais de CRCC e não tumorais adjacentes.**

O gráfico de diagrama de caixa mostra a dispersão da expressão nuclear de HIF-2 $\alpha$  quantificada nos tecidos tumorais presentes no TMA dos pacientes com CRCC e seus respectivos tecidos adjacentes sem presença de tumor.

Para as próximas análises estatísticas foi determinado um ponto de corte de 60% a partir da maximização do ponto de corte pela estatística de Log-Rank (164). Foram considerados os valores entre 20% e 75% para determinar a baixa e alta expressão de HIF-2 $\alpha$  nos pacientes com CRCC de acordo com a sobrevida (**Figura 51**).



**Figura 51. Determinação do ponto de corte para sobrevida livre de progressão entre baixa e alta expressão de HIF-2 $\alpha$  nos pacientes da casuística.**

Os dados imputados para determinação do ponto de corte dentro da casuística compreendem os pacientes com expressão nuclear de HIF-2 $\alpha$  entre 20% e 75% e suas informações relacionadas a sobrevida.

### 5.3.2 Associação entre a expressão de HIF-2 $\alpha$ e características epidemiológicas, clínicas e anatomopatológicas entre os pacientes com CRCC

Após determinar o melhor ponto de corte para as análises, os resultados foram validados no teste de associação com as variáveis epidemiológicas (idade, sexo, histórico de câncer na família, diagnóstico de outra neoplasia e metástase sincrônica no primeiro diagnóstico) dos pacientes, porém não foram observadas diferenças significativas entre os grupos com alta ou baixa expressão de HIF-2 $\alpha$  (**Tabela 6**).

**Tabela 6. Associação entre características epidemiológicas e a expressão nuclear de HIF-2 $\alpha$  em pacientes com CRCC.**

Variável	Categoria	HIF-2 $\alpha$ (n)		p-valor
		≤60	>60	
Idade	≤ 40	47	31	0,665
	41 a 64	229	154	
	≥ 65	81	45	
Sexo	Masculino	225	142	0,721
	Feminino	131	88	
Histórico familiar de câncer	Não	72	44	0,369
	Sim	141	106	
Outra neoplasia	Não	182	130	0,943
	Sim	80	58	
Metástase sincrônica	Não	323	216	0,607
	Sim	25	14	

Já quando analisadas as variáveis que estão associadas ao estadiamento tumoral dos pacientes, observamos associação entre todas as variáveis com exceção do comprometimento de linfonodos. As variáveis de estadiamento clínico, estadiamento patológico e grau ISUP mostraram associação com as baixas ou altas taxas de expressão de HIF-2 $\alpha$  encontradas nas amostras dos pacientes com CRCC (**Tabela 7**).



**Tabela 7. Associação entre variáveis de estadiamento e a expressão nuclear de HIF-2 $\alpha$  em pacientes com CRCC.**

Variável	Categoria	HIF-2 $\alpha$ (n)		p-valor
		≤60	>60	
Estadiamento Clínico	I	212	177	<b>&lt; 0,001</b>
	II	35	9	
	III	74	27	
	IV	28	15	
Estadiamento Clínico	Baixo	247	186	<b>0,02</b>
	Alto	110	44	
ISUP	1	1	6	<b>0,005</b>
	2	67	92	
	3	70	49	
	4	24	16	
ISUP	1 e 2	68	98	<b>0,001</b>
	3 e 4	94	65	
Estadiamento patológico – T	T1a	125	134	<b>&lt; 0,001</b>
	T1b	95	49	
	T2a	33	8	
	T2b	7	3	
	T3a	78	31	
	T3b	11	4	
	T3c	1	1	
	T4	6		
Estadiamento patológico – T	T1	220	183	<b>&lt; 0,001</b>
	T2	40	11	
	T3	90	36	
	T4	6		
Estadiamento patológico – T	T1 e T2	260	194	<b>0,002</b>
	T3 e T4	96	36	
Comprometimento linfonodal	Nx/N0	344	224	0,633
	N1	10	5	

Dentre as características anatomopatológicas, a expressão de HIF-2 $\alpha$  mostrou associação com a presença de necrose e invasão vascular sanguínea onde é possível observar que mais pacientes com expressão menor ou igual a 60% apresentaram essas características em comparação com os pacientes com expressão maior que 60% (**Tabela 8**).

**Tabela 8. Associação entre características anatomopatológicas e a expressão nuclear de HIF-2  $\alpha$  em pacientes com CRCC.**

Variável	Categoria	HIF-2 $\alpha$ (n)		p-valor
		$\leq 60$	$> 60$	
Componente sarcomatoide	Não	303	173	0,618
	Sim	8	6	
Invasão perineural	Não	304	214	0,122
	Sim	9	2	
Invasão vascular linfática	Não	315	219	0,325
	Sim	14	6	
Invasão vascular sanguínea	Não	295	210	<b>0,04</b>
	Sim	40	15	
Necrose	Não	69	102	<b>0,001</b>
	Sim	92	66	

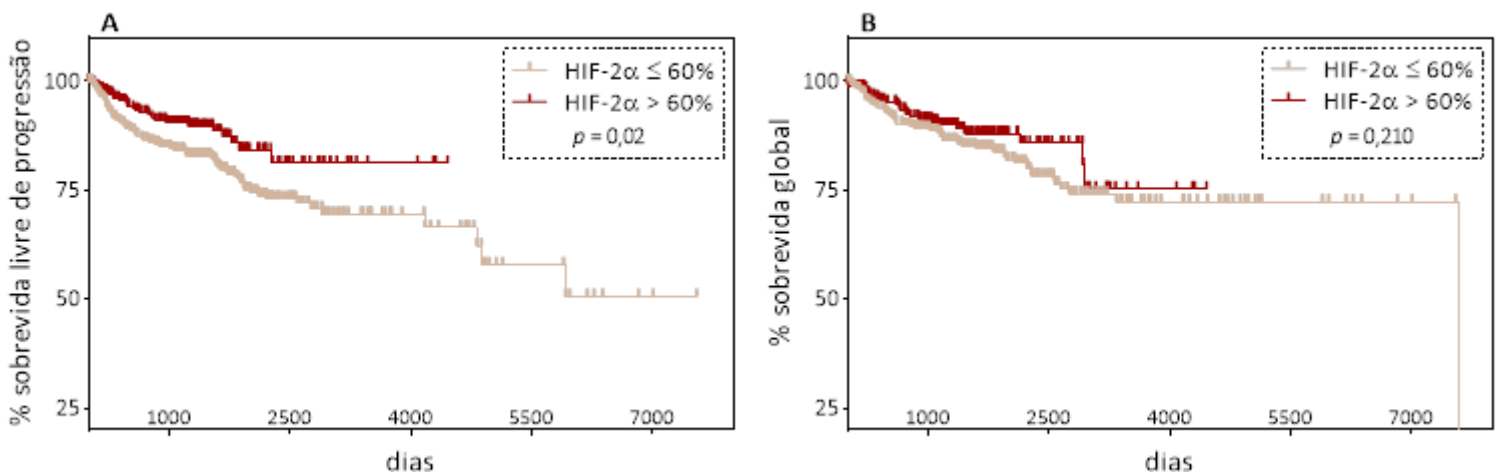
Os desfechos clínicos dos pacientes avaliados até final do estudo também apresentaram associação com a expressão de HIF-2 $\alpha$ . Tanto a recorrência da doença quanto a sobrevida dos pacientes foram associadas a amostras com menor expressão da proteína. Além disso, pacientes com menor expressão de HIF-2 $\alpha$  também foram associados ao tratamento com radioterapia (**Tabela 9**).

**Tabela 9. Associação entre os desfechos e a expressão nuclear de HIF-2  $\alpha$  em pacientes com CRCC.**

Variável	Categoria	HIF-2 $\alpha$ (n)		p-valor
		$\leq 60$	$> 60$	
Status do último seguimento	Vivo sem doença	246	190	<b>0,005</b>
	Vivo com doença	46	13	
	Morte por câncer	47	19	
	Morte não câncer	16	6	
	Vivo status desconhecido	1	2	
	Morte status desconhecido	1		
Status do último seguimento	Vivo	293	205	<b>0,02</b>
	Óbito	64	25	
Recidiva	Não	253	196	<b>&lt; 0,001</b>
	Sim	63	16	
Radioterapia	Não	323	219	<b>0,035</b>
	Sim	34	11	
Terapia Alvo	Não	345	226	0,239
	Sim	12	4	

### 5.3.3 Análises de sobrevida e risco de recidiva em pacientes com CRCC

As análises de sobrevida foram realizadas para todas as variáveis da casuística que tenham papel na progressão tumoral e também para a nossa variável de interesse, a expressão de HIF-2 $\alpha$ . As curvas mostram que os pacientes com expressão nuclear alta da proteína têm uma melhor sobrevida livre de progressão quando comparados com os pacientes com expressão nuclear mais baixa (**Figura 52A**). Apesar disso, não observamos diferenças significativas na comparação entre as curvas de sobrevida global (**Figura 52B**). Para as análises univariadas e multivariadas, foram incluídos no modelo apenas os dados de sobrevida livre de progressão, uma vez que não houve diferença na sobrevida global dos pacientes.



**Figura 52. Impacto da expressão nuclear de HIF-2 $\alpha$  na sobrevida de pacientes com CRCC.**

(A) Porcentagem de sobrevida livre de progressão estratificada pela alta ou baixa expressão nuclear de HIF-2 $\alpha$ . (B) Porcentagem de sobrevida global estratificada pela alta ou baixa expressão nuclear de HIF-2 $\alpha$ . As curvas foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-Rank.

As análises de sobrevida livre de progressão univariadas mostraram diferenças significativas para as variáveis idade, estadiamento clínico, estadiamento patológico, grau ISUP, comprometimento de linfonodos, invasão perineural, invasão vascular sanguínea e presença de necrose (**Tabela 10**). Para essas análises foram excluídos os pacientes que apresentaram metástase sincrônica no primeiro diagnóstico.

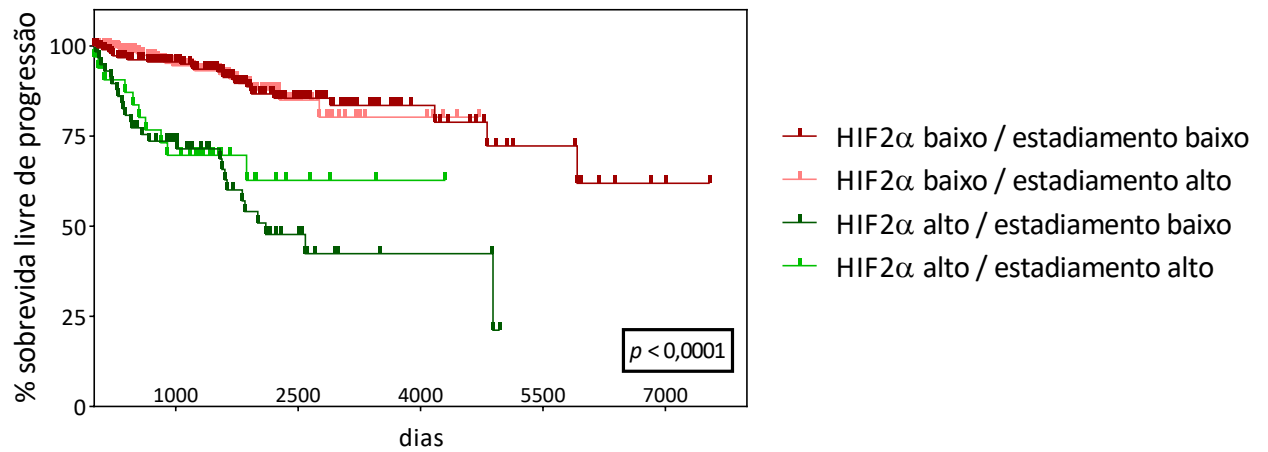
Tabela 10. Risco de recidiva em pacientes com CRCC.

Variável	Categoria	RR	IC 95%	p-valor
Idade	≤ 40	1	ref	
	41 a 64	2,36	1,02 – 5,46	<b>0,044</b>
	≥ 65	3,85	1,59 – 9,32	<b>0,003</b>
Sexo	Masculino	1	ref	
	Feminino	0,89	0,59 – 1,34	0,580
Estadiamento Clínico	Baixo	1	ref	
	Alto	4,82	3,22 – 7,20	<b>&lt; 0,001</b>
ISUP Baixo/Alto	1 e 2	1	ref	
	3 e 4	3,99	2,15 – 7,38	<b>&lt; 0,001</b>
Estadiamento patológico	Baixo	1	ref	
	Alto	5,46	3,65 – 8,17	<b>&lt; 0,001</b>
Comprometimento linfonodal	Nx/N0	1	ref	
	N1	11,72	4,71 – 29,0	<b>&lt; 0,001</b>
Componente sarcomatoide	Não	1	ref	
	Sim	3,92	1,43 – 10,78	<b>0,008</b>
Invasão perineural	Não	1	ref	
	Sim	7,8	2,79 – 21,81	<b>&lt; 0,001</b>
Invasão vascular linfática	Não	1	ref	
	Sim	2,49	0,97 – 6,39	0,058
Invasão vascular sanguínea	Não	1	ref	
	Sim	4,79	2,85 – 8,05	<b>&lt; 0,001</b>
Necrose	Não	1	ref	
	Sim	4,45	2,42 – 8,18	<b>&lt; 0,001</b>
Histórico familiar de câncer	Não	1	ref	
	Sim	0,78	0,48 – 1,26	0,318
Outra neoplasia	Não	1	ref	
	Sim	0,86	0,55 – 1,36	0,541
HIF-2 $\alpha$	Baixo	2,0	1,14 – 3,48	<b>0,014</b>
	Alto	1	ref	

As comparações entre grupos que apresentaram diferenças significativas na sobrevida livre de progressão foram incluídas na análise multivariada, onde foi possível observar que pacientes com expressão nuclear de HIF-2 $\alpha$  abaixo de 60% apresentam um risco três vezes maior de ter uma recorrência da doença em relação ao grupo com expressão alta da proteína (**Tabela 11**). Entretanto, a correlação entre HIF-2 $\alpha$  e estadiamento clínico parece ser uma ferramenta melhor para prever o risco de recidiva em um paciente. Apenas a expressão de HIF-2 $\alpha$ , sem considerar o grau tumoral, não explica totalmente os efeitos da proteína na sobrevida livre de progressão. HIF-2 $\alpha$  está aumentado em tumores em comparação com o tecido adjacente ao tumor. Pacientes com estadiamentos baixos apresentam melhores taxas de sobrevida quando a expressão de HIF-2 $\alpha$  é mais baixa e pacientes com estadiamentos mais avançados tem sobrevida pior quando a expressão de HIF-2 $\alpha$  é alta. Entretanto, em pacientes com a doença localizada, a alta expressão de HIF-2 $\alpha$  diminui consideravelmente a sobrevida livre de progressão (**Figura 53**). Em conjunto, nossos resultados mostraram que a alta expressão nuclear de HIF-2 $\alpha$  pode ser um marcador dependente do estadiamento clínico para o risco de recidiva em pacientes com CRCC. Dessa forma é possível a estratificação de casos que apresentem mais ou menos chances de progredir com a doença, auxiliando no acompanhamento clínico do paciente.

