

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Rafaela Viviane Neves Silva

Expressão da MTHFD2 e CAIX em Carcinoma de Células Renais

Uberaba-MG

2024

Rafaela Viviane Neves Silva

Expressão da MTHFD2 e CAIX em Carcinoma de Células Renais

Dissertação apresentada à pós-graduação em Ciências da Saúde- PPGCS da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), área de concentração Patologia Investigativa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Régia Caroline Peixoto Lira Fusco

Uberaba-MG

2024

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

S583e Silva, Rafaela Viviane Neves
Expressão da MTHFD2 e CAIX em carcinoma de células renais
/ Rafaela Viviane Neves Silva. – 2024.
74 f.: il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal
do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2024
Orientadora: Dra. Régia Caroline Peixoto Lira Fusco

1. Carcinoma de células renais. 2. Anidrase carbônica IX. 3. Antígeno
CA-19-9. 4. Metilenotetra-Hidrofolato Desidrogenase (NADP). 5. Prognós-
tico. I. Fusco, Régia Caroline Peixoto Lira. II. Universidade Federal do
Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.61-006

Rafaela Viviane Neves Silva

EXPRESSÃO DA MTHFD2 E CAIX EM CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Investigativa”, (Linha de Pesquisa: Aspectos morfológicos, celulares e moleculares das doenças) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre

Uberaba, 21 de fevereiro de 2024

Banca Examinadora:

Dra. Régia Caroline Peixoto Lira Fusco – Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dra. Mariângela Ottoboni Brunaldi
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Dr. Graziella Ribeiro de Sousa
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Dedico à minha família, em especial minha mãe Viviane, meu pai Kleber, meus irmãos Lucas e Matheus que são minha base e estão sempre me apoiando.

AGRADECIMENTOS

Acredito que o que importa na vida não seja o ponto de onde partimos, mas sim a caminhada e quem percorre ela conosco. Portanto, eu queria agradecer primeiro à Deus, por me manter sempre de pé, guiando meus caminhos, apesar de todas as adversidades.

Agradecer aos meus pais. À minha mãe que sempre esteve comigo me motivando nessa etapa da minha vida, que vibra e torce em todas minhas vitórias. E, que sempre deu sua vida por mim e me fez quem sou hoje. Obrigada por sempre ter acreditado em mim, quando eu mesma não conseguia esse feito. Ao meu pai que sempre me impulsionou e encorajou a enxergar mais longe. Que me ensinou muito sobre a vida e os obstáculos que existem nela. E nunca me deixou desistir, sempre ficando ao meu lado, dando o apoio que eu precisava. E faz parte do que sou hoje. Obrigada por tudo.

Aos meus queridos irmãos, Lucas e Matheus, que nunca se deixam abalar pelas voltas da vida e sempre encontram uma outra maneira para tocar a vida de cabeça erguida. Me orgulho muito de vocês e me espelho sempre a isso. E à minha sobrinha Thayla, que sempre está ao meu lado e me inspira a ser uma pessoa melhor. Ao Victor Augusto, por todo apoio, compreensão, ensinamentos carinho e ajuda. Aos meus amigos e ao meu grupo de pesquisa que fizeram essa caminhada ser mais leve. Foi de extrema importância o apoio de vocês.

Em especial agradeço a minha orientadora Dra. Régia Lira, por quem tenho muita admiração, por todo carinho, apoio e ensinamentos recebido.

Aos professores e amigos da disciplina de patologia geral pelo convívio e troca de experiência.

Aos colaboradores deste trabalho.

Aos funcionários da pós-graduação pela prontidão sempre.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a todos os professores, técnicos e servidores da faculdade, principalmente a Dra. Adilha, Dra. Liliane e Dra. Crislaine por toda ajuda técnica e aconselhamento.

“Tente mover o mundo - o primeiro passo será mover a si mesmo.”

Platão

APOIO FINANCEIRO

A realização deste trabalho obteve apoio financeiro das seguintes instituições: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

Introdução: O carcinoma de células renais (CCR) é a neoplasia mais comum nos rins. Devido seu carácter assintomático, um terço dos casos é diagnosticado em estágios avançados. Apesar de não haver marcadores prognósticos utilizados na prática diagnóstica, a anidrase carbônica IX (CA9 para o gene e CAIX para proteína) e a MTHFD2 vêm sendo apontadas como potenciais indicadores de progressão tumoral e sobrevida respectivamente. Porém o papel de ambas no CCR ainda necessita ser esclarecido. Este estudo teve como objetivo investigar a expressão da anidrase carbônica 9 e MTHFD2 de acordo com fatores prognósticos e de agressividade tumoral em CCR. **Metodologia:** A expressão gênica foi avaliada em relação às características patológicas e sobrevida de pacientes, utilizando a plataforma KM-Plotter. Foram utilizados dois bancos de dados com amostras de tumores, tecidos não neoplásicos (NN) e metástases. A expressão proteica das enzimas foi investigada em uma coorte de CCR do HC-UFTM, através de imuno-histoquímica, estabelecendo associações com o prognóstico, dados clínicos, epidemiológicos e histopatológicos. **Resultados:** A expressão gênica da CA9 revelou maiores níveis em tecidos tumorais e com metástases do que em tecido NN, sendo que os subtipos histológicos Células Claras (CCRcc) e Papilífero (CCRp) apresentam níveis mais elevados do que o tecido NN. A baixa expressão de CA9 teve associação com menor sobrevida global nos casos de CCRcc e com maior sobrevida na coorte de CCRp. A marcação proteica de CAIX foi positiva em todos os casos, tendo maior expressão no grau de Fuhrman 4 e em pacientes submetidos à nefrectomia radical. Pacientes com expressão moderada de CAIX tiveram menor sobrevida comparados ao grupo com expressão forte (diferença não significativa). De maneira semelhante, MTHFD2 revelou maior expressão em tumores e amostras metastáticas, com padrões de expressão gênica distintos de acordo com o tipo histológico, comparados ao grupo NN. A expressão elevada de mostrou associação com menor sobrevida global para CCRcc e CCRp, e menor sobrevivência livre de recorrência para CCRp. A expressão proteica de MTHFD2 variou entre os subtipos histológicos, sendo mais baixa no CCRcc comparado ao CCRp e CCRcr. Houve associação entre alta expressão de MTHFD2, tumores acima de 7cm e graus de Fuhrman elevados. Embora sem significância estatística, pacientes com alta expressão tenderam a ter menor sobrevida global. **Conclusões:** A expressão gênica de ambas as enzimas foi elevada no CCR e em amostras metastáticas, mostrando potencial valor prognóstico para os subtipos CCRcc e CCRp. Enquanto a expressão proteica da CAIX demonstrou menos associações com parâmetros de agressividade tumoral, o padrão de MTHFD2 na imunomarcção foi mais relevante, sugerindo progressão tumoral (grau de Fuhrman elevado, tumores maiores), mesmo com variabilidade de expressão entre os tipos histológicos do tumor.

O valor prognóstico de ambos os marcadores, por análise da imunomarcação, não foi confirmado. Portanto, são necessárias investigações em coortes maiores para confirmar as evidências observadas pelas curvas de sobrevida global.

Palavras chaves: MTHFD2. CAIX. CA9. Prognóstico. Carcinoma de células renais.

ABSTRACT

Introduction: Renal cell carcinoma (RCC) is the most common neoplasm in the kidneys. Due to its asymptomatic nature, one third of cases are diagnosed in advanced stages. Although there are no prognostic markers used in diagnostic practice, carbonic anhydrase IX (CA9 for the gene and CAIX for the protein) and MTHFD2 have been identified as potential indicators of tumor progression and survival respectively. However, the role of both in RCC still needs to be clarified. This study aimed to investigate the expression of carbonic anhydrase 9 and MTHFD2 according to prognostic factors and tumor aggressiveness in RCC. **Methodology:** Gene expression was assessed in relation to pathological characteristics and patient survival using the KM-Plotter platform. Two databases were used with samples of tumors, non-neoplastic tissues (NN) and metastases. The protein expression of the enzymes was investigated in a RCC cohort from HC-UFTM using immunohistochemistry, establishing associations with prognosis, clinical, epidemiological and histopathological data. **Results:** CA9 gene expression revealed higher levels in tumour tissue and tissue with metastases than in NN tissue, with the histological subtypes Clear Cell (ccRCC) and Papillary (pRCC) showing higher levels than NN tissue. Low CA9 expression was associated with lower overall survival in ccRCC cases and higher survival in the pRCC cohort. CAIX protein labelling was positive in all cases, with greater expression in Fuhrman grade 4 and in patients undergoing radical nephrectomy. Patients with moderate CAIX expression had lower survival compared to the group with strong expression (non-significant difference). Similarly, MTHFD2 showed higher expression in tumors and metastatic samples, with distinct gene expression patterns according to histological type, compared to the NN group. High MTHFD2 expression was associated with lower overall survival for ccRCC and pRCC, and lower recurrence-free survival for pRCC. MTHFD2 protein expression varied between histological subtypes, being lower in ccRCC compared to pRCC and ccRCC. There was an association between high MTHFD2 expression, tumors larger than 7cm and high Fuhrman grades. Although not statistically significant, patients with high expression tended to have lower overall survival. **Conclusions:** Gene expression of both enzymes was high in RCC and in metastatic samples, showing potential prognostic value for the CCRcc and CCRp subtypes. While CAIX protein expression showed fewer associations with tumor aggressiveness parameters, the MTHFD2 pattern in immunolabelling was more relevant, suggesting tumor progression (high Fuhrman grade, larger tumors), even with variability in expression between tumor histological types. The prognostic value of both markers, by

analysing immunolabelling, has not been confirmed. Therefore, investigations in larger cohorts are needed to confirm the evidence observed by the overall survival curves