**Tabela 11. Risco de recidiva em pacientes com CRCC incluindo a expressão de HIF-2 $\alpha$ .**

Variável	Categoria	Multivariada		
		RR	IC 95 %	p-valor
Estadiamento	Baixo	1	ref	
	Alto	3,207	1,43 – 7,18	<b>,005</b>
ISUP Baixo/Alto	Baixo	1	ref	
	Alto	1,286	0,50 – 3,25	,596
Necrose	Não	1	ref	
	Sim	1,620	0,64 – 4,05	,302
HIF2 $\alpha$	Baixo	3,082	1,21 – 7,83	<b>,018</b>
	Alto	1	ref	



**Figura 53. Sobrevida livre de progressão estratificada pelo estadiamento tumoral e expressão nuclear de HIF2 $\alpha$  dos pacientes com CRCC.**

Porcentagem de sobrevida livre de progressão estratificada pela alta ou baixa expressão nuclear de HIF-2 $\alpha$  e pelo estadiamento alto ou baixo dos pacientes. As curvas foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-Rank.

## 6. DISCUSSÃO

A alta heterogeneidade do CRCC dificulta o mapeamento molecular do tumor como um todo. Tumores são capazes de se desenvolver em um ambiente desfavorável. Clones bem adaptados a esse ambiente garantem o avanço da doença e o surgimento de metástases. O que se sabe atualmente sobre as alterações moleculares, apesar do avanço, ainda é insuficiente para a melhora dos tratamentos disponíveis. Pacientes com tumores de estadiamentos baixos apresentam uma alta taxa de cura após a retirada do tumor, porém, pacientes com a doença avançada ou que tiveram recidiva ainda carecem de melhores abordagens para auxiliar no acompanhamento médico e tratamento. Além disso, a falta de exames preventivos e as características da doença por si só, como a falta de sintomas durante as fases iniciais, dificultam ainda mais o tratamento.

Um dos aspectos moleculares do CRCC é o silenciamento do gene *VHL*, o principal regulador da resposta celular induzida por hipóxia, que promove a liberação de fatores essenciais para a sobrevivência da célula em situações de estresse (165). O ambiente hipóxico dificulta a resposta dos pacientes aos quimioterápicos, sendo mais um obstáculo no tratamento do CRCC (28). O avanço no tratamento do CRCC aconteceu após o início da imunoterapia e das terapias-alvo. A terapia direcionada para o ambiente em hipóxia aumentou consideravelmente a sobrevida de pacientes recidivados ou metastáticos (91,166). Sequenciamentos em larga escala ampliaram o conhecimento das alterações no CRCC, porém ainda faltam biomarcadores que possam prever a resposta ao tratamento e progressão da doença. A descoberta de alterações na via de mTOR, o principal regulador do início da tradução de mRNAs, iniciou o tratamento com o uso de inibidores desta via que é responsável pela manutenção de processos de crescimento e sobrevivência celular. Atualmente, inibidores de angiogênese e inibidores de mTOR são utilizados como primeira linha e segunda linha de tratamento para CRCC, respectivamente (47,48,138).

A perda do cromossomo 3p – que pode ocorrer décadas antes do surgimento do tumor primário – é um evento crucial para mutações em *VHL* e outros supressores tumorais. Sendo a principal causa em tumores renais e o regulador da principal via de ativação em resposta a hipóxia, entender a cascata de acontecimentos após a perda de *VHL* é crucial para o estudo das alterações moleculares que favorecem o CRCC (48,167). Mutações em *VHL* foram detectadas primeiramente em pacientes com a síndrome de *VHL* hereditária, doença

caracterizada pelo desenvolvimento de diversos tumores como CRCC, hemangioblastomas e feocromocitoma (tumor na glândula suprarrenal que causa aumento da produção de catecolaminas) (165). Os tumores encontrados em pacientes com a síndrome de VHL são altamente vascularizados e expressam diversos genes regulados por hipóxia. Baixos níveis de O<sub>2</sub> desencadeiam mecanismos a nível celular, tecidual e sistêmico para minimizar os efeitos. Os processos que dependem de muita energia, como a tradução de proteínas, são rapidamente suprimidos, e processos como a glicólise são impulsionados para compensar a queda dos níveis de ATP. A estabilização de HIF ocorre rapidamente após detectados baixos níveis de oxigênio, que é translocado para o núcleo onde inicia a transcrição de diversos genes necessários para a adaptação da célula. A relação entre VHL e HIF rendeu o Nobel de Fisiologia e Medicina em 2019 após descobrimento da adaptação celular a viabilidade de oxigênio. A proteína VHL (pVHL) forma um complexo capaz de marcar HIF para a degradação via proteassoma (58,168), mantendo a homeostase em níveis normais de oxigênio.

HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  trabalham em cooperação com outros fatores de transcrição (como Smad3, HFN4, ATF1/CREB1, AP1 e Ets-1) e regulam a expressão de genes envolvidos em processos celulares que ocorrem em diferentes compartimentos de maneira célula-dependente, como fatores de transcrição nucleares, proteínas de membrana, proteínas citoplasmáticas e fatores de crescimento (169). Para compensar a falta de ATP, HIF ativa genes como GLUT-1, GLUT-3, PFK-1, PGK-1 e LDH-A, aumentando a glicólise e o transporte de glicose para dentro das células (170); VEGF, TGF- $\beta$ 3, bFGF e PDGF- $\beta$ , fatores envolvidos na formação de vasos sanguíneos; além de outros genes envolvidos na proliferação e sobrevivência celular, apoptose, estrutura de citoesqueleto e mobilidade, metabolismo da matriz extracelular, metabolismo de nucleotídeos, adipogênese e desenvolvimento de células B. HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  possuem alvos diferentes, além do último ter sua expressão mais restrita ao tipo de tecido. A expressão de VEGF e GLUT-1, por exemplo, apesar de ser regulada por ambos HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ , em CRCC é predominantemente regulada por HIF-2 $\alpha$  (171). Ao contrário do que ocorre com o aumento de HIF-1 $\alpha$ , a superexpressão de HIF-2 $\alpha$  promove o crescimento das células no CRCC (172).

A perda de VHL causa um acúmulo das subunidades HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ , que apresentam funções distintas nos tumores renais e induzem seletivamente a transcrição de seus genes alvo (161). Nossos resultados mostraram que o aumento da expressão de HIF-2 $\alpha$  nuclear em CRCC é cerca de cinco vezes maior no tumor em comparação com o tecido adjacente. Além



disso, o aumento na expressão pode reduzir drasticamente a sobrevivência de pacientes com tumores de estadiamentos baixos. O papel de HIF-2 $\alpha$  pode depender da localização celular, uma vez que age como um fator de transcrição e de tradução, e influencia no perfil de expressão das células tumorais (156). A expressão de HIF-2 $\alpha$  aumenta a expressão de proteínas envolvidas na proliferação celular e angiogênese. Também pode levar a um fenótipo mais oxidativo, favorecendo um perfil tumoral mais agressivo e com maiores chances de resistência aos tratamentos (71). Deleções de HIF-1 $\alpha$  já foram encontradas em linhagens celulares que produzem apenas HIF-2 $\alpha$ , sugerindo um papel maior na carcinogênese de CRCC. HIF regula VEGF, uma proteína envolvida na angiogênese e frequentemente encontrada em CRCC. Tratamentos que inibem VEGF, como o sunitinibe, foram extremamente benéficos para pacientes com a doença avançada. Entretanto, a inibição de alvos de HIF pode gerar mecanismos compensatórios que levam a resistência ao tratamento. IL-8, por exemplo, é uma citocina regulada por HIF que promove angiogênese e pode participar de processos de resistência em pacientes que fizeram uso de VEGF. HIF-1 $\alpha$  inibe IL-8 enquanto HIF-2 $\alpha$  ativa. Tumores que apresentam níveis altos apenas de HIF-2 $\alpha$  podem apresentar maior resistência aos tratamentos com antiangiogênicos (173,174). Após a descoberta do eixo VHL-HIF, aumentou o interesse no benefício terapêutico após a inibição de HIF-2 $\alpha$  (72). O tratamento com inibidores de HIF-2 $\alpha$  mostraram segurança e eficácia no uso e outros estudos estão sendo realizados com a combinação de tratamentos com TKI, inibidores de checkpoint imune e outros tratamentos com antiangiogênicos. Entender os mecanismos de resistência que podem surgir durante o tratamento com os inibidores de HIF-2 $\alpha$  é essencial para a seleção de pacientes candidatos a esse tipo de terapia bem como o sucesso do tratamento. Para ajudar na conclusão deste resultado, o status da proteína HIF-1 $\alpha$  necessita ser posteriormente avaliado nos pacientes, já que tumores que apresentam down-regulação de HIF-1 $\alpha$  e superexpressão de HIF-2 $\alpha$  podem ter um crescimento celular maior (161,173). A expressão de HIF-1 $\alpha$  pode ser regulada nas células deficientes em VHL via tradução (175) e foi encontrada apenas no mRNA polissomal em nosso modelo.

Para entender como VHL afeta a expressão gênica, utilizamos modelos celulares de CRCC. Como os estudos do transcriptoma envolvem toda a população de mRNAs presentes na célula, neste trabalho adotamos metodologias para estudar apenas a população de mRNAs que estão sendo ativamente traduzidos. Para observar as mudanças no transloma dependente da presença ou ausência de VHL, utilizamos as linhagens RCC4 com ou sem a

expressão do gene. Nosso modelo de estudo consiste no carecimento *overnight* de soro das células seguido pela estimulação com soro fetal bovino por 2h e 16h para observar alterações agudas e crônicas associadas ao status de VHL. Para separar os mRNAs ativamente traduzidos utilizamos a técnica do perfil polissomal, onde é possível sedimentar os ribossomos ligados a moléculas de mRNA em um gradiente de sacarose, de acordo com sua densidade. Essa técnica permite coletar as frações mais pesadas, onde mais ribossomos estão ligados ao mesmo tempo a um mRNA, indicando tradução ativa (176). Em paralelo, o mRNA total também é coletado para comparação com os genes traduzidos. Para determinar a assinatura de genes, o sequenciamento do mRNA total e polissomal das mesmas amostras foram analisados utilizando o algoritmo *anota2seq*, onde é possível avaliar diferentes modos de regulação gênica: *buffering* (alterações no mRNA total que não são encontradas no mRNA polissomal), *abundance* (alterações concomitantes no mRNA total e mRNA polissomal) e *translation* (alterações no mRNA polissomal que não são encontradas no mRNA total) (134). Nossas análises mostraram um aumento da regulação via *translation* após 16h, em comparação com o estímulo agudo de 2h, onde os transcritos foram encontrados principalmente regulados via *abundance*. Esse resultado sugere que as alterações na transcrição que ocorrem após 2h de estímulo com SFB são moduladas pela tradução após o tratamento com 16h. Para determinar se a expressão gênica nas células deficientes ou proficientes em VHL é modulada via mTORC1, tratamos as células com rapamicina na presença de SFB. As células RCC4/VHL apresentaram alterações via *translation* e via *buffering* após o tratamento agudo. Já as células deficientes em VHL apresentaram um conjunto limitado de transcritos regulados apenas via *translation*, sugerindo que a resposta a rapamicina difere dependendo do status de VHL.

pVHL interage com outras proteínas como ZHX2 (*Zinc fingers and homeoboxes 2*), SFMBT1 (*Scm-like with four malignant brain tumor domain*), e a proteína adaptadora TBK1 (*TANK binding kinase 1*). Assim como acontece com HIF $\alpha$ , pVHL marca ambos ZHX2 e SFMBT1 para degradação via proteassoma e TBK1 é inativado após desfosforilação por pVHL (177–179). Em nossos resultados, observamos uma down-regulação de ZHX2 (sugerindo outros mecanismos de controle da expressão independente de VHL) e up-regulação de TBK1 nas células deficientes em VHL via tradução. ZHX2 regula a expressão de *IL6*, *IL8*, *CCL2*, e outros genes relacionados a invasão, metástase, metabolismo e apoptose (180). Nas células deficientes em VHL, ocorreu um aumento da resposta imune inata, dependente dos mecanismos de tradução, com a expressão de genes do sistema complemento e da cascata

de coagulação, como *SERPINA1*, que é responsivo após liberação de citocinas inflamatórias e favorece o desenvolvimento tumoral (181). *TBK1* é uma quinase serina-treonina que regula processos celulares como inflamação, autofagia, ciclo e morte celular, e com potencial uso em tratamento de câncer (182). A interação de *TBK1* com genes *STING* (*Stimulator of interferon genes*) induz a resposta de IFN tipo I (178), que está down-regulada nas células deficientes em VHL. As funções de pVHL além de HIF mostram como a complexa tumorigênese do CRCC ainda precisa ser elucidada de forma interdisciplinar para melhor entendimento do processo de resposta a hipóxia e do CRCC. Além disso, as vias afetadas pelo eixo VHL-HIF são complexas e regulam centenas de genes (170,183).