Key words: MTHFD2. CAIX. CA9. Prognostic. Renal Cell Carcinoma.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Características morfológicas dos três principais subtipos histológicos do carcinoma de células renais. A) Carcinoma de células claras; B) Carcinoma papilar; C) Carcinoma cromóforo. Modificado de (INAMURA, 2017).25
- Figura 2** - Relação da expressão da CAIX e a proteína Von Hippel Lindau (pVHL). A expressão da CAIX está intimamente ligada à proteína Von Hippel Lindau (pVHL). No rim em condições normais, o fator induzível por hipóxia- 1α (HIF- 1α) é hidroxilado por proteínas (prolil hidroxilase) e então ligado ao pVHL, catalisando a poliubiquitilação do HIF- 1α prolil hidroxilado para subsequente degradação. No CCRcc, não acontece essa ligação do HIF- 1α ao pVHL devido à ausência dessa proteína neste subtipo, dessa forma não há degradação e mimetização de condições hipóxicas. Esse HIF- 1α vai ligar-se ao HIF- 1β formando o fator de transcrição HIF-1, que se liga a elementos responsivos à hipóxia localizados em vários genes induzíveis por hipóxia, como a CAIX que é expressa na superfície da célula tumoral. Além disso, o HIF-1 se liga também a fatores pró-angiogênicos (VEGF e PDGF). Adaptado de (STILLEBROER et al., 2010).27
- Figura 3** - A anidrase carbônica IX (CAIX/CA9) e a regulação do pH. A anidrase carbônica IX (CAIX/CA9) correlaciona o metabolismo energético do tumor à regulação do seu pH. 1- O CO_2 se difunde pela bicamada lipídica da membrana celular passando para o espaço extracelular de acordo com o gradiente de concentração; 2- Na superfície extracelular da membrana celular, o domínio catalítico da CAIX catalisa a hidratação de CO_2 formando H^+ e HCO_3^- , sendo uma reação importante para regular o Ph e transporte de CO_2 , facilitando a sobrevivência das células tumorais. 3- De forma simultânea, o lactato (produto final da glicólise), sai da célula através do transportador de monocarboxilato (MCT) devido ao gradiente de pH. Adaptado de (LEE; GRIFFITHS, 2020).28
- Figura 4** - Atuação da MTHFD2 no ciclo do carbono-1 mediado por folato. Trata-se de uma enzima mitocondrial que participa da geração de NADPH catalisando a conversão de 5,10-metileno-THF à 10-formil-THF. Fonte: Elaboração da autora, 2023. 32
- Figura 5** - Técnica de *tissue microarray*. 1) Demonstração da funcionalidade do tissue microarray. Para realização desta técnica necessita-se de diferentes blocos doadores de onde serão coletadas as áreas de interesse e inoculadas em um novo bloco denominado receptor. O bloco receptor passa a apresentar várias amostras o que permite a análise de vários casos em uma mesma lâmina. Imagem disponível em <http://www.abnova.com/products/Antibody-for->

Tissue-Microarray-M0000.html. 2) Representação do molde desenvolvido no coreldraw para padronização da localização dos pinos do TMA. Dimensões utilizadas: pinos de 2mm e espaçamento entre estes de 2mm. 3) Etapas da confecção dos *Tissue microarray* (TMA). 3A) Blocos doadores com suas respectivas lâminas com demarcação das áreas de tumores para coleta. 3B) Coleta dos pinos onde é utilizado extrator do tipo *punch* e pinça para colocar esses pinos em seu correto local no molde. 3C) Molde utilizado e demarcação deste em fita de dupla face sobre a bancada. 3D) Pinos colocados em seus locais corretos. 3E) Molde para confecção do bloco de parafina. 3F) Parafina líquida para emblocamento. 3G) Inclusão dos pinos em parafina líquida. 3H) Bloco de TMA pronto.39

Figura 6 - Sobrevida geral dos pacientes de acordo com parâmetros clínicos, epidemiológicos e histopatológicos. A) Curva de sobrevida da tríade de sintomas. B) Curva de sobrevida de lateralidade. C) Curva de sobrevida de acordo com o diâmetro do tumor. D) Curva de sobrevida de acordo com tamanho do tumor. E) Curva de sobrevida sobre acometimento dos linfonodos. F) Curva de sobrevida de acordo com estadiamento. G) Curva de sobrevida da metástase a distância. H) Curva de sobrevida do grau de Fuhrman. I) Curva de sobrevida da necrose tumoral. J) Curva de sobrevida da invasão angiolímfática. K) Curva de sobrevida do tratamento. L) Curva de sobrevida de acordo com tipo de cirurgia. Teste estatístico: Log-rank. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.45

Figura 7 - Expressão gênica de CA9 em amostras tumorais, não neoplásicas e metastáticas. A) Comparação entre tecido não neoplásico (Normal), Tumor e tecido Metastático. Foi observada maior expressão no Tumor, seguido pelas amostras com metástase. B) Comparação entre o subtipo histológico CCRcc e tecido Normal, revelando expressão elevada nos tumores. C) Maior expressão no tumor subtipo CCRp em relação aos tecidos não neoplásicos. D) CCRcr expressa menos CA9 em comparação com os tecidos não neoplásicos. FC: Fold-change. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.46

Figura 8 - Curvas de sobrevida de acordo com a expressão do gene CA9 nos subtipos células claras e papilar. A) Sobrevida global (SG) no subtipo CCRcc, revelando associação entre baixa expressão de CA9 e menor sobrevida. B) Sobrevida livre de recorrência (SLR) no subtipo CCRcc, indicando a ausência de diferenças significativas. C) Alta expressão de CA9 associada a menor sobrevida global no subtipo CCRp. D) Sobrevida livre de recorrência no subtipo CCRp sem associação com a expressão de CA9. HR: hazard ratio. SG: Sobrevida global. SLR: Sobrevida livre de recorrência. Teste estatístico: Log-rank. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.47

Figura 9 - Variação da expressão proteica de CAIX nos principais subtipos tumorais. A) Intensidade fraca com imagem representativa do subtipo CCRcc B) Intensidade moderada, imagem representativa do CCRcr. C) Intensidade forte sendo imagem representativa do CCRp. D)As intensidades variaram conforme os subtipos histológicos, com CCRcc e CCRp apresentando intensidades mais elevadas do que o CCRcr, mas sem significância. E) Variação do perfil de expressão da enzima entre os subtipos, sendo mais expresso no CCRcc, seguido pelo CCRp, sem significância. Teste estatístico: Kruskal-Wallis. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.48

Figura 10 - Expressão proteica de CAIX associação de acordo com Grau de Fuhrman e tipo de tratamento cirúrgico. A) Associação significativa com grau de Fuhrman, sendo mais expressa nos graus 2 e 4. B) Associação da expressão com o tipo de cirurgia havendo mais expressão no tipo radical. Teste estatístico: Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.49

Figura 11 - Curvas de sobrevida de acordo com a expressão proteica de CAIX nos principais tipos histológicos de CCR. A) Curva de sobrevida do CCR, mostrando um perfil onde a moderada expressão associou a menor sobrevida, mas sem significância. B) Curva de sobrevida do CCRcc com perfil de moderada expressão associado a menor sobrevida, sem significância. C) Curva de sobrevida do CCRp mostrando que casos com moderada expressão tiveram pior prognóstico, mas sem significância. D)Curva de sobrevida do CCRcr. Teste estatístico: Log-rank. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.50

Figura 12 - Expressão do gene MTHFD2 em amostras tumorais, não neoplásicas e metastáticas. A) Comparação da expressão do mRNA do MTHFD2 entre amostras tumorais e não neoplásicas, evidenciando uma expressão significativamente superior em amostras tumorais, com um aumento ainda mais acentuado em amostras metastáticas. B-D) Comparação da expressão gênica do MTHFD2 entre subtipos histológicos do CCR e tecidos não neoplásicos. O subtipo CCRcc demonstrou a mais alta expressão, em contraste, o CCRp exibiu níveis opostos, e o CCRcr manteve-se semelhante ao tecido não neoplásico. O subtipo CCRcc foi identificado com os níveis mais elevados de expressão de MTHFD2. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.52

Figura 13 - Sobrevida de pacientes com CCRcc e CCRp de acordo com a expressão do gene MTHFD2. A - C) Associação da expressão elevada de MTHFD2 com menor sobrevivência global nos subtipos CCRcc e CCRp. B) Ausência de associação entre o perfil de MTHFD2 e a sobrevivência livre de recorrência em pacientes com CCRcc. (D) Associação da alta expressão

de MTHFD2 com menor tempo de recorrência na coorte de CCRp. HR: hazard ratio. SG: Sobrevida global. SLR: Sobrevida livre de recorrência. Teste estatístico: Log-rank. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.53

Figura 14 - Expressão proteica de MTHFD2 avaliada por imuno-histoquímica nos diferentes tipos histológicos de CCR. A) Intensidade fraca com imagem representativa do subtipo CCRcc. B) Intensidade forte com imagem representativa do subtipo CCRp. C) Intensidade moderada com imagem representativa do subtipo CCRcr. D) Variação da intensidade da imunomarcção entre os subtipos de CCR. CCRp e CCRcr apresentaram intensidades mais elevadas. E) Comparação dos escores de imunomarcção entre os subtipos de CCR. Observa-se uma expressão significativamente menor de MTHFD2 no CCRcc em comparação com o CCRp e CCRcr. Teste estatístico: Kruskal-Wallis. Fonte: Elaborada pela autora, 2023..... 54

Figura 15 - Expressão proteica de MTHFD2 de acordo com Grau de Fuhrman em Carcinoma de Células Renais. A) Aumento do escore de imunomarcção conforme os graus de Fuhrman, com maior expressão nos tumores de 3 e 4. B) Diferenças significativas nos escores entre os graus 1 e 3. C) Associação entre a expressão de MTHFD2 e o grau de Fuhrman no subtipo células claras, com aumento do escore nos tumores de grau mais avançado (3 e 4) em relação aos graus iniciais. D) Diferença significativa nos escores entre os graus 1 e 3. Testes estatísticos: Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Fonte: Elaborada pela autora, 2023. 56

Figura 16 - Sobrevida dos pacientes como CCR de acordo com o padrão de expressão proteica de MTHFD2. A) Curva de sobrevida do CCR. B) Curva de sobrevida do CCRcc. C) Curva de sobrevida do CCRp mostrando que casos com alta expressão tiveram pior prognóstico, mas sem significância. D) Curva de sobrevida do CCRcr. Teste Estatístico: Log Rank. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estadiamento TNM de acordo com AJCC.23
Tabela 2 - Classificação em quatro estadios.....24
Tabela 3 - Gradação nuclear de Fuhrman.....24
Tabela 4 - Características clínico, epidemiológicos e histopatológicas (n=131)42

LISTA DE ABREVIATURAS

α -KG: alfa-cetoglutarato;

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*;

ALDH1L1: Aldeído desidrogenase 1;

ALDH1L2: Aldeído desidrogenase 2;

CAT: catalase;

CAIX: Anidrase carbônica IX;

CA9: Anidrase carbônica 9;

CCR: Carcinoma de células renais;

CCRcc: Carcinoma de células renais tipo células claras;

CCRp: Carcinoma de células renais tipo papilar;

CCRcr: Carcinoma de células renais tipo cromóforo;

D-2HG: D-2-hidroxiglutarato;

DHF: Dihidrofolato;

DHFR: Dihidrofolato redutase;

EROs: espécies reativas de oxigênio;

GDH1: glutamato desidrogenase 1;

GDH2: glutamato desidrogenase 2;

GR: glutatona redutase;

GSH: glutatona;

HIF-1: fator induzível por hipóxia;

IDH1: isocitrato desidrogenase 1;

IDH2: isocitrato desidrogenase 2;

MEs: Enzimas málicas;

mNADK: NAD Kinase mitocondrial;

MTHFD1: metilenotetrahidrofolato desidrogenase, ciclohidrolase e formiltetrahidrofolato sintetase 1;

MTHFD2: metilenotetrahidrofolato desidrogenase 2;

MTHFD2L: metilenotetrahidrofolato desidrogenase 2 like;

NAD: dinucleotídeo de nicotinamina e adenina;

NADK: NAD Kinase;

NADP: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina;

Lista de abreviaturas

NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina;

NN: Não-neoplásico;

NNT: Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase;

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas;

PGD: fosfogluconato desidrogenase;

RNAi: RNA de interferência;

RTK: receptor tirosina quinase;

SHMTs: serina hidroximetil transferases;

SLR: sobrevida livre de recorrências;

SG: sobrevida global;

SOD: superóxido dismutases;

TCA: ácido tricarbóxico;

THF: tetraidrofolato;

TRX: tioredoxina;

UICC: *Union for International Cancer Control*;

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular;

VHL: *Von Hippel Lindau*;

XOR: xantina oxidoreductase;

LISTA DE ANEXOS

Anexo I- Protocolo de imuno-histoquímica CAIX..... 73
Anexo II- Protocolo de imuno-histoquímica MTHFD2 74
Anexo III- Confeção dos *tissues microarrays*- TMA 75
Anexo IV- Manuscrito e comprovação de envio a revista indexada..... **Erro! Indicador não definido.**

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	CÂNCER RENAL	21
1.2	ALTERAÇÕES METABÓLICAS DO CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIAS	25
1.2.1	Anidrase carbônica IX – CA9/CAIX	27
1.2.2	Estresse oxidativo e Metabolismo do carbono-1	29
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	34
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	METODOLOGIA	36
4.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO	36
4.2	SELEÇÃO DE CASOS	36
4.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	36
4.4	COLETA DE DADOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS	36
4.5	REVISÃO HISTOPATOLÓGICA DOS CASOS SELECIONADOS	37
4.6	CONFECÇÃO DOS <i>TISSUE MICROARRAYS</i> (TMAS)	37
4.4	IMUNO-HISTOQUÍMICA	39
4.4.1	Imunomarcção de MTHFD2 e CAIX	40
4.5	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA <i>IN SÍLICO</i>	41
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5	RESULTADOS	42
5.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, EPIDEMIOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS DOS CASOS DE CCR	42
5.2	EXPRESSÃO DE CA9/CAIX EM CCR	46
5.3	EXPRESSÃO DE MTHFD2 NO CCR	51
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXOS	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER RENAL

As neoplasias renais representam um grupo de tumores heterogêneos, com diferentes conjuntos de anormalidades genéticas e epigenéticas. Podem existir neoplasias de caráter benigno como: Adenoma, Angiomiolipoma, Oncocitoma, Fibroma da medular e Tumor de células justaglomerulares. Os tumores com caráter maligno, incluem: nefroblastoma, Linfomas, sarcomas, metástases e carcinoma de células renais (LIRA et al., 2022; RASMUSSEN, 2013). Dentre os diferentes tipos de neoplasias, o carcinoma de células renais (CCR) é o mais comum, representando cerca de 90% dos tumores renais e 2% de todas as doenças malignas que ocorrem em adultos (RASMUSSEN, 2013). O câncer de rim acomete duas vezes mais homens do que mulheres, principalmente, em pessoas acima de 65 anos. Raramente, observa-se seu desenvolvimento antes dos 40 anos de idade (CORGNA et al., 2007). A incidência do CCR tem aumentado em todo o mundo e a estimativa é de que o número de casos cresça de forma significativa em países como Brasil, Equador e Colômbia. Por outro lado, a taxa de mortalidade tem se mostrado estável ou em declínio, na maioria dos países devido a inclusão de terapias-alvo (CORGNA et al., 2007; HUMPHREY et al., 2016). De maneira contrária, observou-se aumento da taxa de mortalidade no Brasil, Croácia, Grécia, Irlanda e Portugal. O motivo ainda é incerto, mas acredita-se que este aumento esteja relacionado às diferenças étnicas, diagnóstico tardio e acesso limitado a terapias-alvo (HUMPHREY et al., 2016).

Diferentes fatores de risco para o desenvolvimento do CCR têm sido estudados, alguns podem ser mudados, o que gera oportunidades para prevenção. Estes fatores foram categorizados como (1) fatores de risco do estilo de vida: o tabagismo, que é responsável por aumentar em até duas vezes o risco de desenvolvimento do CCR, o excesso de peso corporal, consumo de álcool, sedentarismo e a dieta alimentar pobre em vegetais; (2) histórico médico do paciente: hipertensão arterial sistêmica, doenças renais crônicas, cálculos renais e *Diabetes mellitus*; (3) exposições ambientais e ocupacionais: exposição ao aço, ferro, tricloroetileno e ácido aristolóquico; (4) fatores genéticos: estão associados com as formas hereditárias do CCR, que são mais raras e acometem jovens com Síndromes, sendo as mais importantes a Síndrome de *von Hippel Lindau* e a de *Birth-Hogg-Dube* (CORGNA et al., 2007; SAFIRI et al., 2020).

A carcinogênese renal pode ter um progresso silencioso, 30% dos pacientes apresentam doença metastática no momento do diagnóstico, enquanto 30% dos pacientes com doença localizada desenvolvem metástase com o tempo. Os sítios de metástases são mais frequentes no pulmão e nos ossos (CORGNA et al., 2007). A sobrevida em cinco anos varia de acordo

com o estágio em que o tumor é diagnosticado, sendo de apenas 12% para pacientes portadores de lesões com metástases à distância e de 80% para aqueles com malignidades localizadas (RASMUSSEN, 2013). Dentre as opções de tratamento, a nefrectomia é a intervenção padrão-ouro e, para maioria dos casos, determina um bom prognóstico da doença (TOMITA, 2006). Quando possível, indica-se a nefrectomia parcial ou poupadora de néfrons para tumores menores que 7cm e localizados em um dos polos renais. Já em pacientes estadio II e III ou, quando não é possível realizar a nefrectomia parcial, é indicada nefrectomia total ou radical (LIRA et al, 2022). A quimioterapia e radioterapia não apresentam efeito prático, já a terapia-alvo antiangiogênica (ex.:sunitinibe, pazopanibe e sorafenibe) pode apresentar benefícios de sobrevivência em pacientes selecionados (FUKUMURA et al., 2018; MANINI; LÓPEZ, 2020).

A *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e a *Union for International Cancer Control* (UICC) utilizam o sistema de classificação denominado TNM como ferramenta para realização do estadiamento patológico das neoplasias renais com base em critérios descritos na Tabela 1. Nesta classificação, descreve-se na letra T aspectos do tumor primário, como tamanho, localização, crescimento e invasão de tecidos adjacentes. Essa categoria pode receber tanto letra quanto número: Tx é utilizado quando não se tem informação sobre o tumor primário ou quando este não pode ser medido, T0 quando o tumor é *in situ*; e quando se adiciona número (T1, T2, T3 ou T4) diz respeito ao tamanho do tumor e sua propagação para estruturas próximas. O acometimento de gânglios linfáticos próximos ao tumor primário é analisado com a letra N, que também pode receber letras e número: Nx informa que não há informações sobre os gânglios linfáticos ou estes não podem ser avaliados, N0 significa acometimento e N numérico (N1, N2, N3) descreve o tamanho, a localização e/ou número de linfonodos afetados pelo câncer. Por fim, para presença de metástase (M) em sítios distantes, utiliza-se M0 para ausência e M1 para presença de disseminação (AJCC, 2017).

Tabela 1 - Estadiamento TNM de acordo com AJCC.