Para entender como as alterações na expressão de genes associadas a VHL podem impactar nos fenótipos nas células, analisamos os processos enriquecidos entre os diferentes modos de expressão a partir das funções celulares definidas pelo *Gene Ontology*. Após essa etapa, analisamos mecanismos comuns entre os genes expressos utilizando a visualização baseada em redes (NTA). HIF interage com proteínas modificadoras de cromatina (184). A montagem de cromatina foi um dos processos enriquecidos no mRNA polissomal das células deficientes em VHL (genes *ASF1B*, *MCM2*, *CENPA*, *CENPM*, *H2AFX* e *HIST1H3A*). Essa assinatura quando expressa em pacientes com CRCC pode indicar uma pior sobrevida global e também apresenta uma tendência a pior sobrevida livre de progressão (**Apêndice 3**). A deleção de histonas H1 induz uma resposta por IFN (185), o que pode explicar a down-regulação dos genes envolvidos na via de IFN nas células deficientes em VHL. Genes como *ISG15* e *IFIT1* encontram-se down-regulados em células deficientes em VHL e podem ser silenciados após aumento da expressão de histonas H1, incluindo a histona H1.3 (186). O grupo de proteínas que pertencem a família CENP também pode indicar pior prognóstico em pacientes com câncer de mama, câncer de ovário, adenocarcinoma de pulmão e CRCC (187–190) e modula a transição epitélio-mesenquimal em câncer colorretal, favorecendo a invasão celular e metástase (191). *NASP* (*Nuclear Autoantigenic Sperm Protein*) é um gene envolvido na montagem de cromatina e afeta a replicação de DNA, o ciclo e a proliferação celular, e está up-regulado via tradução nas células deficientes em VHL. O silenciamento de *NASP* é capaz de prevenir a formação de tumores *in vivo* diminuindo a acessibilidade da cromatina e afetando a transcrição de genes que promovem a transição da fase G1/S do ciclo celular (192,193). Em CRCC a expressão de *NASP* está associada ao aumento de *CDCA7* (*Cell Division Cycle Associated 7*), um alvo de c-Myc e que regula o ciclo celular (194).

As células deficientes em VHL apresentaram um crescimento mais lento nas primeiras 48h de estímulo com SFB. Vale ressaltar que o ciclo celular nessas células está alterado no mRNA polissomal após 16h de tratamento com soro, o que pode influenciar no crescimento tardio desta célula. O ciclo celular foi a via mais afetada nas células RCC4/Mock (genes *HSP90AA1*, *MCM3*, *MCM2*, *MCM5*, *H2AFX*, *EZH2* e *CENPA*). Afim de estabelecer os genes regulados pelo controle da tradução e suas funções, foram selecionados os genes up- ou down-regulados apenas no mRNA polissomal das células. Em comparação com as células RCC4/VHL, encontramos o gene *MCM3* sendo principalmente afetado via tradução nas células deficientes em VHL. As proteínas MCM 2-7 apresentam um papel em carcinoma renal, tendo sua expressão elevada em comparação com tecidos não neoplásicos adjacentes ao tumor (195). *PLK1* codifica uma quinase que fosforila e ativa *MCM3*, interferindo na proliferação e morte celular (196).

Para manter a homeostase durante a diminuição de oxigênio, outros fatores de transcrição e tradução são ativados, como a via e NF- $\kappa$ B, p53 e MYC, que apresentam papéis tanto antagonistas quanto cooperadores de HIF. Células com VHL mutado, apresentam níveis reduzidos de p53 e da *RNA-binding protein* HuR (*Human antigen R*). HuR, na presença de VHL, se associa ao mRNA de p53 no citoplasma da célula, aumentando sua tradução. Alterações nos níveis de *RNA-binding proteins* também podem interferir na taxa de tradução global e/ou específica (144,145). Nas células deficientes em VHL, o gene *FANCB*, associado ao reparo de DNA, é regulado via tradução. *FANCB* (*Falconi Amenia Complementation Group B*) faz parte de um complexo que responde a danos no DNA, mantendo a integridade genômica (197). A inativação somática e germinativa deste gene está associada ao surgimento de alguns tipos de câncer, como de cabeça e pescoço e leucemia (198,199), porém até o momento não existem trabalhos que associam sua inativação ou down-regulação em tumores renais. Outros genes de reparo de DNA estão presentes em pacientes com CRCC e podem indicar uma pior sobrevida (200), porém, neste trabalho, foram encontrados genes que dependem especialmente da regulação traducional na presença de VHL. Além disso, em hipóxia, genes de reparo de DNA são principalmente down-regulados na presença de HIF-2 $\alpha$  (201,202).

Nas células deficientes em VHL, a tradução regula genes envolvidos na ativação da via de NF- $\kappa$ B. A via de sinalização de NF- $\kappa$ B está envolvida no desenvolvimento e progressão de câncer controlando a expressão de genes como *TNFA*, *IL6*, *BCLXL*, *BCL2*, *BCLXS*, *XIAP*, e *VEGF*, e promovendo proliferação celular, sobrevivência e angiogênese. NF- $\kappa$ B é um fator de

transcrição que promove a ativação da resposta imune inata e, em tumores associados a inflamação, pode induzir a secreção de diversas citocinas e quimiocinas pela ligação aos promotores desses genes. Genes pró-inflamatórios estão alterados em diversos tumores, como *IL6*, *IL1* e *CCL2*, que cooperam com a invasão, angiogênese e polarização de macrófagos. Em CRCC, alvos de NF- $\kappa$ B estão up-regulados, indicando atividade desta via. A perda de VHL já foi anteriormente associada com a desregulação das respostas inflamatórias pela via de NF- $\kappa$ B e via de IFN (203). Entretanto, o papel de NF- $\kappa$ B em tumores renais pode ser mais complexo e estar além da up-regulação da via. Nossos resultados mostraram que a via está up-regulada no início do tratamento, porém esse efeito não permanece após a exposição prolongada das células ao estímulo com soro fetal bovino. A combinação clássica da ativação da via e down-regulação dos seus inibidores nem sempre está associada aos tumores de pacientes com CRCC. Neste tumor, também ocorre uma up-regulação de genes inibidores de NF- $\kappa$ B causando diminuição da atividade da via. Isso indica que as alterações nos genes que aumentam ou inibem a expressão de NF- $\kappa$ B podem desregular diferentes vias de sinalização e ter efeitos distintos dependendo da fase do processo de carcinogênese *in vivo* (204).

Ets-1 é um dos fatores de transcrição que cooperam com HIF na resposta a hipóxia. A super expressão de Ets-1 foi relatada em diversos tumores, incluindo CRCC, como um fator de mau prognóstico (205,206), por promover o metabolismo de energia, angiogênese, proliferação, migração e invasão das células cancerígenas (207–211). A via ERK-Ets1 é responsável pela regulação das metaloproteinases MMP3 e MMP9 por  $\beta$ -integrinas e também estimula a proliferação pela up-regulação de proteínas do ciclo celular (212,213). O silenciamento de Ets-1 na linhagem celular renal 786-O reduziu crescimento celular e formação de tumor (214). Ets-1 regula a transcrição de *CEBPB*, induzindo a polarização de macrófagos M2 após aumento de IL-10 e promove reparo celular removendo áreas de necrose no tecido muscular lesionado (215). *CEBPB* é um fator de transcrição que está down-regulado nas células deficientes em VHL após 16h de estímulo com soro. Esse fator é capaz de inibir a proliferação celular em osteosarcoma (216) e regular processos de transição epitélio mesenquimal via TGF- $\beta$  em câncer pancreático (217). Em glioblastomas, a baixa expressão de *CEBPB* ocorre após aumento de IL-6, aumentando os níveis da metalopeptidase DDP III (218), associada a agressividade tumoral em câncer de ovário (219). As células deficientes em VHL, além de apresentarem down-regulação de *CEBPB*, também apresentaram maiores níveis de *IL6R*. Pacientes com melanoma metastático tratados com inibidores de BRAF com níveis altos

de CEBPB tem melhor sobrevida (220). A ativação de CEBPB pode ser induzida por imatinibe, tratamento usado em tumores estromais gastrointestinais (GIST). Estudos iniciais não foram capazes de mostrar benefícios em pacientes com CRCC no tratamento com imatinibe, (221), porém, outro estudo sugere que o miRNA-200c é capaz de sensibilizar as células do CRCC para o tratamento com imatinibe e inibir a proliferação celular (222).

A hipóxia induz o metabolismo de glicose, promove proliferação, aumenta resistência a apoptose, induz angiogênese, migração celular para áreas com mais oxigênio (223), gera um ambiente imunossupressor, inibindo a habilidade de macrófagos de fagocitar células mortas, apresentar antígenos para células T, reduz a citotoxicidade das células *natural killer* e inibe funções antitumorais promovendo a diferenciação de macrófagos M1 para M2. A resposta imune de interferons do tipo I é suprimida durante a resposta celular a hipóxia. Essa resposta está envolvida no suporte a apresentação de antígenos pelas células dendríticas a linfócitos T citotóxicos (224). Nas células deficientes em VHL, genes como *MAVS* (um adaptador da via de IFN tipo I), e o fator de transcrição *IRF7* estão down-regulados. Os IFN tipo I são ativados após reconhecimento de RNA viral que, após liberados, acionam a via JAK-STAT (225). Nossos resultados mostraram que a down-regulação da via de IFN tipo I ocorre na ausência de VHL, enriquecida apenas no mRNA polissomal das linhagens celulares e não no mRNA total, indicando que após 16h a down-regulação de genes como *MAVS*, *ISG15*, *IRF7* e *IRF9* ocorre principalmente a nível traducional. A imunossupressão IFN do tipo I em tumores sólidos ocorre a nível proteico após 48h (224), apesar de observarmos a down-regulação da tradução já após 16h. A diminuição de IFN interfere no recrutamento de células T e *natural killer* dentro de áreas hipóxicas em tumores no pulmão e próstata (226,227). STAT-1 é regulado por HIF-1 $\alpha$ , porém a down-regulação de IFN tipo I não depende de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ . Em relação a mecanismos epigenéticos, foram encontradas poucas alterações globais na acessibilidade da cromatina de genes da via de IFN tipo I. A hipóxia altera a acessibilidade à região promotora de *STAT1* e *IRF3*, diminuindo a transcrição destes genes, porém esse efeito não pode ser totalmente explicado por esse tipo de regulação. Além de alterações epigenéticas, as mudanças traducionais nas células com e sem VHL podem influenciar na regulação da via de IFN tipo I, servindo como um outro mecanismo para regulação da resposta imune no câncer renal. Já foi descrito um efeito parcial de HIF-1 $\alpha$  na up-regulação de *IRF9*, que está up-regulado no mRNA polissomal das células deficientes em VHL. A expressão de *ISG15* também é afetada durante hipóxia e silenciamento de VHL. Além disso, *ISG15* é capaz de interagir com HIF-1 $\alpha$  e

desfazer a dimerização com HIF-1 $\beta$  (228). A down-regulação de interferons pode contribuir para o crescimento tumoral diminuindo a citotoxicidade de linfócitos T e a capacidade das células dendríticas de apresentar antígenos.

A resposta inflamatória em CRCC na ausência de VHL também mostrou uma up-regulação de genes envolvidos na cascata de coagulação e do sistema complemento (*SAA2*, *CFB*, *CFI*, *CNR1*, *CFD*), com impacto significativo na sobrevida de pacientes com CRCC (**Apêndice 4**). Pacientes com metástase que apresentam superexpressão de transferrina, que é regulada pelo sistema complemento, apresentam pior sobrevida (229). SAA (*Serum amyloid A*) é uma proteína envolvida na resposta inflamatória aguda que induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias em linhagens celulares e tecidos tumorais metastáticos. O processo inflamatório persistente pode induzir a carcinogênese criando um ambiente enriquecido em citocinas e fatores de crescimento (230). O gene *SAA2* está up-regulado no mRNA polissomal das células deficientes em VHL quando comparada com as células com VHL restituído. A liberação de proteínas como *SAA2* é induzida por citocinas produzidas por células endoteliais, linfócitos, monócitos e macrófagos. Assim como a maioria dos componentes do sistema imunológico, seu papel principal é na homeostasia. Durante uma infecção, a resposta inflamatória ocorre de forma rápida para reestabelecer a normalidade do local afetado. Na fase aguda, o pico de expressão SAA ocorre após 3 dias do início da resposta inflamatória e cai para níveis basais após 4 dias. Durante uma inflamação crônica, os níveis de SAA continuam constantemente altos e contribuem com a liberação de mais citocinas pró-inflamatórias (231,232). Em tumores sólidos e hematológicos, SAA pode funcionar como um marcador tumoral e altos níveis dessa proteína no soro indicam um pior prognóstico (230). Recentemente foi publicado um estudo mostrando que *SAA1* é um potencial marcador sérico de diagnóstico e prognóstico em carcinoma renal.

Em estadiamentos tumorais avançados, foi possível observar um aumento de *SAA1* a nível de mRNA e proteico devido a hipometilação do promotor deste gene. Além disso, células deficientes em *SAA1* perdem sua capacidade de migração e invasão *in vitro* (233). Em camundongos, altos níveis de *SAA1* aumentam a agressividade tumoral e formação de metástase reduzindo sobrevida. Assinaturas de expressão gênica validadas em tecidos de pacientes mostraram que *SAA2* e *CFB* solúveis podem ser biomarcadores preditivos para resposta terapêutica, ambos up-regulado na mRNA polissomal das células deficientes em VHL

(234). SAA2-SAA4 foi encontrado superexpresso durante a progressão de CRCC de acordo com o grau tumoral, sendo desfavorável para a sobrevida de pacientes com tumores renais (235).

mTOR, pVHL e HIF- $\alpha$  contribuem para a ontogenia do CRCC; tumores primários e metástases podem ter a superativação de HIF e/ou da via de mTOR. O bloqueio dessas vias de sinalização no CRCC metastático pode induzir vias alternativas, favorecendo a resistência ao tratamento (91). A ativação constante de PI3K/Akt/mTOR e a mutação em VHL causam o aumento de HIF- $\alpha$ , oferecendo um *feedback* positivo aos receptores de tirosina-quinase, após induzir fatores de crescimento como o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A via de PI3K/Akt/mTOR super ativada está associada à pior sobrevida (83) e os complexos mTORC1 e mTORC2 modulam a expressão de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ , respectivamente (90,236). Por outro lado, VHL regula mTORC1 através da via VHL/HIF/REDD1 em CRCC (119,237). *REDD1* é um gene alvo de HIF-1 $\alpha$  que, em hipóxia ou inativação de pVHL, codifica um regulador de mTORC1 (92)

DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*) são quinases com papel no reparo de dano no DNA, replicação em estresse, ciclo celular, manutenção dos telômeros, senescência e autofagia. A superexpressão das DNA-PKcs resulta no aumento da expressão de HIF-2 $\alpha$ , via mTORC2, induzindo a proliferação celular em ccRCC (238). Além disso, Akt2, substrato de mTORC2, regula a expressão de HIF-1 $\alpha$  (90). HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  suprimem DEPTOR (*DEP domain-containing mTOR-interacting protein*), uma proteína de interação de mTOR que contém o domínio de sensibilidade a quinase, favorecendo a resistência a tratamentos com inibidores de mTOR. Em contraste, PTEN promove a atividade transcricional de HIF-2 $\alpha$  em CRCC com VHL mutado, inibindo o repressor de HIF-2 $\alpha$  (239). O *cross-talk* entre PI3K/Akt/mTOR e HIF também pode estar ligado a ação de diferentes RNAs longos não codificantes (lncRNAs) (240). As funções mediadas por PI3K/Akt/mTOR e sua colaboração com o eixo VHL/HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  são um caminho para a carcinogênese do CRCC, contribuindo para a alta heterogeneidade intratumoral e resistência às terapias utilizadas atualmente.