Sistema de estadiamento TNM			
Tumor Primário (T)		Linfonodos regionais (N)	
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado.	Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
T0	Sem evidências de tumor.	N0	Ausência de metástase em linfonodos.
T1	≤ 7cm, limitado ao rim.	N1	Presença de metástase em linfonodos regionais.
T1a	Tumor <4 cm, limitado ao rim.	Metástase à distância (M)	
T1b	Tumor >4 cm, mas <7cm, limitado ao rim.	M0	Ausência de metástase.
T2	≥ 7cm, limitado ao rim.	M1	Presença de metástase a distância.
T2a	Tumor > 7cm, mas <10cm, limitado ao rim.		
T2b	Tumor >10 cm, limitado ao rim.		
T3	Invasão de vasos renais ou tecidos perirrenais.		
T3a	Tumor se estende para veia renal ou seus segmentos. Ou, invade sistema pélvico-alical ou gordura perirrenal e/ou seio renal, mas não além da fáscia de Gerota.		
T3b	Tumor se estende para veia cava abaixo do diafragma		
T3c	Tumor se estende para veia cava acima do diafragma ou invade parede da veia cava.		
T4	Invasão da fáscia de Gerota e adrenal.		

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

A partir do TNM é feito o estadiamento do tumor baseado em quatro estádios como descritos na Tabela 2, que diz respeito ao curso agressivo do carcinoma renal. Além disso, o prognóstico da doença pode ser avaliado por outros fatores histopatológicos, dentre estes está a graduação de Fuhrman, que foi publicada em 1982 e desde então é amplamente utilizada. Trata-se de um sistema de quatro níveis com base no tamanho, forma nuclear e proeminência nucleolar, como demonstrado na Tabela 3. Esse sistema passou por reclassificação, conhecida como grau WHO/ISUP, sendo validado apenas para CCRcc e CCRp, uma vez que no CCRcr não mostrou utilidade. Este considera a proeminência nucleolar no grau 1, 2 e 3. E, no grau 4 se baseia na presença de um acentuado pleomorfismo nuclear, que pode ter presença de células tumorais gigantes ou com diferenciação sarcomatóide e/ou rabdoide (AJCC, 2017). O grau nuclear como fator prognóstico para o CCR é de extrema importância, no trabalho original de Fuhrman foi relatado sobrevida em 5 anos de 64% para o grau 1, 34% para o grau 2, 31% para

o grau 3 e de 10% para o grau 4 (RODRÍGUEZ JASSO; SERRANO BRAMBILA; MALDONADO ALCARAZ, 2008).

Tabela 2 - Classificação em quatro estadios.

AgrupamentoTNM			
Estadio	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1/T2	N1	M0
	T3	N0/N1	M0
IV	T4	Qualquer	M0
	Qualquer	Qualquer	M1

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Tabela 3 - Graduação nuclear de Fuhrman.

Grau de Fuhrman	Definição
G1	Nucléolos ausentes ou inconspícuos e basofílicos em ampliação de 400x.
G2	Nucléolos conspícuos e eosinofílicos no aumento de 400x. Visível, mas não proeminente na ampliação de 100x.
G3	Nucléolos conspícuos e eosinofílicos no aumento de 100x.
G4	Pleomorfismo nuclear marcado e/ou gigante multinucleado células e/ou diferenciação rabdoide e/ou sarcomatóide.

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Além do estadiamento, o diagnóstico patológico do CCR inclui a determinação das variantes histológicas. As características morfológicas dos três principais tipos estão demonstradas na Figura 1. O carcinoma de células claras (CCRcc) corresponde a cerca de 75% dos casos, é um tumor com células de coloração mais clara devido ao acúmulo de glicogênio e lipídeos e estroma muito vascularizado (MOCH, 2013; RASMUSSEN, 2013; OMS, 2016; INAMURA, 2017). O subtipo CCRcc possui como marca registrada a inativação da função do gene supressor de tumor *von Hippel-Lindau (VHL)*, localizado no 3p21. O *VHL* pode ser bialelicamente inativado por mutação, deleção homozigótica ou metilação em até 90% dos CCRcc. A inativação do *VHL* afeta o sistema regulatório importante para adaptação das células cancerígenas à baixa pressão de oxigênio (hipóxia) (LINDGREN; SJÖLUND; AXELSON, 2018).

Os carcinomas papilares (CCRp), tipos 1 (basofílico) ou 2 (eosinofílico) correspondem a 15% dos casos, apresentam células organizadas em papilas e formadas por núcleos fibrovasculares, agregados de macrófagos espumosos e necrose frequente (HUMPHREY et al.,

2016; INAMURA, 2017; MOCH, 2013; RASMUSSEN, 2013). O tipo 1 geralmente é menos agressivo, apresentam aumento da sinalização do receptor tirosina quinase (RTK) e alterações do gene MET são detectadas em 80% dos casos. O tipo 2 é mais agressivo e apresenta ativação aumentada da via NRF2-ARE, que atua na desintoxicação e erradicação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, esse subgrupo inclui tumores com mutações em componentes do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (LINDGREN; SJÖLUND; AXELSON, 2018).

O carcinoma cromóforo (CCRcr) representa apenas 5% dos casos, possui o melhor prognóstico e apresenta mistura de células grandes, poligonais, eosinofílicas, de cor clara, com citoplasmas volumosos e bordas bem definidas (MOCH, 2013; RASMUSSEN, 2013; OMS, 2016; INAMURA, 2017). Molecularmente, observa-se baixo número de mutações somáticas. Todavia, a hipodiploidia é comum, e 80% dos tumores apresentam perdas de diferentes cromossomos. Mutações no gene *TP53* e alterações nos genes da via mTOR são observados em cerca de metade dos casos de CCRcr. Esses tumores apresentam aumento nos níveis de DNA mitocondrial, superexpressão de genes que codificam componentes do ciclo TCA e proteínas da cadeia respiratória, além de frequentes mutações em genes mitocondriais, como do complexo I NADH desidrogenase subunidade 5 (*MT-ND5*) (LINDGREN; SJÖLUND; AXELSON, 2018).

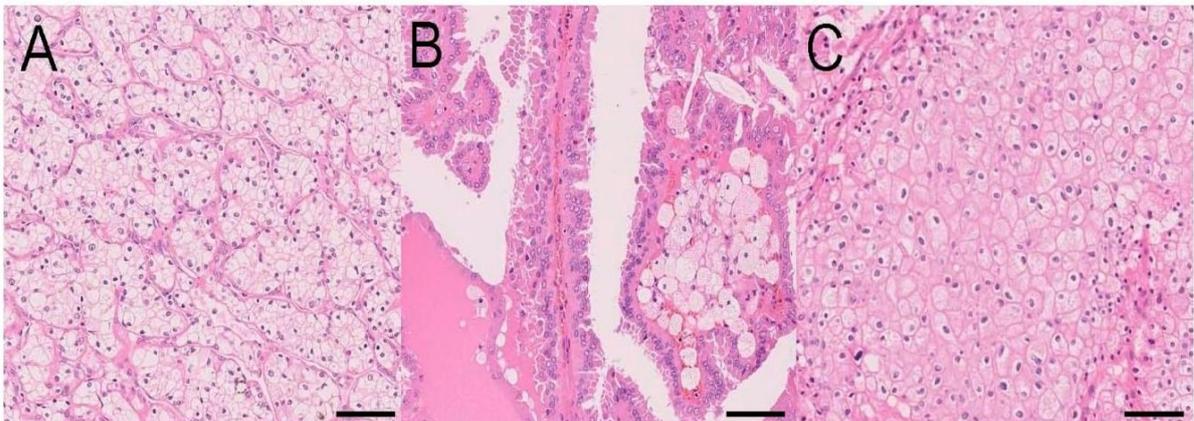


Figura 1 - Características morfológicas dos três principais subtipos histológicos do carcinoma de células renais. A) Carcinoma de células claras; B) Carcinoma papilar; C) Carcinoma cromóforo. Modificado de (INAMURA, 2017).

1.2 ALTERAÇÕES METABÓLICAS DO CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS

A maior parte dos casos de CCR é do subtipo células claras, portanto, é a entidade responsável pelo maior número de metástases (AL-AHMADIE et al., 2008; TAKACOVA et al., 2012a). Esse subtipo tumoral é caracterizado pela inativação bialélica do gene *von Hippel-Lindau (VHL)*, em mais de 80% dos casos. Estudos acreditam que o papel defeituoso da via

VHL é importante na etiopatogênese do CCRcc, porém não é capaz de induzir tumorigênese sozinho (KIM et al., 2021). A proteína VHL faz parte do complexo E3 ubiquitina ligase e atua como supressora tumoral. Em condições de normóxia, ela se liga ao fator induzível por hipóxia 1 (HIF-1), induzindo sua rápida degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Já em condições de hipóxia, quando se tem inativação do VHL, este não reconhece HIF-1, que por sua vez, não é degradado e transloca para o núcleo, onde atua como regulador transcricional chave, promovendo o crescimento e sobrevivência celular. No núcleo, HIF-1 α induz a transcrição de múltiplos genes responsáveis pela angiogênese, migração celular, transporte de glicose, glicólise e controle do pH. Dentre estes genes, a anidrase carbônica nove (CA9) é um dos marcadores mais relevantes de hipóxia tumoral (TAKACOVA et al., 2012), Figura 2.

Além disso, essa ausência do gene *VHL* no ccRCC, com consequente ativação prolongada do fator induzível por hipóxia HIF-1, promove aumento do estresse oxidativo nas células renais cancerígenas. Isso exerce influência em diversas vias metabólicas e processos celulares, uma vez que o HIF-1 ativa diferentes fatores de transcrição, como o ATF4, visando a produção de glutathiona para simular o estresse. Sendo, uma outra forma de auxiliar na adaptação celular à hipóxia é através da regulação do metabolismo do carbono-1, promovendo a produção de moléculas antioxidantes, como a MTHFD2 (VAN DER MIJN et al., 2022).

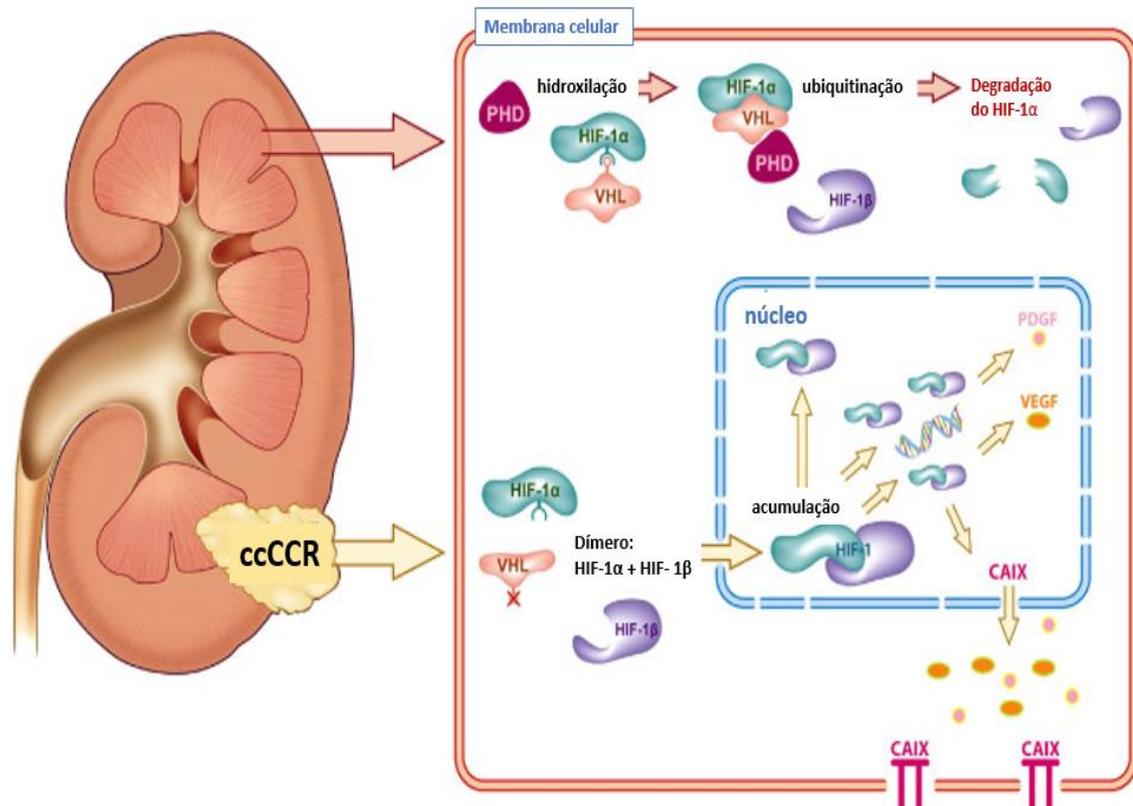


Figura 2 - Relação da expressão da CAIX e a proteína Von Hippel Lindau (pVHL). A expressão da CAIX está intimamente ligada à proteína Von Hippel Lindau (pVHL). No rim em condições normais, o fator induzível por hipóxia- 1 α (HIF-1 α) é hidroxilado por proteínas (prolil hidroxilase) e então ligado ao pVHL, catalisando a poliubiquitilação do HIF-1 α prolil hidroxilado para subsequente degradação. No CCRcc, não acontece essa ligação do HIF-1 α ao pVHL devido à ausência dessa proteína neste subtipo, dessa forma não há degradação e mimetização de condições hipóxicas. Esse HIF-1 α vai ligar-se ao HIF-1 β formando o fator de transcrição HIF-1, que se liga a elementos responsivos à hipóxia localizados em vários genes induzíveis por hipóxia, como a CAIX que é expressa na superfície da célula tumoral. Além disso, o HIF-1 se liga também a fatores pró-angiogênicos (VEGF e PDGF). Adaptado de (STILLEBROER et al., 2010).

1.2.1 Anidrase carbônica IX – CA9/CAIX

A CAIX é membro de uma família da anidrases carbônicas, que atua no transporte transmembrana de CO₂ e na regulação do pH intracelular e extracelular, sendo importantes para diversas funções biológicas (AL-AHMADIE et al., 2008; ZERATI et al., 2013a). A expressão do gene *CA9* em tecidos humanos normais se limita a poucos órgãos, tais como na mucosa gástrica, em células epiteliais do intestino delgado, trato biliar e em alguns tecidos fetais. Todavia, é extensamente expressa em diferentes tumores, principalmente, devido à hipóxia tumoral (AL-AHMADIE et al., 2008; COURCIER et al., 2020). A condição de hipóxia tecidual é observada, frequentemente, em tumores de proliferação rápida e, estudos acreditam que a enzima CAIX é um fator de sobrevivência do tumor por sua função de controlar o pH intracelular e extracelular.

Dessa forma, seu papel na adaptação das células tumorais às condições hipóxicas também está relacionado com o controle da proliferação celular, transformação maligna e progressão de células tumorais (Figura 2). A expressão proteica da CAIX foi descrita em câncer de pulmão, gástrico, mama, colo do útero, carcinoma de células renais, dentre outros (AL-AHMADIE et al., 2008; COURCIER et al., 2020).

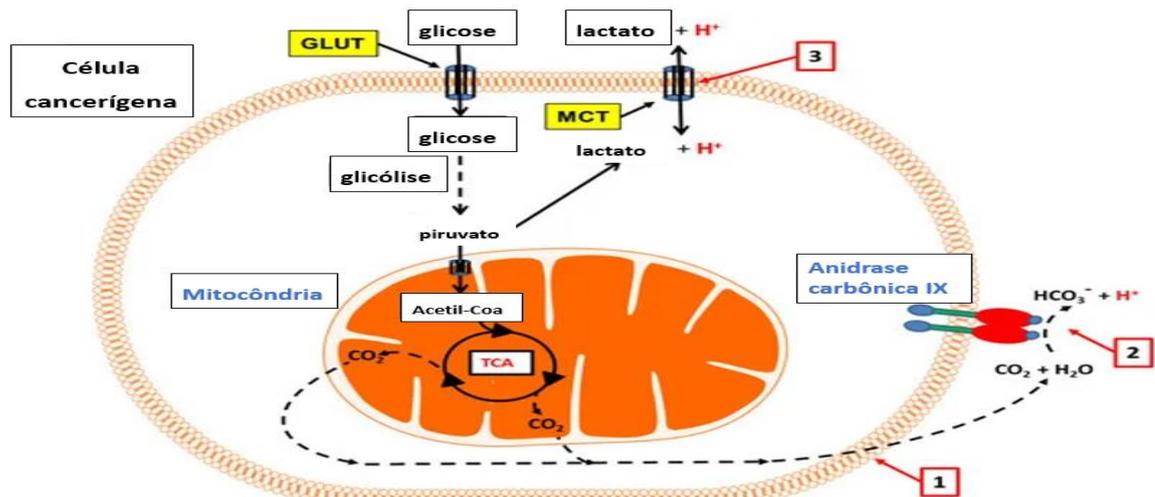


Figura 3 - A anidrase carbônica IX (CAIX/CA9) e a regulação do pH. A anidrase carbônica IX (CAIX/CA9) correlaciona o metabolismo energético do tumor à regulação do seu pH. 1- O CO_2 se difunde pela bicamada lipídica da membrana celular passando para o espaço extracelular de acordo com o gradiente de concentração; 2- Na superfície extracelular da membrana celular, o domínio catalítico da CAIX catalisa a hidratação de CO_2 formando H^+ e HCO_3^- , sendo uma reação importante para regular o Ph e transporte de CO_2 facilitando a sobrevivência das células tumorais. 3- De forma simultânea, o lactato (produto final da glicólise), sai da célula através do transportador de monocarboxilato (MCT) devido ao gradiente de pH. Adaptado de (LEE; GRIFFITHS, 2020).

Estudos sugerem que a alta expressão da CAIX está relacionada a um melhor prognóstico e resposta a terapias em carcinoma de células renais, tratando-se de um fenótipo menos agressivo. Enquanto CCR com baixa expressão sugere fenótipo mais agressivo, relacionando-se com pior prognóstico e menor resposta terapêutica. Provavelmente, a relação da CAIX com a agressividade tumoral se deve ao fato de as células de câncer prosperarem em um microambiente mais ácido e hipóxico (AL-AHMADIE et al., 2008; BUI et al., 2003; COURCIER et al., 2020; INGELS et al., 2017; STILLEBROER et al., 2010; ZERATI et al., 2013b).

A imunomarcção forte e difusa da CAIX é um padrão observado na membrana plasmática das células de CCR subtipo células claras. Essa expressão diminui à medida que o grau de malignidade tumoral vai aumentando, podendo chegar a ser negativa em CCRcc de alto grau. Além disso, o padrão morfológico do CCRcc pode ser confundido com outros tumores

renais que possuem citoplasma claro, a exemplo do carcinoma de translocação da família MITF e subtipo cromóforo. Assim a imuno-histoquímica para CAIX pode contribuir para no diagnóstico dos subtipos, pois apresenta marcação difusamente positiva no CCRcc, no máximo focal no carcinoma de translocação da família MITF e ausente no CCRcr. Apesar de 50% dos casos de carcinoma papilífero serem positivos para expressão de CAIX, não há padrão de marcação de membrana como o CCRcc (EBLE et al., 2021).

Apesar do CCR abranger vários subtipos histológicos, o padrão de expressão da CAIX tem sido pouco explorado nos tumores menos frequentes como papilíferos e cromóforos. Além disso, a literatura aponta divergências sobre o valor prognóstico deste marcador, mesmo quando avaliado no CCRcc. Dessa forma, torna-se importante investigar se a enzima CAIX poderia ser usada como um marcador de prognóstico e de agressividade para carcinoma de células renais, além de poder auxiliar no diagnóstico do subtipo histológico.