Os mecanismos de interação entre o eixo VHL/HIF e a via de mTOR não são totalmente elucidados e ambos mecanismos parecem apresentar funções contraditórias no desenvolvimento do CRCC. pVHL regula Akt – de maneira independente de HIF – e a perda da proteína pode levar a super ativação de mTOR e sua via *downstream* (241). O uso de inibidores de autofagia pode potencializar a inibição alostérica de mTOR em células resistentes ao



tratamento. Células com VHL mutado possuem autofagia basal alta, o que permite o crescimento sob estresse (140) e, apesar de reduzir a tradução em ambas linhagens, o tratamento com rapamicina foi mais eficaz nas células RCC4/VHL, sugerindo maior sensibilidade. DEPTOR, assim como mTOR, faz parte dos complexos mTORC1 e mTORC2. DEPTOR e mTOR trabalham em conjunto, mantendo a homeostase; o aumento de HIF- $\alpha$  em carcinomas renais é capaz de suprimir a ação de DEPTOR, conferindo outro mecanismo de resistência ao tratamento (141). Em hipóxia, a redução da atividade de mTOR via REDD1 (142) pode causar a parada do ciclo celular (143). Para compensar e manter o desenvolvimento, células tumorais são capazes de adaptar e ativar outros genes envolvidos na sobrevivência e progressão tumoral, como *MAP2K1* e *CDK6*, respectivamente (242,243).

O aumento de HIF pode regular mTOR via REDD1 em hipóxia, diminuindo as taxas globais de tradução e selecionar uma tradução específica. A inibição de mTORC1 também pode regular negativamente a tradução de HIF- $\alpha$ . As células RCC4/VHL apresentaram taxas globais mais altas que as células deficientes em VHL. As células deficientes em VHL apresentaram certa resistência a morte após o tratamento com rapamicina, e apesar de significativo, a rapamicina diminuiu de forma mais expressiva a tradução global nas células com VHL restituído. Algumas mutações em mTOR permitem que a proteína escape da regulação negativa de REDD1, sugerindo que outros mecanismos também podem influenciar no prognóstico de pacientes com CRCC (244).

O tratamento com rapamicina afetou a tradução global nas células deficientes e proficientes em VHL tanto na fase aguda quanto na fase crônica, porém, de forma mais proeminente na presença de VHL. Interessantemente, nossos resultados mostraram que o controle da tradução em CRCC pode estar associado principalmente a perda de VHL do que a ativação de mTORC1, uma vez que poucos genes apresentaram diferenças na regulação após o tratamento com rapamicina. Além disso, a inativação de mTORC1 e de VHL concomitantemente foi responsável pelo aumento da tradução de genes que participam da morfogênese de vasos sanguíneos (*MYH9*, *CUL7* e *HDAC5*), *MYH9* codifica uma proteína presente no citoesqueleto que regula a adesão celular e sua alta expressão indica um pior prognóstico em pacientes tratados com sunitinibe. *MYH9* é regulado via AKT (245), porém nossos resultados sugerem outro mecanismo de regulação via tradução dependente de VHL e mTORC1. A expressão de *CUL7* (*Cullin-7*) não foi anteriormente avaliada em CRCC, porém altos níveis dessa proteína foram recentemente associados com pior prognóstico em gliomas

e câncer de mama (246–248). CUL7 promove proliferação celular através da down-regulação de p53 em hipóxia (249) e pode indicar resistência ao tratamento em pacientes com câncer de mama HER2+ (246). Nos estudos realizados, foi descrito que o aumento de CUL7 pode ativar a via de PI3K/AKT/mTOR (246), porém em nossos resultados observamos que a inibição de mTORC1 e VHL são necessárias na sua regulação dependente de mecanismos de tradução. Além disso, o aumento de CUL7 pode desencadear o aumento da resposta de NF- $\kappa$ B (247), que também está up-regulada na ausência de VHL. HDAC5 é uma histona presente no rim de pacientes diabéticos que favorece a transição epitélio-mesenquimal e a captação de glicose via PI3K/Akt (250).

## 7. CONCLUSÕES

Neste trabalho avaliamos o impacto da perda de VHL na tradução específica e determinamos se a modulação da expressão genica na resposta a rapamicina depende do status de VHL. Foram encontradas diferenças na resposta após estímulo com soro dependente do status de VHL, com alteração na tradução que se manifestam continuamente e tem como alvo um grupo de genes que participam de vias associadas a câncer. As células deficientes ou proficientes em VHL modulam diferencialmente a expressão gênica. A expressão total dos transcritos em comparação com os mRNAs diferencialmente traduzidos ocorre de forma distinta dependendo do status de VHL. A perda de VHL altera a tradução global e específica em linhagens celulares de CRCC. Células deficientes em VHL apresentaram up-regulação de processos envolvidos no crescimento e progressão tumoral regulados apenas via tradução, sem alterações via transcriptoma. Além disso, observamos que mTORC1 tem funções distintas nas linhagens celulares de CRCC dependendo da presença ou ausência de VHL. Estudos futuros serão necessários para entender como as diferenças na tradução específica dependente de VHL e suas respostas distintas ao tratamento com rapamicina estão envolvidos no desenvolvimento dos fenótipos de CRCC.

Por ser o principal gene envolvido na carcinogênese do CRCC, os estudos clínicos com alvos de VHL vem crescendo consideravelmente na última década. Por isso, avaliamos como HIF-2 $\alpha$ , um dos principais alvos de VHL, está associada a progressão tumoral e desfechos clínicos em pacientes. Nas análises encontramos que o papel de HIF-2 $\alpha$  é um fator de prognóstico dependente do estadiamento tumoral, podendo ser usado como um método de estratificação para determinar pacientes com mais risco de recidiva.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2018 Nov 1;68(6):394–424. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207593>
2. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, et al. Renal cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 2017 Mar 9;3:17009. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28276433>
3. Rini BI, Campbell SC, Escudier B. Renal cell carcinoma. *Lancet* [Internet]. 2009 Mar 28;373(9669):1119–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19269025>
4. National Cancer Institute. Cancer stat facts: kidney and renal pelvis cancer [Internet]. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/kidrp.html>. 2018. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/kidrp.html>
5. Canadian Cancer Statistics Advisory Committee. Canadian Cancer Statistics 2018 [Internet]. Vol. 68, [cancer.ca/Canadian-Cancer-Statistics-2018-EN.pdf](http://cancer.ca/Canadian-Cancer-Statistics-2018-EN.pdf). 2018. p. 7–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29313949>
6. Flaherty KT, Fuchs CS, Colditz GA, Stampfer MJ, Speizer FE, Willett WC, et al. A prospective study of body mass index, hypertension, and smoking and the risk of renal cell carcinoma (United States). *Cancer Causes Control* [Internet]. 2005 Nov;16(9):1099–106. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16184476>
7. Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer* [Internet]. 2005 Mar 10;114(1):101–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15523697>
8. Adams KF, Leitzmann MF, Albanes D, Kipnis V, Moore SC, Schatzkin A, et al. Body size and renal cell cancer incidence in a large US cohort study. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2008 Aug 1;168(3):268–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18544571>
9. Gnarr JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* [Internet]. 1994 May;7(1):85–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7915601>
10. Kroeger N, Klatte T, Chamie K, Rao PN, Birkhäuser FD, Sonn GA, et al. Deletions of chromosomes 3p and 14q molecularly subclassify clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* [Internet]. 2013 Apr 15;119(8):1547–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23335244>
11. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2005 Dec 8;353(23):2477–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339096>
12. Decastro GJ, McKiernan JM. Epidemiology, clinical staging, and presentation of renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am* [Internet]. 2008 Nov;35(4):581–92; vi. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18992612>

13. Dutcher JP, Szczylik C, Tannir N, Benedetto P, Ruff P, Hsu A, et al. Correlation of survival with tumor histology, age, and prognostic risk group for previously untreated patients with advanced renal cell carcinoma (adv RCC) receiving temsirolimus (TEMSR) or interferon-alpha (IFN). *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2007 Jun 20;25(18\_suppl):5033–5033. Available from: [http://ascopubs.org/doi/10.1200/jco.2007.25.18\\_suppl.5033](http://ascopubs.org/doi/10.1200/jco.2007.25.18_suppl.5033)
14. Catalano C, Fraioli F, Laghi A, Napoli A, Pediconi F, Danti M, et al. High-resolution multidetector CT in the preoperative evaluation of patients with renal cell carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* [Internet]. 2003 May;180(5):1271–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704036>
15. Hollingsworth JM, Miller DC, Daignault S, Hollenbeck BK. Rising incidence of small renal masses: a need to reassess treatment effect. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2006 Sep 20;98(18):1331–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16985252>
16. Gill IS, Aron M, Gervais DA, Jewett MAS. Clinical practice. Small renal mass. *N Engl J Med* [Internet]. 2010 Feb 18;362(7):624–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164486>
17. Butler BP, Novick AC, Miller DP, Campbell SA, Licht MR. Management of small unilateral renal cell carcinomas: radical versus nephron-sparing surgery. *Urology* [Internet]. 1995 Jan;45(1):34–40; discussion 40-1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7817478>
18. MacLennan S, Imamura M, Lapitan MC, Omar MI, Lam TBL, Hilvano-Cabungcal AM, et al. Systematic review of oncological outcomes following surgical management of localised renal cancer. *Eur Urol* [Internet]. 2012 May;61(5):972–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22405593>
19. Pignot G, Bigot P, Bernhard JC, Bouliere F, Bessede T, Bensalah K, et al. Nephron-sparing surgery is superior to radical nephrectomy in preserving renal function benefit even when expanding indications beyond the traditional 4-cm cutoff. *Urol Oncol* [Internet]. 2014 Oct;32(7):1024–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24996775>
20. Scosyrev E, Messing EM, Sylvester R, Campbell S, van Poppel H. Renal function after nephron-sparing surgery versus radical nephrectomy: results from EORTC randomized trial 30904. *Eur Urol* [Internet]. 2014 Feb;65(2):372–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23850254>
21. Gill IS, Novick AC, Meraney AM, Chen RN, Hobart MG, Sung GT, et al. Laparoscopic renal cryoablation in 32 patients. *Urology* [Internet]. 2000 Nov 1;56(5):748–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11068292>
22. Gill IS, Remer EM, Hasan WA, Strzempkowski B, Spaliviero M, Steinberg AP, et al. Renal cryoablation: outcome at 3 years. *J Urol* [Internet]. 2005 Jun;173(6):1903–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15879772>
23. Hafron J, Kaouk JH. Ablative techniques for the management of kidney cancer. *Nat Clin Pract Urol* [Internet]. 2007 May;4(5):261–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17483811>

24. el Dib R, Touma NJ, Kapoor A. Cryoablation vs radiofrequency ablation for the treatment of renal cell carcinoma: a meta-analysis of case series studies. *BJU Int* [Internet]. 2012 Aug;110(4):510–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22304329>
25. Lane BR, Tobert CM, Riedinger CB. Growth kinetics and active surveillance for small renal masses. *Curr Opin Urol* [Internet]. 2012 Sep;22(5):353–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22706068>
26. Pierorazio PM, Johnson MH, Ball MW, Gorin MA, Trock BJ, Chang P, et al. Five-year Analysis of a Multi-institutional Prospective Clinical Trial of Delayed Intervention and Surveillance for Small Renal Masses: The DISSRM Registry. *European Urology* [Internet]. 2015 Sep;68(3):408–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.02.001>
27. Motzer RJ, Russo P. Systemic therapy for renal cell carcinoma. *J Urol* [Internet]. 2000 Feb;163(2):408–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647643>
28. Amato RJ. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Semin Oncol* [Internet]. 2000 Apr;27(2):177–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10768596>
29. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2007 Jan 11;356(2):115–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17215529>
30. Motzer RJ, Rini BI, Bukowski RM, Curti BD, George DJ, Hudes GR, et al. Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JAMA* [Internet]. 2006 Jun;295(21):2516–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16757724>
31. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* [Internet]. 2008 Aug 9;372(9637):449–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18653228>
32. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, et al. Temsirolimus, Interferon Alfa, or Both for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2007 May 31;356(22):2271–81. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa066838>
33. Choueiri TK, Motzer RJ. Systemic Therapy for Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2017 Jan 25;376(4):354–66. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1601333>
34. McDermott DF, Regan MM, Clark JI, Flaherty LE, Weiss GR, Logan TF, et al. Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2005 Jan 1;23(1):133–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15625368>
35. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Nov 5;373(19):1803–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26406148>
36. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2018 Apr 5;378(14):1277–90.