1.2.2 Estresse oxidativo e Metabolismo do carbono-1

Em condições de homeostase, as células produzem quantidades pequenas de espécies reativas de oxigênio (EROs) como subproduto do metabolismo celular, importantes para eliminação de patógenos invasores e processo de reparo. Já o excesso de EROs, denominado estresse oxidativo, gera danos a macromoléculas de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, culminando em destruição de organelas e resposta inflamatória, que se tornam mecanismos de sustentação do desenvolvimento de câncer (CECERSKA-HERYĆ et al., 2021; HE et al., 2017).

As EROs desempenham duplo papel, quando se trata do desenvolvimento do câncer. Estas podem promover alterações genéticas moleculares que são necessárias para a iniciação, crescimento e progressão do tumor, e até mesmo aquisição de resistência ao tratamento. Por outro lado, os níveis constantemente elevados de EROs resulta em efeitos citotóxicos, induzindo a ativação de vias apoptóticas ou inibindo a resistência a tratamentos anticancerígenos (SNEZHKINA et al., 2019). Portanto, superar o estresse oxidativo é uma fase crítica para a progressão do tumor. Para isso, as células tumorais tentam neutralizar as EROs através de moléculas antioxidantes, tais como: a superóxido dismutases (SOD), glutaciona peroxidases (GPx), catalase (CAT), xantina oxidoreductase (XOR) e glutaciona reductase (GR). Esse sistema de defesa antioxidante apresenta duas enzimas (catalase e glutaciona) que são dependentes do fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina - NADPH (CECERSKA-HERYĆ et al., 2021).

O NADPH é um cofator que fornece equivalentes redutores para que sejam geradas moléculas antioxidantes, a exemplo da glutathiona (GSH) e da tioredoxina (TRX). Além disso, o atua como doador de elétrons essencial em todos os organismos e cofator indispensável para transferir e reservar o potencial de redução em diferentes reações anabólicas (JU et al., 2020). Portanto, níveis elevados de NADPH são cruciais para o crescimento e sobrevivência das células cancerígenas e estudos recentes mostraram que células cancerígenas regulam positivamente a produção de NADPH para atender a demanda de replicação e proteção contra EROs (RATHER et al., 2021).

A produção de NADPH é realizada através de diferentes enzimas localizadas no citoplasma, núcleo e mitocôndria da célula. As principais enzimas mitocondriais são a MTHFD2, MTHFD2L, ALDH1L2, mNADK, NNT, ME2/3, GDH1/2 e IDH2. Já nos demais compartimentos da célula atuam as enzimas IDH1, ME1, G6PD, cNADK, PGD, MTHFD1, ALDH1L1 e DHFR. A ativação dessas enzimas tem sido relacionada com a maior produção do NADPH, por isso a expressão destas vem sendo investigada em diferentes tipos de tumor (JU et al., 2020; SPENCER; STANTON, 2017), como forma de associar os níveis de produção de antioxidantes com a agressividade da neoplasia (GONTHIER et al., 2019; LABA; WANG; ZHANG, 2018; LU et al., 2018).

Neste contexto, o metabolismo do carbono-1 mediado por folato é considerado fonte alternativa para produção de NADPH. Além disso, produz e fornece unidades de carbono ativadas, que suportam processos celulares fundamentais como a biogênese de aminoácidos, biossíntese de nucleotídeos, manutenção da estabilidade genômica e controle epigenético do DNA e das histonas (DUCKER; RABINOWITZ, 2017; DUKONNO et al., 2017; KRUPENKO et al., 2020; LIN et al., 2018a; YU et al., 2020; ZHU; LEUNG, 2020).

Uma das principais fontes de carbono nessa via é a serina, cuja biossíntese leva ao aumento da produção de NADPH em células do câncer. O ciclo do carbono-1 compreende duas reações metabólicas concomitantes que ocorrem tanto no citoplasmático quanto na mitocôndria. Na mitocôndria (Figura 4), as reações são realizadas por duas isoenzimas, dentre elas a MTHFD2 tem atuação bifuncional com atividades de metileno desidrogenase e ciclohidrolase (LIN et al., 2018a; YU et al., 2020; ZHU; LEUNG, 2020). De maneira geral, o metabolismo do carbono-1 mediado por folato ocorre da seguinte forma: O folato é responsável por receber compostos químicos de apenas um carbono de diferentes coenzimas. Esse folato, inicialmente vai ser reduzido a tetrahydrofolato (THF), e uma unidade de carbono (1C) da serina é transferida para o THF por serina hidroximetil transferases (SHMTs), convertendo o THF a 5,10-

metilenotetrahidrofolato (CH₂-THF). A MTHFD2 vai catalisar a produção do 10-formil-tetrahidrofolato (10-CHO-THF) a partir do 5,10-metileno-tetrahidrofolato, a partir dessa reação tem-se a liberação de NADPH, onde NADP⁺ é reduzido a NADPH (JU et al., 2020; LYON et al., 2020; ZHU; LEUNG, 2020). A hiperativação do metabolismo do carbono-1 desempenha então papel significativo nos fenótipos de câncer, pois promove proliferação celular, uma vez que é funcional para síntese de nucleotídeos, metilação (LYON et al., 2020) e produção de NADPH.

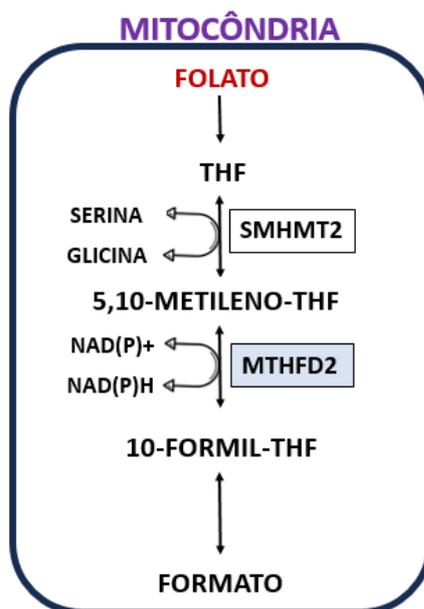


Figura 4 - Atuação da MTHFD2 no ciclo do carbono-1 mediado por folato. Trata-se de uma enzima mitocondrial que participa da geração de NADPH catalisando a conversão de 5,10-metileno-THF à 10-formil-THF. Fonte: Elaboração da autora, 2023.

Apesar da MTHFD2 ter funções enzimáticas bem esclarecidas, estudos vem buscando elucidar seu papel no desenvolvimento de câncer, uma vez que atua na proliferação das células cancerígenas, pode conferir homeostase redox e sua expressão está relacionada com presença de metástase e sobrevida baixa dos pacientes com câncer de mama, pâncreas e renal. Ressalta-se que em indivíduos saudáveis e adultos, a expressão de MTHFD2 é muito baixa ou até mesmo inexistente, podendo ser um alvo terapêutico para o câncer bastante promissor (LIN et al., 2018b; YU et al., 2020; ZHU; LEUNG, 2020).

Através de uma meta-análise feita em 2014 com 19 diferentes tipos de câncer humano, observou-se que a expressão proteica de MTHFD2 estava aumentada em vários tumores, incluindo câncer de mama, câncer de cólon, câncer de fígado, câncer renal, dentre outros, com exceção do glioma. Sendo expressa em células transformadas e em tecidos metastáticos. E, o nível de sua expressão correlacionou-se com parâmetros clínico-patológicos (TNM, presença de metástases) em câncer de mama e de células renais (ZHU; LEUNG, 2020). Dentre outras análises por imuno-histoquímica, observaram expressão proteica elevada da enzima em amostras de adenocarcinoma pancreático ductal e carcinoma de células renais, associando a taxas, significativamente, baixas de sobrevida global e livre da doença (LIN et al., 2018b; NOGUCHI et al., 2018).

Considerando a notável expressão elevada de enzimas como a MTHFD2 em vários tipos de câncer, este pode ser um potencial marcador de diagnóstico e prognóstico tumorais

(GUSTAFSSON SHEPPARD et al., 2015). No contexto do carcinoma de células renais, a investigação e o desenvolvimento de estratégias alternativas de tratamento e novos alvos terapêuticos são cruciais, uma vez que é uma neoplasia com alta resistência à quimioterapia para melhorar os resultados terapêuticos renal representa um desafio significativo. Apesar do desafio, terapias-alvo e imunoterapias emergem como alternativas promissoras, com potencial para superar a resistência observada (KRUPENKO et al., 2020; LIN et al., 2018b; YU et al., 2020; ZHU; LEUNG, 2020).

Resultados de ensaios in vitro relataram que a inibição da *MTHFD2* é prejudicial para fenótipos de câncer mais agressivos. Quando se utilizou a técnica de RNAi (RNA de interferência) para supressão gênica da *MTHFD2* houve morte celular, suprimindo características malignas dos cânceres renal, de mama, pulmão, ovário e melanoma. No câncer de mama, observou-se ainda a supressão da invasão e migração celular, sem efeitos na apoptose (ZHU; LEUNG, 2020). Resultados preliminares no nosso grupo de pesquisa, com análise de expressão gênica em banco de dados público, sugeriram 13 enzimas relacionadas com a produção de NADPH associadas, significativamente, com sobrevida de pacientes com CCR. Sendo a alta expressão da *MTHFD2* indicativa de baixa sobrevida nos tipos histológicos CCRcc, CCRp e CCRcr (dados não publicados).

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A investigação de biomarcadores no Carcinoma de Células Renais (CCR), um tumor altamente heterogêneo, quimioresistente e agressivo, é crucial para compreender sua biologia e propor opções de terapia-alvo. A CAIX/CA9, normalmente associada à inativação do gene *Von Hippel-Lindau*, e a MTHFD2, que participa do metabolismo do carbono-1 e produção de NADPH, emergem como promissores marcadores prognósticos, pois parecem ter associações com características agressivas do CCR. No entanto, ainda persistem lacunas que demandam investigações para esclarecer o papel desses marcadores no CCR.

Investigar a relação da expressão proteica dessas enzimas com o prognóstico e a agressividade do CCR pode contribuir para estratégias de avaliação do prognóstico e tratamentos mais eficazes, visando melhorar a qualidade de vida e as chances de sobrevivência dos pacientes com câncer renal. A investigação através da imuno-histoquímica é de fundamental importância, pois é uma técnica acessível e de baixo custo, que desempenha papel importante na pesquisa e diagnóstico.

Baseado em resultados preliminares de expressão gênica e dados publicados com outros tipos de câncer, a **hipótese** deste estudo foi de que casos de CCR em estadios avançados apresentam menor expressão proteica de CAIX e maior expressão proteica da enzima MTHFD2, podendo ser potenciais marcadores de agressividade tumoral, através da técnica de imuno-histoquímica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a expressão de CAIX e MTHFD2 de acordo com fatores prognósticos e de agressividade tumoral em carcinoma de células renais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o padrão de expressão gênica e proteica de CA9/CAIX e MTHFD2 em diferentes coortes de carcinoma de células renais;
- b) Associar os perfis de expressão de ambas as enzimas com prognóstico da doença;
- c) Associar o perfil de expressão de ambas as enzimas com parâmetros clínicos, histopatológicos e subtipos histológicos de CCR.

4 METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro- UFTM- parecer nº: 4.981.821 de 17 de setembro de 2021.

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO

O projeto foi desenvolvido no setor de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas e Naturais (ICBN) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, que possui instalações e infraestrutura física para realização e análises dos resultados da técnica de imunohistoquímica.

4.2 SELEÇÃO DE CASOS

Foi realizado inicialmente um levantamento do número de casos de pacientes adultos com câncer renal diagnosticados no Hospital das Clínicas (HC) da UFTM do ano 2000 a 2021. O estudo utilizou amostras disponíveis na Unidade Patologia Cirúrgica do HC-UFTM. Todo material biológico utilizado já havia sido preparado e utilizado, previamente, na rotina diagnóstica da Unidade de Patologia, dispensando a necessidade de novas coletas ou processamento das amostras. Um total de 139 pacientes com CCR foram incluídos inicialmente neste estudo.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no estudo: pacientes adultos diagnosticados com câncer renal no HC-UFTM do ano de 2000 até 2021; pacientes que passaram por ressecção cirúrgica ou biópsia de carcinoma de células renais; casos com tecido adequado para reavaliação das amostras e com dados clínicos disponíveis; sendo tumores primários.

Foram excluídos do estudo: casos de neoplasia que não se tratava de um tumor renal; casos com diagnósticos de tumores benignos e de tumores que não eram primários do rim (casos de metástases); casos que não possuíam mais lâminas no acervo da Unidade Patologia Cirúrgica do HC-UFTM; casos cujo material (bloco de parafina) estava inviável para análise da Imunohistoquímica (IHC) (material com muita necrose ou hemorragia).

4.4 COLETA DE DADOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS

Foram coletadas as seguintes informações clínicas e epidemiológicas disponíveis nos prontuários e Hospital das Clínicas (HC) da UFTM: idade, sexo, cor/raça, cidade de origem,

presença de comorbidades ou de outra doença renal ou de doenças prévias, hipertensão, diabetes, obesidade pelo Índice de massa corporal (IMC), data do diagnóstico do câncer renal, data da última consulta. Dos laudos histopatológicos foram coletadas as seguintes informações: tipo de cirurgia/tratamento, tamanho/estágio/classificação/tipo histológico do câncer, presença de metástase e/ou recidiva tumoral, sintomas e se veio a óbito.

4.5 REVISÃO HISTOPATOLÓGICA DOS CASOS SELECIONADOS

Foi realizada uma revisão dos laudos histopatológicos dos casos e confirmação do diagnóstico desses pacientes previamente selecionados, por meio de revisão das lâminas coradas por Hematoxilina & Eosina (HE) já existentes na Unidade de Patologia cirúrgica-HC. Essa revisão foi feita por um patologista experiente visando evitar subjetividades inter-observadores, e também foi feita a reavaliação da classificação TNM de cada caso. Além disso, as áreas que apresentavam uma grande quantidade de células tumorais foram demarcadas na lâmina com caneta de tinta permanente para que posteriormente fosse coletado essa área em específico para confecção do TMA.

Após essa reavaliação foi feita a seleção dos blocos de parafina com material biológico suficiente para realização da imuno-histoquímica, totalizado 127 casos incluídos para avaliação por IHC.

4.6 CONFECÇÃO DOS *TISSUE MICROARRAYS* (TMAS)

Para preparação da lâmina a qual foi realizada a imuno-histoquímica, utilizamos a técnica de *tissue microarrays* (TMA). O *tissue microarray* permite o alinhamento de vários fragmentos de tecidos de diferentes blocos de parafina em apenas um novo bloco de parafina. Essa técnica é amplamente utilizada para análise de amostras grandes que dispõem de biomarcadores com fins diagnósticos, preditivos ou prognósticos. Seu uso apresenta melhor custo-benefício e menor prazo de execução, pois permite analisar em uma mesma lâmina vários casos, o que resulta em menor quantidade de reagentes utilizada e menor quantidade de dias necessários para realização da imuno-histoquímica (Figura 6).

Utilizamos 254 blocos doadores que foram cedidos pela Patologia Cirúrgica do HC. O método manual de confecção de TMA foi realizado conforme descrito na literatura, com algumas modificações (CHEN et al., 2020; KIM et al., 2013; PIRES; DA MATTA ANDREIUOLO; DE SOUZA, 2006). Para confecção do bloco receptor, utilizamos 20 pinos (tecidos coletados) com 3mm de diâmetro e 2mm de espaçamento entre estes. Para cada caso

incluído no estudo, coletou-se dois fragmentos de diferentes blocos de parafina de cada caso das áreas demarcadas anteriormente na etapa de revisão dos casos. A coleta do tecido foi feita com um extrator de punção de tecido de 3mm e dimensão visando obter os fragmentos com 3 mm de diâmetro de cada área selecionada nos blocos.

Inicialmente, foi desenvolvido um mapa de localização, composto por letras e números, em que foi definido a posição de cada amostra dentro do bloco. A segunda etapa foi desenvolver um molde no coreldraw (Figura 6) baseado no mapa de localização para auxiliar na montagem do TMA. Em cada bloco receptor, a primeira posição sempre foi preenchida com um fragmento de fígado normal para orientação da posição do bloco. Essas primeiras etapas foram desenvolvidas pensando principalmente no procedimento de leitura microscópica para saber exatamente qual a localização de cada amostra dentro do TMA. Protocolo descrito no anexo III.

Após a confecção dos TMAs, foram confeccionadas lâminas com cortes histológicos de 3µm de espessura. As lâminas passaram por um banho de parafina e foram guardadas em congelador para serem utilizadas na imuno-histoquímica.