37. Chakiryan NH, Jiang DD, Gillis KA, Green E, Hajiran A, Hugar L, et al. Real-World Survival Outcomes Associated With First-Line Immunotherapy, Targeted Therapy, and Combination Therapy for Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *JAMA Netw Open* [Internet]. 2021;4(5):e2111329. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34032854>
38. Vaishampayan U, Schöffski P, Ravaud A, Borel C, Peguero J, Chaves J, et al. Avelumab monotherapy as first-line or second-line treatment in patients with metastatic renal cell carcinoma: phase Ib results from the JAVELIN Solid Tumor trial. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2019;7(1):275. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31651359>
39. Sudarshan S, Linehan WM. Genetic basis of cancer of the kidney. *Semin Oncol* [Internet]. 2006 Oct;33(5):544–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17045083>
40. Vargas HA, Chaim J, Lefkowitz RA, Lakhman Y, Zheng J, Moskowitz CS, et al. Renal cortical tumors: use of multiphasic contrast-enhanced MR imaging to differentiate benign and malignant histologic subtypes. *Radiology* [Internet]. 2012 Sep;264(3):779–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22829683>
41. Bennington J. Tumors of the kidney. In: *Surgical Pathology of Urologic Diseases*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1987. p. 120–2.
42. Fukuoka T, Honda M, Namiki M, Tada Y, Matsuda M, Sonoda T. Renal cell carcinoma with heterotopic bone formation. Case report and review of the Japanese literature. *Urol Int* [Internet]. 1987;42(6):458–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3329422>
43. Frew IJ, Moch H. A clearer view of the molecular complexity of clear cell renal cell carcinoma. *Annu Rev Pathol* [Internet]. 2015 Jan 24;10(1):263–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25387056>
44. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* [Internet]. 1976 Oct 1;194(4260):23–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/959840>
45. Kapitsinou PP, Haase VH. The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice. *Cell Death Differ* [Internet]. 2008 Apr;15(4):650–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18219317>
46. Peña-Llopis S, Vega-Rubín-De-Celis S, Liao A, Leng N, Pavía-Jiménez A, Wang S, et al. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nature Genetics* [Internet]. 2012 Jun 10;44(7):751–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22683710>
47. Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, Maekawa S, Okuno Y, Kamura T, et al. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat Genet* [Internet]. 2013 Aug;45(8):860–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23797736>
48. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* [Internet]. 2013 Jul 4;499(7456):43–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23792563>
49. Meng Q, Xia C, Fang J, Rojanasakul Y, Jiang BH. Role of PI3K and AKT specific isoforms in ovarian cancer cell migration, invasion and proliferation through the p70S6K1 pathway. *Cell Signal*

- [Internet]. 2006 Dec;18(12):2262–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16839745>
50. Koul D. PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2008 Sep;7(9):1321–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18836294>
  51. Wong KK, Engelman JA, Cantley LC. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* [Internet]. 2010 Feb;20(1):87–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20006486>
  52. Brugarolas J. Molecular genetics of clear-cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2014 Jun 20;32(18):1968–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24821879>
  53. Karsdorp N, Elderson A, Wittebol-Post D, Hené RJ, Vos J, Feldberg MA, et al. Von Hippel-Lindau disease: new strategies in early detection and treatment. *Am J Med* [Internet]. 1994 Aug;97(2):158–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8059782>
  54. Haase VH, Glickman JN, Socolovsky M, Jaenisch R. Vascular tumors in livers with targeted inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001 Feb 13;98(4):1583–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171994>
  55. Rankin EB, Tomaszewski JE, Haase VH. Renal cyst development in mice with conditional inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer Res* [Internet]. 2006 Mar 1;66(5):2576–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16510575>
  56. Shen HCJ, Adem A, Ylaya K, Wilson A, He M, Lorang D, et al. Deciphering von Hippel-Lindau (VHL/Vhl)-associated pancreatic manifestations by inactivating Vhl in specific pancreatic cell populations. *PLoS One* [Internet]. 2009/04/02. 2009;4(4):e4897. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19340311>
  57. Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, et al. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1996 Nov 12;93(23):12969–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8917528>
  58. Zhang Q, Yan Q, Yang H, Wei W. Oxygen sensing and adaptability won the 2019 Nobel Prize in Physiology or medicine. *Genes & Diseases* [Internet]. 2019 Dec;6(4):328–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352304219300935>
  59. Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TDW, Schofield CJ, Pugh CW, et al. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature* [Internet]. 2002 Jun 27;417(6892):975–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12050673>
  60. Masson N, Ratcliffe PJ. Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer Metab* [Internet]. 2014 Feb 4;2(1):3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24491179>
  61. Maynard MA, Qi H, Chung J, Lee EHL, Kondo Y, Hara S, et al. Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Mar 28;278(13):11032–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538644>



62. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2003 Dec;23(24):9361–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14645546>
63. Maxwell PH. Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Exp Physiol* [Internet]. 2005 Nov;90(6):791–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16157658>
64. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* [Internet]. 2001 Oct 15;15(20):2675–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11641274>
65. Raval RR, Lau KW, Tran MGB, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL, et al. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2005 Jul;25(13):5675–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15964822>
66. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* [Internet]. 1956 Feb 24;123(3191):309–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13298683>
67. Kondo K, Kim WY, Lechpammer M, Kaelin Jr WG. Inhibition of HIF2 $\alpha$  Is Sufficient to Suppress pVHL-Defective Tumor Growth. *PLOS Biology* [Internet]. 2003 Dec 22;1(3):e83-. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000083>
68. Zimmer M, Doucette D, Siddiqui N, Iliopoulos O. Inhibition of hypoxia-inducible factor is sufficient for growth suppression of VHL-/- tumors. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2004 Feb;2(2):89–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14985465>
69. Krishnamachary B, Zagzag D, Nagasawa H, Rainey K, Okuyama H, Baek JH, et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFH1A, and ZFH1B. *Cancer Res* [Internet]. 2006 Mar 1;66(5):2725–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16510593>
70. Harten SK, Shukla D, Barod R, Hergovich A, Balda MS, Matter K, et al. Regulation of renal epithelial tight junctions by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene involves occludin and claudin 1 and is independent of E-cadherin. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2008/12/10. 2009 Feb;20(3):1089–101. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19073886>
71. Biswas S, Troy H, Leek R, Chung YL, Li JL, Raval RR, et al. Effects of HIF-1alpha and HIF2alpha on Growth and Metabolism of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma 786-0 Xenografts. *J Oncol* [Internet]. 2010;2010:757908. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20652061>
72. Chen W, Hill H, Christie A, Kim MS, Holloman E, Pavia-Jimenez A, et al. Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist. *Nature* [Internet]. 2016;539(7627):112–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27595394>
73. Maranchie JK, Vasselli JR, Riss J, Bonifacino JS, Linehan WM, Klausner RD. The contribution of VHL substrate binding and HIF1-alpha to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. *Cancer Cell* [Internet]. 2002 Apr;1(3):247–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086861>

74. Brenner W, Färber G, Herget T, Lehr HA, Hengstler JG, Thüroff JW. Loss of tumor suppressor protein PTEN during renal carcinogenesis. *Int J Cancer* [Internet]. 2002 May 1;99(1):53–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11948491>
75. Zaman MS, Thamminana S, Shahryari V, Chiyomaru T, Deng G, Saini S, et al. Inhibition of PTEN gene expression by oncogenic miR-23b-3p in renal cancer. *PLoS One* [Internet]. 2012 Nov 26;7(11):e50203. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23189187>
76. Tang L, Li X, Gao Y, Chen L, Gu L, Chen J, et al. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) expression on oncologic outcome in renal cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* [Internet]. 2017 Jul 3;12(7):e0179437. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28672019>
77. Fan C, Zhao C, Wang F, Li S, Wang J. Significance of PTEN Mutation in Cellular Process, Prognosis, and Drug Selection in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Front Oncol* [Internet]. 2019 May 8;9(MAY):357. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31139560>
78. Hsieh JJ, Chen D, Wang PI, Marker M, Redzematovic A, Chen YB, et al. Genomic Biomarkers of a Randomized Trial Comparing First-line Everolimus and Sunitinib in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* [Internet]. 2016/10/15. 2017 Mar;71(3):405–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27751729>
79. Voss MH, Chen D, Reising A, Marker M, Shi J, Xu J, et al. PTEN Expression, Not Mutation Status in TSC1, TSC2, or mTOR, Correlates with the Outcome on Everolimus in Patients with Renal Cell Carcinoma Treated on the Randomized RECORD-3 Trial. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2019 Jan 15;25(2):506–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30327302>
80. Horiguchi A, Oya M, Uchida A, Marumo K, Murai M. Elevated Akt activation and its impact on clinicopathological features of renal cell carcinoma. *J Urol* [Internet]. 2003 Feb;169(2):710–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12544348>
81. Hara S, Oya M, Mizuno R, Horiguchi A, Marumo K, Murai M. Akt activation in renal cell carcinoma: contribution of a decreased PTEN expression and the induction of apoptosis by an Akt inhibitor. *Ann Oncol* [Internet]. 2005 Jun;16(6):928–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15851405>
82. Hager M, Haufe H, Alinger B, Kolbitsch C. pS6 Expression in normal renal parenchyma, primary renal cell carcinomas and their metastases. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 2012 Apr;18(2):277–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21792700>
83. Merseburger AS, Hennenlotter J, Kuehs U, Simon P, Kruck S, Koch E, et al. Activation of PI3K is associated with reduced survival in renal cell carcinoma. *Urol Int* [Internet]. 2008;80(4):372–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18587247>
84. Lin F, Zhang PL, Yang XJ, Prichard JW, Lun M, Brown RE. Morphoproteomic and molecular concomitants of an overexpressed and activated mTOR pathway in renal cell carcinomas. *Ann Clin Lab Sci* [Internet]. 2006;36(3):283–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951269>
85. Pantuck AJ, Seligson DB, Klatte T, Yu H, Leppert JT, Moore L, et al. Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted

- therapy. *Cancer* [Internet]. 2007 Jun 1;109(11):2257–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17440983>
86. Hager M, Haufe H, Lusuardi L, Schmeller N, Kolbitsch C. PTEN, pAKT, and pmTOR expression and subcellular distribution in primary renal cell carcinomas and their metastases. *Cancer Invest* [Internet]. 2011 Aug;29(7):427–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21696297>
  87. Rausch S, Schollenberger D, Hennenlotter J, Stühler V, Kruck S, Stenzl A, et al. mTOR and mTOR phosphorylation status in primary and metastatic renal cell carcinoma tissue: differential expression and clinical relevance. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2019 Jan;145(1):153–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30368665>
  88. Voss MH, Hakimi AA, Pham CG, Brannon AR, Chen YB, Cunha LF, et al. Tumor genetic analyses of patients with metastatic renal cell carcinoma and extended benefit from mTOR inhibitor therapy. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2014/03/12. 2014 Apr 1;20(7):1955–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24622468>
  89. Kwiatkowski DJ, Choueiri TK, Fay AP, Rini BI, Thorner AR, de Velasco G, et al. Mutations in TSC1, TSC2, and MTOR Are Associated with Response to Rapalogs in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2016;22(10):2445–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26831717>
  90. Toschi A, Lee E, Gadir N, Ohh M, Foster DA. Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1 alpha and 2 alpha on mTORC1 and mTORC2. *J Biol Chem* [Internet]. 2008/10/22. 2008 Dec 12;283(50):34495–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18945681>
  91. Schultz L, Chaux A, Albadine R, Hicks J, Kim JJ, de Marzo AM, et al. Immunoexpression status and prognostic value of mTOR and hypoxia-induced pathway members in primary and metastatic clear cell renal cell carcinomas. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2011 Oct;35(10):1549–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21881486>
  92. Kucejova B, Peña-Llopis S, Yamasaki T, Sivanand S, Tran TAT, Alexander S, et al. Interplay between pVHL and mTORC1 pathways in clear-cell renal cell carcinoma. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2011 Sep;9(9):1255–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21798997>
  93. Kim SH, Park WS, Park EY, Park B, Joo J, Joung JY, et al. The prognostic value of BAP1, PBRM1, pS6, PTEN, TGase2, PD-L1, CA9, PSMA, and Ki-67 tissue markers in localized renal cell carcinoma: A retrospective study of tissue microarrays using immunohistochemistry. *PLOS ONE* [Internet]. 2017 Jun 27;12(6):e0179610-. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179610>
  94. de Campos ECR, da Fonseca FP, Zequ S de C, Guimarães GC, Soares FA, Lopes A. Analysis of PTEN gene by fluorescent in situ hybridization in renal cell carcinoma. *Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes* [Internet]. 2013;40(6):471–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24573625>
  95. Crick F. On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol* [Internet]. 1958;12:138–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13580867>

96. Crick F. Central dogma of molecular biology. *Nature* [Internet]. 1970 Aug 8;227(5258):561–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4913914>
97. Laham-Karam N, Pinto GP, Poso A, Kokkonen P. Transcription and Translation Inhibitors in Cancer Treatment. *Front Chem* [Internet]. 2020;8:276. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32373584>
98. Cheng Y, He C, Wang M, Ma X, Mo F, Yang S, et al. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2019;4(1):62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31871779>
99. Hinnebusch AG, Lorsch JR. The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2012 Oct 1;4(10):a011544. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22815232>
100. Kim J, Guan KL. mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2019;21(1):63–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30602761>
101. Corradetti MN, Guan KL. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene* [Internet]. 2006 Oct 16;25(48):6347–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17041621>
102. Truitt ML, Ruggiero D. New frontiers in translational control of the cancer genome. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2016;16(5):288–304. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27112207>
103. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2009 May;10(5):307–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339977>
104. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2011 Jan;12(1):21–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21157483>
105. Malemud CJ. The PI3K/Akt/PTEN/mTOR pathway: a fruitful target for inducing cell death in rheumatoid arthritis? *Future Med Chem* [Internet]. 2015 Jul 1;7(9):1137–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26132523>
106. Ramanathan A, Robb GB, Chan SH. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2016 Sep 19;44(16):7511–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27317694>
107. Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* [Internet]. 1998 Jul;2(1):135–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9702200>
108. Pestova T v, Kolupaeva VG. The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev* [Internet]. 2002 Nov 15;16(22):2906–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12435632>

109. Gebauer F, Hentze MW. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2004 Oct;5(10):827–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15459663>
110. Passmore LA, Schmeing TM, Maag D, Applefield DJ, Acker MG, Algire MA, et al. The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. *Mol Cell* [Internet]. 2007 Apr 13;26(1):41–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17434125>
111. Bhat M, Robichaud N, Hulea L, Sonenberg N, Pelletier J, Topisirovic I. Targeting the translation machinery in cancer. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2015 Apr;14(4):261–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25743081>
112. Wilson FR, Coombes ME, Wylie Q, Yurchenko M, Brezden-Masley C, Hutton B, et al. Herceptin® (trastuzumab) in HER2-positive early breast cancer: protocol for a systematic review and cumulative network meta-analysis. *Syst Rev* [Internet]. 2017 Oct 10;6(1):196. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29017563>
113. Robertson D. Genentech's anticancer Mab expected by November. *Nat Biotechnol* [Internet]. 1998 Jul;16(7):615. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9661186>
114. Campbell L, Jasani B, Griffiths DF, Gumbleton M. Phospho-4e-BP1 and eIF4E overexpression synergistically drives disease progression in clinically confined clear cell renal cell carcinoma. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2015;5(9):2838–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26609489>
115. Rosenwald IB, Kaspar R, Rousseau D, Gehrke L, Leboulch P, Chen JJ, et al. Eukaryotic translation initiation factor 4E regulates expression of cyclin D1 at transcriptional and post-transcriptional levels. *J Biol Chem* [Internet]. 1995 Sep 8;270(36):21176–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7673150>
116. Hinnebusch AG, Ivanov IP, Sonenberg N. Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science* [Internet]. 2016 Jun 17;352(6292):1413–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27313038>
117. Uniacke J, Perera JK, Lachance G, Francisco CB, Lee S. Cancer cells exploit eIF4E2-directed synthesis of hypoxia response proteins to drive tumor progression. *Cancer Res* [Internet]. 2014 Mar 1;74(5):1379–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24408918>
118. Kelly NJ, Varga JFA, Specker EJ, Romeo CM, Coomber BL, Uniacke J. Hypoxia activates cadherin-22 synthesis via eIF4E2 to drive cancer cell migration, invasion and adhesion. *Oncogene* [Internet]. 2018 Oct 1;37(5):651–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28991229>
119. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, et al. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev* [Internet]. 2004 Dec 1;18(23):2893–904. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15545625>
120. Cohen JD, Gard JMC, Nagle RB, Dietrich JD, Monks TJ, Lau SS. ERK crosstalks with 4EBP1 to activate cyclin D1 translation during quinol-thioether-induced tuberous sclerosis renal cell

- carcinoma. *Toxicol Sci* [Internet]. 2011/08/02. 2011 Nov;124(1):75–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21813464>
121. Velásquez C, Cheng E, Shuda M, Lee-Oesterreich PJ, Pogge von Strandmann L, Gritsenko MA, et al. Mitotic protein kinase CDK1 phosphorylation of mRNA translation regulator 4E-BP1 Ser83 may contribute to cell transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2016 Jul 26;113(30):8466–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27402756>
  122. Maier T, Güell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett* [Internet]. 2009 Dec 17;583(24):3966–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19850042>
  123. Larsson O, Sonenberg N, Nadon R. Identification of differential translation in genome wide studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010 Dec 14;107(50):21487–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21115840>
  124. Wang T, Cui Y, Jin J, Guo J, Wang G, Yin X, et al. Translating mRNAs strongly correlate to proteins in a multivariate manner and their translation ratios are phenotype specific. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2013 May 1;41(9):4743–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519614>
  125. Mikulits W, Pradet-Balade B, Habermann B, Beug H, Garcia-Sanz JA, Müllner EW. Isolation of translationally controlled mRNAs by differential screening. *FASEB J* [Internet]. 2000 Aug;14(11):1641–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10928999>
  126. Larsson O, Tian B, Sonenberg N. Toward a genome-wide landscape of translational control. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2013 Jan 1;5(1):a012302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23209130>
  127. Liang S, Bellato HM, Lorent J, Lupinacci FCS, Oertlin C, van Hoef V, et al. Polysome-profiling in small tissue samples. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2018 Jan 9;46(1):e3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29069469>
  128. Alberts B, Alexander J, Julian L, Martin R, Keith R, Peter W. From RNA to Protein. In: *Molecular Biology of the Cell* [Internet]. 4th ed. New York: Garland Science; 2002. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26829/>
  129. Brodaczewska KK, Szczylik C, Fiedorowicz M, Porta C, Czarnecka AM. Choosing the right cell line for renal cell cancer research. *Mol Cancer* [Internet]. 2016 Dec 19;15(1):83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27993170>
  130. Beserra A. Estabelecimento de uma plataforma de estudos em carcinoma de células renais baseados em xenoinxertos em animais imunodeficientes. [São Paulo]: Fundação Antonio Prudente; 2019.
  131. Picelli S, Faridani OR, Björklund AK, Winberg G, Sagasser S, Sandberg R. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat Protoc* [Internet]. 2014 Jan;9(1):171–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24385147>
  132. Ewels PA, Peltzer A, Fillinger S, Patel H, Alneberg J, Wilm A, et al. The nf-core framework for community-curated bioinformatics pipelines. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2020;38(3):276–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32055031>

133. Larsson O, Sonenberg N, Nadon R. anota: Analysis of differential translation in genome-wide studies. *Bioinformatics* [Internet]. 2011 May 15;27(10):1440–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21422072>
134. Oertlin C, Lorent J, Murie C, Furic L, Topisirovic I, Larsson O. Generally applicable transcriptome-wide analysis of translation using anota2seq. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Jul 9;47(12):e70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30926999>
135. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform* [Internet]. 2009 Apr;42(2):377–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18929686>
136. Harris PA, Taylor R, Minor BL, Elliott V, Fernandez M, O'Neal L, et al. The REDCap consortium: Building an international community of software platform partners. *J Biomed Inform* [Internet]. 2019;95:103208. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31078660>
137. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* [Internet]. 1999 May 20;399(6733):271–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10353251>
138. Ljungberg B, Albiges L, Abu-Ghanem Y, Bensalah K, Dabestani S, Fernández-Pello S, et al. European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2019 Update. *Eur Urol* [Internet]. 2019 May;75(5):799–810. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30803729>
139. Roux PP, Topisirovic I. Signaling Pathways Involved in the Regulation of mRNA Translation. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2018 Apr 15;38(12):e00070-18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29610153>
140. Bray K, Mathew R, Lau A, Kamphorst JJ, Fan J, Chen J, et al. Autophagy suppresses RIP kinase-dependent necrosis enabling survival to mTOR inhibition. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jul 26;7(7):e41831. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22848625>
141. Doan H, Parsons A, Devkumar S, Selvarajah J, Miralles F, Carroll VA. HIF-mediated Suppression of DEPTOR Confers Resistance to mTOR Kinase Inhibition in Renal Cancer. *iScience* [Internet]. 2019/10/26. 2019 Nov 22;21:509–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31710966>
142. Vadysirisack DD, Ellisen LW. mTOR activity under hypoxia. Weichhart T, editor. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2012;821:45–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22125059>
143. ben Sahra I, Regazzetti C, Robert G, Laurent K, le Marchand-Brustel Y, Auburger P, et al. Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer Res* [Internet]. 2011 Jul 1;71(13):4366–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21540236>
144. Myriam G, M EJ, Berton Z, Michael L, Laura G, Igor K, et al. Protective Function of von Hippel-Lindau Protein against Impaired Protein Processing in Renal Carcinoma Cells. *Molecular and*

- Cellular Biology [Internet]. 1999 Feb 1;19(2):1289–300. Available from: <https://doi.org/10.1128/MCB.19.2.1289>
145. Stefanie G, L MJ, Krystyna MM, Isabel L de S, Jinshui F, Wengong W, et al. Influence of the RNA-Binding Protein HuR in pVHL-Regulated p53 Expression in Renal Carcinoma Cells. *Molecular and Cellular Biology* [Internet]. 2003 Oct 15;23(20):7083–95. Available from: <https://doi.org/10.1128/MCB.23.20.7083-7095.2003>
  146. Lorent J, Kusnadi EP, van Hoef V, Rebello RJ, Leibovitch M, Ristau J, et al. Translational offsetting as a mode of estrogen receptor  $\alpha$ -dependent regulation of gene expression. *EMBO J* [Internet]. 2019 Dec 2;38(23):e101323. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31556460>
  147. Liao Y, Wang J, Jaehnig EJ, Shi Z, Zhang B. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Jul 2;47(W1):W199–205. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31114916>
  148. Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- $\alpha$  and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- $\alpha$ . *J Biol Chem* [Internet]. 2003 May 2;278(18):15911–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12606543>
  149. Triantafyllou A, Liakos P, Tsakalof A, Georgatsou E, Simos G, Bonanou S. Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI-3K- and MAPK-dependent mechanism. *Free Radic Res* [Internet]. 2006 Aug;40(8):847–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17015263>
  150. Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS. Dynamic, site-specific interaction of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  with the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Cancer Res* [Internet]. 2001 May 15;61(10):4136–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11358837>
  151. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes Dev* [Internet]. 2000 Jan 1;14(1):34–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640274>
  152. Kandori S, Kojima T, Matsuoka T, Yoshino T, Sugiyama A, Nakamura E, et al. Phospholipase D2 promotes disease progression of renal cell carcinoma through the induction of angiogenin. *Cancer Sci* [Internet]. 2018/05/25. 2018 Jun;109(6):1865–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29660846>
  153. Dodd KM, Yang J, Shen MH, Sampson JR, Tee AR. mTORC1 drives HIF-1 $\alpha$  and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3. *Oncogene* [Internet]. 2015 Apr 23;34(17):2239–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24931163>
  154. Lopez-Sánchez LM, Jimenez C, Valverde A, Hernandez V, Peñarando J, Martinez A, et al. CoCl<sub>2</sub>, a mimic of hypoxia, induces formation of polyploid giant cells with stem characteristics in colon cancer. Maki CG, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jun 16;9(6):e99143. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24932611>
  155. Dowling RJO, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E, et al. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science* [Internet].



- 2010 May 28;328(5982):1172–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20508131>
156. Uniacke J, Holterman CE, Lachance G, Franovic A, Jacob MD, Fabian MR, et al. An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery. *Nature* [Internet]. 2012 May 6;486(7401):126–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22678294>
  157. Franovic A, Gunaratnam L, Smith K, Robert I, Patten D, Lee S. Translational up-regulation of the EGFR by tumor hypoxia provides a nonmutational explanation for its overexpression in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Aug 7;104(32):13092–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17670948>
  158. Melanson G, Timpano S, Uniacke J. The eIF4E2-Directed Hypoxic Cap-Dependent Translation Machinery Reveals Novel Therapeutic Potential for Cancer Treatment. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2017;2017:6098107. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29317983>
  159. Koh MY, Lemos R, Liu X, Powis G. The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1 $\alpha$ - to HIF-2 $\alpha$ -dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res* [Internet]. 2011 Jun 1;71(11):4015–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21512133>
  160. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2011 Dec 15;12(1):9–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22169972>
  161. Raval RR, Lau KW, Tran MGB, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL, et al. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2005 Jul;25(13):5675–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15964822>
  162. Szendrői A, Szász AM, Kardos M, Tóké AM, Idan R, Szűcs M, et al. Opposite prognostic roles of HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  expressions in bone metastatic clear cell renal cell cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Jul 5;7(27):42086–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27244898>
  163. Gkagkalidis K, Kampantais S, Dimitriadis G, Gourvas V, Kapoukranidou D, Mironidou-Tzouveleki M. Expression of HIF-2a in clear-cell renal cell carcinoma independently predicts overall survival. *Med Mol Morphol* [Internet]. 2020 Dec;53(4):229–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32219604>
  164. Hothorn T, Lausen B. On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Computational Statistics & Data Analysis* [Internet]. 2003 Jun;43(2):121–37. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167947302002256>
  165. Gossage L, Eisen T, Maher ER. VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2015 Jan;15(1):55–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25533676>
  166. Hakimi AA, Pham CG, Hsieh JJ. A clear picture of renal cell carcinoma. *Nat Genet* [Internet]. 2013 Aug;45(8):849–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23892664>

167. Mitchell TJ, Turajlic S, Rowan A, Nicol D, Farmery JHR, O'Brien T, et al. Timing the Landmark Events in the Evolution of Clear Cell Renal Cell Cancer: TRACERx Renal. *Cell* [Internet]. 2018/04/12. 2018 Apr 19;173(3):611-623.e17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29656891>
168. Kaelin WG. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2002 Sep;2(9):673–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209156>
169. Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ. The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2003 Jul;60(7):1376–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12943226>
170. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* [Internet]. 2012 Feb 3;148(3):399–408. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22304911>
171. Carroll VA, Ashcroft M. Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  versus HIF-2 $\alpha$  in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway. *Cancer Res* [Internet]. 2006 Jun 15;66(12):6264–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16778202>
172. Kondo K, Klco J, Nakamura E, Lechpammer M, Kaelin WG. Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell* [Internet]. 2002 Apr 1;1(3):237–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086860>
173. Shen C, Beroukhi R, Schumacher SE, Zhou J, Chang M, Signoretti S, et al. Genetic and functional studies implicate HIF1 $\alpha$  as a 14q kidney cancer suppressor gene. *Cancer Discov* [Internet]. 2011 Aug 15;1(3):222–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037472>
174. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 versus HIF-2--is one more important than the other? *Vascul Pharmacol* [Internet]. 2012;56(5–6):245–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22366374>
175. Koritzinsky M, Magagnin MG, van den Beucken T, Seigneuric R, Savelkoul K, Dostie J, et al. Gene expression during acute and prolonged hypoxia is regulated by distinct mechanisms of translational control. *EMBO J* [Internet]. 2006 Mar 8;25(5):1114–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16467844>
176. Gandin V, Sikström K, Alain T, Morita M, McLaughlan S, Larsson O, et al. Polysome Fractionation and Analysis of Mammalian Translatomes on a Genome-wide Scale. *Journal of Visualized Experiments* [Internet]. 2014 May 17;(87). Available from: <http://www.jove.com/video/51455/polysome-fractionation-analysis-mammalian-translatomes-on-genome-wide>
177. Liu X, Simon JM, Xie H, Hu L, Wang J, Zurlo G, et al. Genome-wide Screening Identifies SFMBT1 as an Oncogenic Driver in Cancer with VHL Loss. *Mol Cell* [Internet]. 2020 Mar 19;77(6):1294–1306.e5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32023483>
178. Liu S, Cai X, Wu J, Cong Q, Chen X, Li T, et al. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science* [Internet]. 2015 Mar 13;347(6227):aaa2630. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25636800>

179. Hu L, Xie H, Liu X, Potjewyd F, James LI, Wilkerson EM, et al. TBK1 Is a Synthetic Lethal Target in Cancer with VHL Loss. *Cancer Discov* [Internet]. 2019/12/06. 2020 Mar;10(3):460–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31810986>
180. Zhang J, Wu T, Simon J, Takada M, Saito R, Fan C, et al. VHL substrate transcription factor ZHX2 as an oncogenic driver in clear cell renal cell carcinoma. *Science* [Internet]. 2018 Jul 20;361(6399):290–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30026228>
181. Ercetin E, Richtmann S, Delgado BM, Gomez-Mariano G, Wrenger S, Korenbaum E, et al. Clinical Significance of SERPINA1 Gene and Its Encoded Alpha1-antitrypsin Protein in NSCLC. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2019 Sep 4;11(9):1306. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31487965>
182. Revach OY, Liu S, Jenkins RW. Targeting TANK-binding kinase 1 (TBK1) in cancer. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2020 Nov 1;24(11):1065–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32962465>
183. Jubb AM, Pham TQ, Hanby AM, Frantz GD, Peale F v, Wu TD, et al. Expression of vascular endothelial growth factor, hypoxia inducible factor 1alpha, and carbonic anhydrase IX in human tumours. *J Clin Pathol* [Internet]. 2004 May 1;57(5):504–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15113858>
184. Kenneth NS, Rocha S. Regulation of gene expression by hypoxia. *Biochem J* [Internet]. 2008 Aug 15;414(1):19–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18651837>
185. Izquierdo-Bouldstridge A, Bustillos A, Bonet-Costa C, Aribau-Miralbés P, García-Gomis D, Dabad M, et al. Histone H1 depletion triggers an interferon response in cancer cells via activation of heterochromatic repeats. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2017 Nov 16;45(20):11622–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28977426>
186. Kadota S, Nagata K. Silencing of IFN-stimulated gene transcription is regulated by histone H1 and its chaperone TAF-I. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014 Jul 8;42(12):7642–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24878923>
187. Thangavelu PU, Lin CY, Vaidyanathan S, Nguyen THM, Dray E, Duijf PHG. Overexpression of the E2F target gene CENPI promotes chromosome instability and predicts poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Sep 22;8(37):62167–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28977935>
188. Lee YC, Huang CC, Lin DY, Chang WC, Lee KH. Overexpression of centromere protein K (CENPK) in ovarian cancer is correlated with poor patient survival and associated with predictive and prognostic relevance. *PeerJ* [Internet]. 2015;3(5):e1386. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26587348>
189. Wang Q, Xu J, Xiong Z, Xu T, Liu J, Liu Y, et al. CENPA promotes clear cell renal cell carcinoma progression and metastasis via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *J Transl Med* [Internet]. 2021;19(1):417. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34627268>
190. Xie F, Yuan B, Liu J. Downregulation of CENPK suppresses lung adenocarcinoma by regulating EMT. *Archives of Medical Science*. 2021 Jun 8;

191. Ding N, Li R, Shi W, He C. CENPI is overexpressed in colorectal cancer and regulates cell migration and invasion. *Gene* [Internet]. 2018 Oct 20;674:80–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29936263>
192. Kang X, Feng Y, Gan Z, Zeng S, Guo X, Chen X, et al. NASP antagonize chromatin accessibility through maintaining histone H3K9me1 in hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* [Internet]. 2018;1864(10):3438–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30076957>
193. Li JX, Wei CY, Cao SG, Xia MW. Elevated nuclear auto-antigenic sperm protein promotes melanoma progression by inducing cell proliferation. *Onco Targets Ther* [Internet]. 2019;12:2105–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30962692>
194. Liu S, Wang Y, Miao C, Xing Q, Wang Z. High expression of CDCA7 predicts poor prognosis for clear cell renal cell carcinoma and explores its associations with immunity. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2021 Mar 1;21(1):140. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33648519>
195. Zhong H, Chen B, Neves H, Xing J, Ye Y, Lin Y, et al. Expression of minichromosome maintenance genes in renal cell carcinoma. *Cancer Manag Res* [Internet]. 2017;9:637–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29180899>
196. Gao Z, Man X, Li Z, Bi J, Liu X, Li Z, et al. PLK1 promotes proliferation and suppresses apoptosis of renal cell carcinoma cells by phosphorylating MCM3. *Cancer Gene Ther* [Internet]. 2020;27(6):412–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31186514>
197. Fei P, Yin J, Wang W. New advances in the DNA damage response network of Fanconi anemia and BRCA proteins. FAAP95 replaces BRCA2 as the true FANCB protein. *Cell Cycle* [Internet]. 2005 Jan 1;4(1):80–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15611632>
198. Mathew CG. Fanconi anaemia genes and susceptibility to cancer. *Oncogene* [Internet]. 2006 Sep 25;25(43):5875–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16998502>
199. Glaas MF, Wiek C, Wolter LM, Roellecke K, Balz V, Okpanyi V, et al. Mutational and Functional Analysis of FANCB as a Candidate Gene for Sporadic Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Anticancer Res* [Internet]. 2018;38(3):1317–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29491055>
200. Guo E, Wu C, Ming J, Zhang W, Zhang L, Hu G. The Clinical Significance of DNA Damage Repair Signatures in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Frontiers in Genetics* [Internet]. 2021 Jan 8;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2020.593039/full>
201. Jongen JMJ, van der Waals LM, Trumpi K, Laoukili J, Peters NA, Schenning-van Schelven SJ, et al. Downregulation of DNA repair proteins and increased DNA damage in hypoxic colon cancer cells is a therapeutically exploitable vulnerability. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Oct 17;8(49):86296–311. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29156796>
202. Scanlon SE, Glazer PM. Hypoxic stress facilitates acute activation and chronic downregulation of fanconi anemia proteins. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2014 Jul;12(7):1016–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24688021>

203. Peri S, Devarajan K, Yang DH, Knudson AG, Balachandran S. Meta-analysis identifies NF- $\kappa$ B as a therapeutic target in renal cancer. *PLoS One* [Internet]. 2013 Oct 7;8(10):e76746. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24116146>
204. Pariente-Pérez T, Aguilar-Alonso F, Solano JD, Vargas-Olvera C, Curiel-Muñiz P, Mendoza-Rodríguez CA, et al. Differential behavior of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  and EGFR during the renal carcinogenic process in an experimental model in vivo. *Oncol Lett* [Internet]. 2020 Apr 3;19(4):3153–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32256811>
205. Dittmer J. The role of the transcription factor Ets1 in carcinoma. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2015 Dec;35:20–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26392377>
206. Niu H, Li F, Wang Q, Ye Z, Chen Q, Lin Y. High expression level of MMP9 is associated with poor prognosis in patients with clear cell renal carcinoma. *PeerJ* [Internet]. 2018 Jul 4;6(7):e5050. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30013825>
207. Mikami S, Oya M, Mizuno R, Murai M, Mukai M, Okada Y. Expression of Ets-1 in human clear cell renal cell carcinomas: implications for angiogenesis. *Cancer Sci* [Internet]. 2006 Sep 1;97(9):875–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16856880>
208. Verschoor ML, Wilson LA, Verschoor CP, Singh G. Ets-1 regulates energy metabolism in cancer cells. *PLoS One* [Internet]. 2010 Oct 22;5(10):e13565. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21042593>
209. Harel S, Sanchez V, Moamer A, Sanchez-Galan JE, Abid Hussein MN, Mayaki D, et al. ETS1, ELK1, and ETV4 Transcription Factors Regulate Angiopoietin-1 Signaling and the Angiogenic Response in Endothelial Cells. *Front Physiol* [Internet]. 2021;12:683651. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34381375>
210. Wang R, Ma Y, Yu D, Zhao J, Ma P. miR-377 functions as a tumor suppressor in human clear cell renal cell carcinoma by targeting ETS1. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* [Internet]. 2015 Mar;70(C):64–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25776481>
211. Luo Y, Liu F, Yan C, Qu W, Zhu L, Guo Z, et al. Long Non-Coding RNA CASC19 Sponges microRNA-532 and Promotes Oncogenicity of Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Increasing ETS1 Expression. *Cancer Manag Res* [Internet]. 2020;12:2195–207. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32273759>
212. Singh AK, Swarnalatha M, Kumar V. c-ETS1 facilitates G1/S-phase transition by up-regulating cyclin E and CDK2 genes and cooperates with hepatitis B virus X protein for their deregulation. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 Jun 24;286(25):21961–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21515670>
213. Gao H, Peng C, Liang B, Shahbaz M, Liu S, Wang B, et al.  $\beta$ 6 integrin induces the expression of metalloproteinase-3 and metalloproteinase-9 in colon cancer cells via ERK-ETS1 pathway. *Cancer Lett* [Internet]. 2014 Nov 28;354(2):427–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25135220>
214. Holterman CE, Franovic A, Payette J, Lee S. ETS-1 oncogenic activity mediated by transforming growth factor alpha. *Cancer Res* [Internet]. 2010 Jan 15;70(2):730–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20068146>

215. Daniela R, Foteini M, Adriana G, Peggy K, G LR, Nadia R, et al. A CREB-C/EBP $\beta$  cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2009 Oct 13;106(41):17475–80. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.0908641106>
216. Lu J, Chen W, Liu H, Yang H, Liu T. Transcription factor CEBPB inhibits the proliferation of osteosarcoma by regulating downstream target gene CLEC5A. *J Clin Lab Anal* [Internet]. 2019 Nov;33(9):e22985. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31364785>
217. Cheng P, Chen Y, He TL, Wang C, Guo SW, Hu H, et al. Menin Coordinates C/EBP $\beta$ -Mediated TGF- $\beta$  Signaling for Epithelial-Mesenchymal Transition and Growth Inhibition in Pancreatic Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids* [Internet]. 2019 Dec 6;18:155–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31546150>
218. Shukla AA, Jain M, Chauhan SS. Ets-1/Elk-1 is a critical mediator of dipeptidyl-peptidase III transcription in human glioblastoma cells. *FEBS J* [Internet]. 2010 Apr;277(8):1861–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20236318>
219. Singh R, Sharma MC, Sarkar C, Singh M, Chauhan SS. Transcription factor C/EBP- $\beta$  mediates downregulation of dipeptidyl-peptidase III expression by interleukin-6 in human glioblastoma cells. *FEBS J* [Internet]. 2014 Mar 1;281(6):1629–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24472318>
220. Vidarsdottir L, Fernandes RV, Zachariadis V, Das I, Edsbäcker E, Sigvaldadottir I, et al. Silencing of CEBPB-AS1 modulates CEBPB expression and resensitizes BRAF-inhibitor resistant melanoma cells to vemurafenib. *Melanoma Res* [Internet]. 2020;30(5):443–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32467529>
221. Duffaud F, le Cesne A. Imatinib in the treatment of solid tumours. *Target Oncol* [Internet]. 2009 Jan;4(1):45–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19343301>
222. Gao C, Peng FH, Peng LK. MiR-200c sensitizes clear-cell renal cell carcinoma cells to sorafenib and imatinib by targeting heme oxygenase-1. *Neoplasma* [Internet]. 2014;61(6):680–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25150313>
223. Ruan K, Song G, Ouyang G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem* [Internet]. 2009 Aug 15;107(6):1053–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19479945>
224. Miar A, Arnaiz E, Bridges E, Beedie S, Cribbs AP, Downes DJ, et al. Hypoxia induces transcriptional and translational downregulation of the type I interferon (IFN) pathway in multiple cancer cell types. *bioRxiv* [Internet]. 2019 Jan 1;80(23):715151. Available from: <http://biorxiv.org/content/early/2019/07/25/715151.abstract>
225. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015 Feb;15(2):87–103. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25614319>
226. Jayaprakash P, Ai M, Liu A, Budhani P, Bartkowiak T, Sheng J, et al. Targeted hypoxia reduction restores T cell infiltration and sensitizes prostate cancer to immunotherapy. *J Clin Invest* [Internet]. 2018/10/15. 2018 Nov 1;128(11):5137–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30188869>

227. Hatfield SM, Kjaergaard J, Lukashev D, Schreiber TH, Belikoff B, Abbott R, et al. Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation. *Sci Transl Med* [Internet]. 2015 Mar 4;7(277):277ra30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25739764>
228. Yeh YH, Yang YC, Hsieh MY, Yeh YC, Li TK. A negative feedback of the HIF-1 $\alpha$  pathway via interferon-stimulated gene 15 and ISGylation. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2013 Nov 1;19(21):5927–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24056783>
229. Yang H, Li W, Lv Y, Fan Q, Mao X, Long T, et al. Exploring the mechanism of clear cell renal cell carcinoma metastasis and key genes based on multi-tool joint analysis. *Gene* [Internet]. 2019 Dec 15;720:144103. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31491435>
230. Malle E, Sodin-Semrl S, Kovacevic A. Serum amyloid A: an acute-phase protein involved in tumour pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2009 Jan;66(1):9–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18726069>
231. Uhlar CM, Grehan S, Steel DM, Steinkasserer A, Whitehead AS. Use of the acute phase serum amyloid A2 (SAA2) gene promoter in the analysis of pro- and anti-inflammatory mediators: differential kinetics of SAA2 promoter induction by IL-1 beta and TNF-alpha compared to IL-6. *J Immunol Methods* [Internet]. 1997 Apr 25;203(2):123–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9149805>
232. Kim YJ, Gallien S, El-Khoury V, Goswami P, Sertamo K, Schlessner M, et al. Quantification of SAA1 and SAA2 in lung cancer plasma using the isotype-specific PRM assays. *Proteomics* [Internet]. 2015 Sep;15(18):3116–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26177823>
233. Li S, Cheng Y, Cheng G, Xu T, Ye Y, Miu Q, et al. High SAA1 Expression Predicts Advanced Tumors in Renal Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2021 May 18;11:649761. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34084746>
234. Cooley LS, Rudewicz J, Souleyreau W, Emanuelli A, Alvarez-Arenas A, Clarke K, et al. Experimental and computational modeling for signature and biomarker discovery of renal cell carcinoma progression. *Mol Cancer* [Internet]. 2021;20(1):136. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34670568>
235. Zamora-Fuentes JM, Hernández-Lemus E, Espinal-Enríquez J. Gene Expression and Co-expression Networks Are Strongly Altered Through Stages in Clear Cell Renal Carcinoma. *Front Genet* [Internet]. 2020 Nov 3;11:578679. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33240325>
236. Bernardi R, Guernah I, Jin D, Grisendi S, Alimonti A, Teruya-Feldstein J, et al. PML inhibits HIF-1 $\alpha$  translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature* [Internet]. 2006;442(7104):779–85. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature05029>
237. Katiyar S, Liu E, Knutzen CA, Lang ES, Lombardo CR, Sankar S, et al. REDD1, an inhibitor of mTOR signalling, is regulated by the CUL4A-DDB1 ubiquitin ligase. *EMBO Rep* [Internet]. 2009/06/26. 2009 Aug;10(8):866–72. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19557001>
238. Zheng B, Mao JH, Li XQ, Qian L, Zhu H, Gu DH, et al. Over-expression of DNA-PKcs in renal cell carcinoma regulates mTORC2 activation, HIF-2 $\alpha$  expression and cell proliferation. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(1):29415. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27412013>

239. Petrella BL, Brinckerhoff CE. PTEN suppression of YY1 induces HIF-2 activity in von-Hippel-Lindau-null renal-cell carcinoma. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2009/07/30. 2009 Jul;8(14):1389–401. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19483472>
240. Zhang C, Huang D, Liu A, Xu Y, Na R, Xu D. Genome-wide screening and cohorts validation identifying novel lncRNAs as prognostic biomarkers for clear cell renal cell carcinoma. *J Cell Biochem* [Internet]. 2020 Mar 1;121(3):2559–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31646670>
241. Guo J, Chakraborty AA, Liu P, Gan W, Zheng X, Inuzuka H, et al. pVHL suppresses kinase activity of Akt in a proline-hydroxylation-dependent manner. *Science* [Internet]. 2016;353(6302):929–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27563096>
242. Bommi-Reddy A, Almeciga I, Sawyer J, Geisen C, Li W, Harlow E, et al. Kinase requirements in human cells: III. Altered kinase requirements in VHL-/- cancer cells detected in a pilot synthetic lethal screen. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008/10/23. 2008 Oct 28;105(43):16484–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18948595>
243. Pan H, Hong Y, Yu B, Li L, Zhang X. miR-4429 Inhibits Tumor Progression and Epithelial-Mesenchymal Transition Via Targeting CDK6 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm* [Internet]. 2019 Jun;34(5):334–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30844301>
244. Xu J, Pham CG, Albanese SK, Dong Y, Oyama T, Lee CH, et al. Mechanistically distinct cancer-associated mTOR activation clusters predict sensitivity to rapamycin. *J Clin Invest* [Internet]. 2016/08/02. 2016 Sep 1;126(9):3526–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27482884>
245. Xu Z, Liu M, Wang J, Liu K, Xu L, Fan D, et al. Single-cell RNA-sequencing analysis reveals MYH9 promotes renal cell carcinoma development and sunitinib resistance via AKT signaling pathway. *Cell Death Discovery* [Internet]. 2022 Dec 22;8(1):125. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41420-022-00933-6>
246. Qiu N, He Y, Zhang S, Hu X, Chen M, Li H. Cullin 7 is a predictor of poor prognosis in breast cancer patients and is involved in the proliferation and invasion of breast cancer cells by regulating the cell cycle and microtubule stability. *Oncol Rep* [Internet]. 2018 Feb 21;39(2):603–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29207184>
247. Xu J, Zhang Z, Qian M, Wang S, Qiu W, Chen Z, et al. Cullin-7 (CUL7) is overexpressed in glioma cells and promotes tumorigenesis via NF- $\kappa$ B activation. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2020 Apr 6;39(1):59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32252802>
248. Qiu N, He YF, Zhang SM, Zhan YT, Han GD, Jiang M, et al. Cullin7 enhances resistance to trastuzumab therapy in Her2 positive breast cancer via degrading IRS-1 and downregulating IGFBP-3 to activate the PI3K/AKT pathway. *Cancer Lett* [Internet]. 2019;464:25–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31461670>
249. Liu H, Ge XY, Huang N, Liu T, Yao MZ, Zhang Z, et al. Up-regulation of cullin7 promotes proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle cells in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2019 Dec 1;864:172698. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31563647>



250. Xu Z, Jia K, Wang H, Gao F, Zhao S, Li F, et al. METTL14-regulated PI3K/Akt signaling pathway via PTEN affects HDAC5-mediated epithelial-mesenchymal transition of renal tubular cells in diabetic kidney disease. *Cell Death Dis* [Internet]. 2021;12(1):32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33414476>

## 9. ANEXOS

## Anexo 1 – Carta do Comitê de Ética em Pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA  
EM PESQUISA - CEP

São Paulo, 06 de fevereiro de 2018.

À  
Dra. Glauca Hajj

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2440/17B  
"Análise do perfil de mRNAs diferencialmente traduzidos no carcinoma renal de células claras."

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **23/01/2018**, **tomaram conhecimento e aprovaram** o seguinte documento:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático intitulado "Controle Traducional no Carcinoma renal de células claras.", registrado neste CEP sob nº 2440/17. O projeto afiliado em referência será Doutorado da aluna *Julia Avian Vassalakis*, sob orientação da Dra. Glauca Hajj;
- Tese de Doutorado.

Atenciosamente,

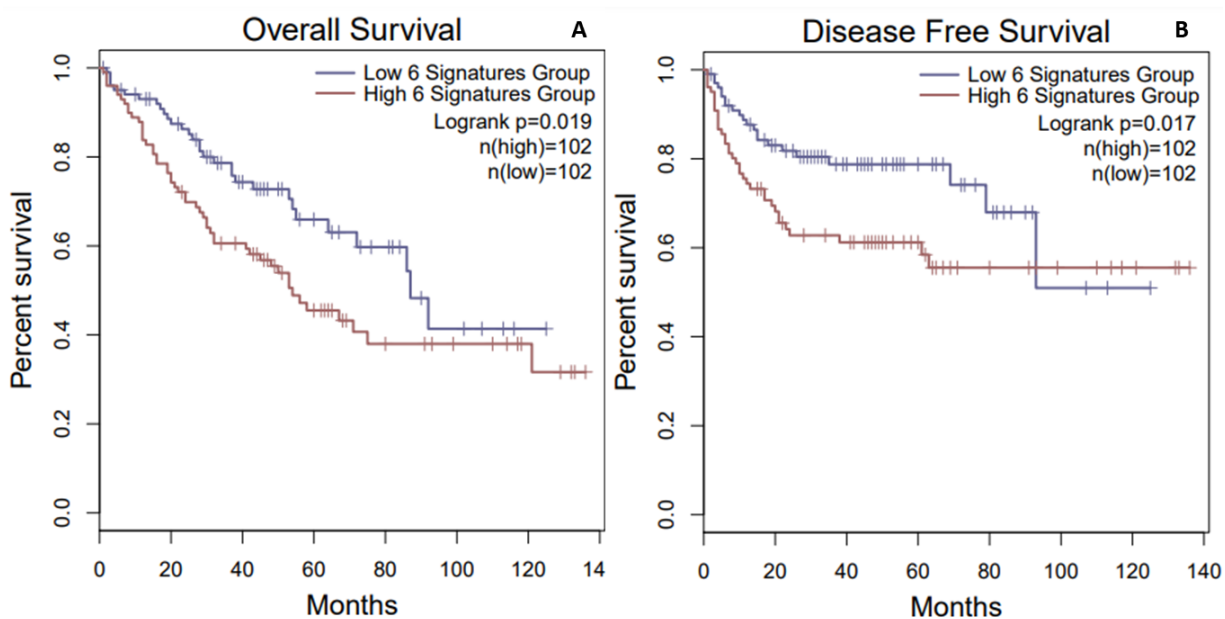
  
Dra. Sandra Caires Serrano  
2ª. Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

## 10. APÊNDICES

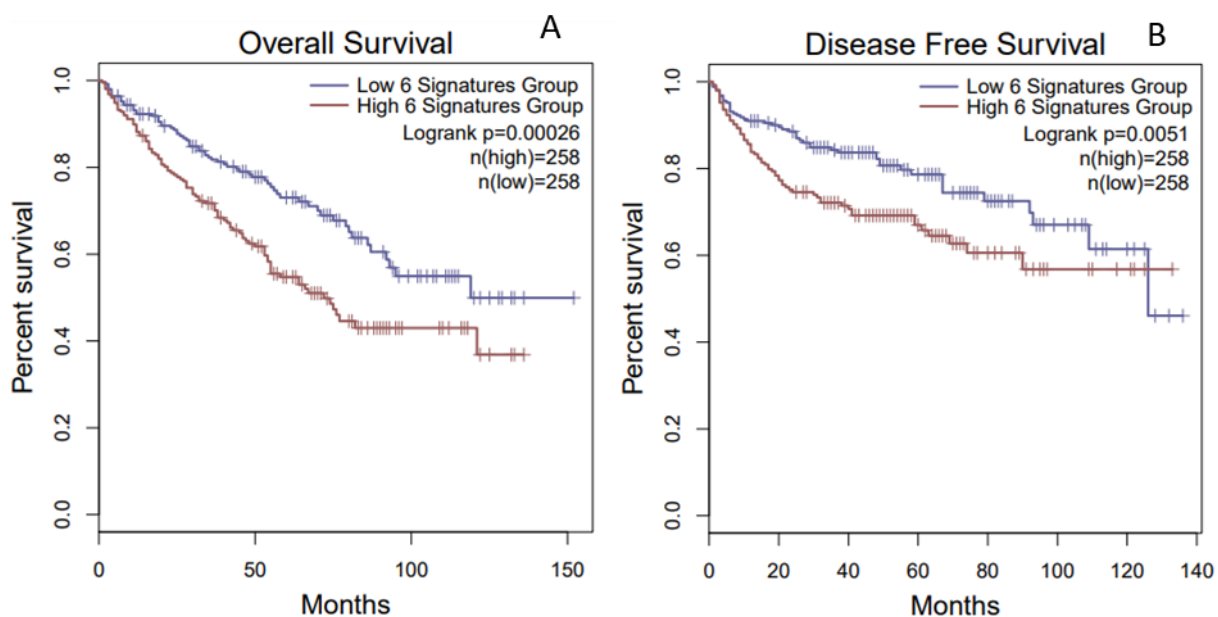
**Apêndice 1 – Teste de Tukey para comparações múltiplas do teste de ANOVA two-way da curva de crescimento das células RCC4/Mock e RCC4/VHL tratadas com rapamicina e/ou DMSO por cinco dias.**

Detalhes do teste	Diferença das médias	Desvio padrão	p-valor
<b>Dia 1</b>			
Mock controle vs. Mock +rapamicina	-0,08543	0,1429	0,9323
Mock controle vs. VHL controle	-0,4574	0,1323	<b>0,0054</b>
Mock +rapamicina vs. VHL +rapamicina	-0,234	0,1527	0,4249
VHL controle vs. VHL +rapamicina	0,1379	0,1429	0,7696
<b>Dia 2</b>			
Mock controle vs. Mock +rapamicina	0,291	0,1429	0,1861
Mock controle vs. VHL controle	-0,4261	0,1323	<b>0,0108</b>
Mock +rapamicina vs. VHL +rapamicina	-0,2101	0,1527	0,5192
VHL controle vs. VHL +rapamicina	0,507	0,1429	<b>0,0041</b>
<b>Dia 3</b>			
Mock controle vs. Mock +rapamicina	0,5963	0,1429	<b>0,0006</b>
Mock controle vs. VHL controle	-0,3128	0,1323	0,095
Mock +rapamicina vs. VHL +rapamicina	-0,2846	0,1527	0,2548
VHL controle vs. VHL +rapamicina	0,6246	0,1429	<b>0,0003</b>
<b>Dia 4</b>			
Mock controle vs. Mock +rapamicina	0,8709	0,1429	<b>&lt;0,0001</b>
Mock controle vs. VHL controle	-0,2892	0,1323	0,1386
Mock +rapamicina vs. VHL +rapamicina	-0,3209	0,1527	0,1645
VHL controle vs. VHL +rapamicina	0,8392	0,1429	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Dia 5</b>			
Mock controle vs. Mock +rapamicina	1,163	0,1429	<b>&lt;0,0001</b>
Mock controle vs. VHL controle	-0,2921	0,1323	0,1326
Mock +rapamicina vs. VHL +rapamicina	-0,4255	0,1527	<b>0,035</b>
VHL controle vs. VHL +rapamicina	1,03	0,1429	<b>&lt;0,0001</b>

Apêndice 2 – Sobrevida global (A) e Sobrevida Livre de progressão (B) de pacientes com CRCC estratificados pela alta ou baixa expressão da assinatura “montagem de cromatina”. Os gráficos foram realizados a partir de dados públicos pelo software Gepia 2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>), onde foram inseridos os genes encontrados diferencialmente expressos nas células RCC4/Mock e RCC4/VHL.



Apêndice 3 – Sobrevida global (A) e Sobrevida Livre de progressão (B) de pacientes com CRCC estratificados pela alta ou baixa expressão da assinatura “resposta inflamatória”. Os gráficos foram realizados a partir de dados públicos pelo software Gepia 2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>), onde foram inseridos os genes encontrados diferencialmente expressos nas células RCC4/Mock e RCC4/VHL.



#### Apêndice 4 – Classificação TNM da AJCC 2017

<b>T1</b>	≤ 7 cm na maior dimensão, limitado ao rim.
<b>T1a</b>	≤ 4 cm na maior dimensão, limitado ao rim.
<b>T1b</b>	> 4 cm, mas ≤ 7 cm na maior dimensão, limitado ao rim.
<b>T2</b>	≥ 7 cm na maior dimensão, limitado ao rim.
<b>T2a</b>	> 7 cm, mas ≤ 10 cm na maior dimensão, limitado ao rim.
<b>T2b</b>	> 10 cm na maior dimensão, limitado ao rim.
<b>T3</b>	O tumor se estende para as principais veias ou invade os tecidos perirrenais, mas não se estende além da fáscia de Gerota ou da glândula adrenal ipsilateral.
<b>T3a</b>	Tumor se estende para as veias renais ou seus ramos segmentares, ou tumor invade o tecido adiposo perirenal e/ou tecido adiposo do seio renal, mas não além da fáscia de Gerota
<b>T3b</b>	O tumor cresce se estende para veia cava abaixo do diafragma.
<b>T3c</b>	O tumor cresceu na parte da veia cava que está dentro do tórax ou invade a parede da veia cava
<b>T4</b>	O tumor se espalhou além da fáscia de Gerota. O tumor pode ter crescido na glândula adrenal (na parte superior do rim).
<b>NX</b>	Linfonodos não podem ser avaliados
<b>N0</b>	Nenhuma invasão linfonodal
<b>N1</b>	Invasão em 1 linfonodo regional
<b>MX</b>	Metástase não pode ser avaliada
<b>M0</b>	Ausência de metástase
<b>M1</b>	Metástase à distância

**Apêndice 5 – Estadiamento clínico da AJCC 2017**

<b>Estágio clínico</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
IV	T4	Qualquer N	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1