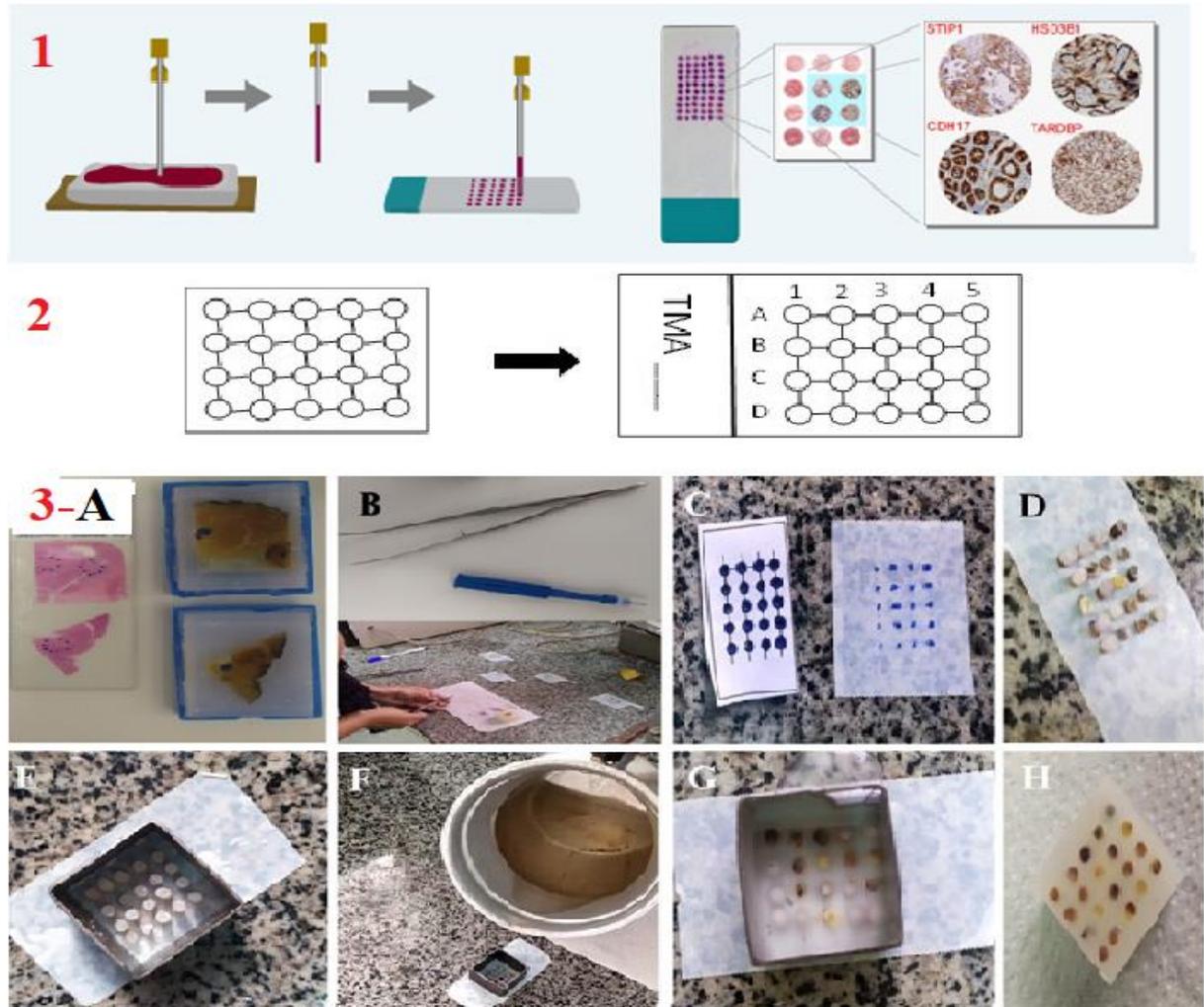


Figura 5 - Técnica de *tissue microarray*. 1) Demonstração da funcionalidade do *tissue microarray*. Para realização desta técnica necessita-se de diferentes blocos doadores de onde serão coletadas as áreas de interesse e inoculadas em um novo bloco denominado receptor. O bloco receptor passa a apresentar várias amostras o que permite a análise de vários casos em uma mesma lâmina. Imagem disponível em <http://www.abnova.com/products/Antibody-for-Tissue-Microarray-M0000.html>. 2) Representação do molde desenvolvido no coreldraw para padronização da localização dos pinos do TMA. Dimensões utilizadas: pinos de 2mm e espaçamento entre estes de 2mm. 3) Etapas da confecção dos *Tissue microarray* (TMA). 3A) Blocos doadores com suas respectivas lâminas com demarcação das áreas de tumores para coleta. 3B) Coleta dos pinos onde é utilizado extrator do tipo *punch* e pinça para colocar esses pinos em seu correto local no molde. 3C) Molde utilizado e demarcação deste em fita de dupla face sobre a bancada. 3D) Pinos colocados em seus locais corretos. 3E) Molde para confecção do bloco de parafina. 3F) Parafina líquida para emblocamento. 3G) Inclusão dos pinos em parafina líquida. 3H) Bloco de TMA pronto.

4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Essa técnica foi utilizada para avaliar a expressão proteica das enzimas CAIX e MTHFD2. As amostras-controle positivas da reação foram selecionadas de acordo com recomendações do fabricante do anticorpo, sendo para o anti-MTHFD2 utilizado tecido de rim normal e para a anti-CA9, amostra de carcinoma de células renais do tipo células claras. Como

controle negativo da reação, foi realizada a substituição do anticorpo primário por solução de albumina bovina a 4%.

O material foi desparafinado em xilol por 30 minutos, hidratado em concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80%, 70%) e em água corrente e foi submetido à recuperação antigênica por meio de calor úmido e pressão na panela “Pascal” (Dako) utilizando o tampão citrato (pH = 6,0) por cerca de 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram submetidas a 6 lavagens com água destilada e 1 lavagem de 5 minutos com tampão PBS. Após essa etapa, foi realizado bloqueio da atividade da peroxidase endógena com uma gota de bloqueador de peroxidase (Peroxidase block, Kit EasyLink One System, EasyPath diagnósticos) cuba escura e úmida a temperatura ambiente por 30 minutos. Passado o tempo, foram realizadas duas lavagens de 5 minutos cada com PBS. Foi então, realizado bloqueios de proteínas inespecíficas com uma gota de bloqueador de proteínas (Protein block, Kit EasyLink One System, EasyPath diagnósticos) em cuba escura e úmida por 25 minutos a temperatura ambiente. Depois desse tempo, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário anti-CA9 policlonal de rato (FNab01167, diluição 1:70, Finetest) e anti-MTHFD2 policlonal de rato (HPA049657, diluição 1:40, Sigma) em cuba escura e úmida overnight a 4°C. As lâminas foram então lavadas 3 vezes de 5 minutos cada com PBS e foram incubadas em cuba escura e úmida com polímero de uma única etapa (Polymer EasyLink One, Kit EasyLink One System, EasyPath diagnósticos) por 60 minutos em temperatura ambiente. Por fim as lâminas foram submetidas a 2 lavagens de 5 minutos cada com PBS e reveladas com cromógeno diaminobenzidina (DAKO) por 5 minutos para MTHFD2 e 3 minutos para CA9. Foi realizada a contra-coloração com hematoxilina por 30 segundos e lavagem em água corrente por 2 minutos. Por último, as lâminas foram desidratadas em uma sequência de álcoois absolutos, diafanizadas em xilol e montadas com meio de montagem permanente e lamínula. Protocolos descrito nos anexos I e II.

4.4.1 Imunomarcção de MTHFD2 e CAIX

A imunomarcção foi analisada pelo método semi-quantitativo de acordo com a intensidade e a quantidade de células e foram descritas em escore, como descrito no estudo de (LIN et al., 2018) e (ECKERT et al., 2019). O escore final foi dado como: intensidade x porcentagem de células marcadas para ambos os marcadores. Para isso, as lâminas foram avaliadas por dois observadores as cegas e de maneira independente e quando necessário um terceiro observador. Para análise de MTHD2 foi definido para intensidade: 0 = negativo; 1+ = fraco; 2+ = moderado; 3+ = forte e para quantidade de células positivas, foi definido 0 = < 5%;

1 = 6 a 25%; 2= 26 a 50%; 3 = 51 a 75%; 4 >76%. O resultado foi expresso em baixa expressão quando o escore final foi <4 e alta expressão quando ≥ 4 (LIN et al., 2018).

Já para análise de CAIX, foi definido para intensidade 0 = negativo; 1+ = fraco; 2+ = moderado; 3+ = forte e para quantidade de células positivas foi definido 0 = negativo; 1= <10%; 2= 10-50%; 3= 51-80%; 4= >80%. O resultado foi expresso em negativo/baixo quando o escore final foi 1 a 3, moderado de 4 a 6 e forte de 8 a 12 (ECKERT et al., 2019).

4.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA *IN SÍLICO*

A expressão do gene *CA9* e *MTHFD2* foi analisada de acordo com as características histopatológicas e a sobrevida dos pacientes utilizando as bases de dados KM-Plotter em linha (<https://kmplot.com/analysis/>). A base de dados de chips de genes, *microarray* (BARTHA; GYÓRFFY, 2021) da GEO (www.tnmpplot.com), que inclui 277 tecidos renais não neoplásicos (NN), 556 tumores e 58 tumores metastáticos, foi investigada para identificar perfis de expressão de genes entre tipos distintos de amostras renais. Além disso, as diferenças entre os tecidos NN e tumorais (117 NN *versus* 535 CCRcc; 77 NN *versus* 289 CCRp; 69 NN *versus* 65 CCRcr), bem como a sobrevida global (SG) e a Sobrevida livre de recorrência (SLR) em cada tipo histológico de tumor foram avaliadas na base de dados TCGA Pan-cancer RNAseq (NAGY; MUNKÁCSY; GYÓRFFY, 2021). Para SG e SLR, as coortes foram agrupadas de acordo com os valores medianos de expressão de cada gene, através da seleção do melhor ponto de corte automático.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas nos softwares IBM®SPSS®v.20 e GraphPad Prism versão 7.0. Foi adotado para significância estatística valor $\alpha = 0,05$. Análises de frequência contendo média, mediana e desvio padrão. A associação da expressão proteica com os dados categóricos clínicos/histopatológicos fora realizada pelo teste chi-quadrado. Associações da expressão proteica com dados clínicos/histopatológicos oi realizada por testes não-paramétricos (Mann-Whitney/Kruskal-Wallis). Análises de sobrevida foram realizadas por meio de curvas de Kaplan-Meier e pelo teste de log-rank. Para a expressão gênica, considerou-se o padrão de expressão alto/baixo, para isso as coortes foram agrupadas por valores de expressão mediana através da seleção do melhor corte automático. Já na análise da expressão proteica, o padrão de expressão positivo / negativo foi baseado no escore calculado para cada marcador.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, EPIDEMIOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS DOS CASOS DE CCR

Na coorte utilizada para avaliação da expressão proteica, por imuno-histoquímica, foram incluídos 131 pacientes com diagnóstico de carcinoma de células renais. Todos os parâmetros epidemiológicos, clínicos e histopatológicos estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Características clínico, epidemiológicos e histopatológicas (n=131)

Características	n (%)	Características	n (%)
Sexo		Tipo histopatológico	
Masculino	88 (67,2%)	CCRcc	102 (77,9%)
Feminino	43 (32,8%)	CCRp	23 (17,6%)
		CCRcr	6 (4,6%)
Idade		Necrose tumoral	
≥50 anos	110 (84%)	Presente	73 (55,7%)
<50 anos	21 (16%)	Ausente	58 (44,3%)
Raça*		Diâmetro tumor*	
Branco	91 (69,5%)	< 7cm	68 (51,9%)
Negro	39 (29,8%)	> 7 cm	62 (47,3%)
Sem dados	1 (0,8%)	Sem dados	1 (0,8%)
IMC*		Estádio T*	
Eutróficos	17 (13%)	T1/T2	91 (69,5%)
Sobrepeso/obesidade	51 (38,9%)	T3/T4	39 (29,8%)
Sem dados	63 (48,1%)	Sem dados	1 (0,8%)
Sintomas*		Estádio N*	
Sim	26 (19,8%)	Nx	99 (76,3%)
Nega	97 (74%)	N0	24 (18,3%)
Sem dados	8 (6,1%)	N1	6 (4,6%)
		Sem dados	1 (0,8%)
Comorbidade*		Metástases*	
Sim	86 (65,6%)	Presente	12 (9,2%)
Nega	40 (30,5%)	Ausente	115 (87,8%)
Sem dados	5 (3,8%)	Sem dados	4 (3,1%)
Histórico familiar de câncer*		Estadiamento*	
Pais/irmãos	12 (9,2%)	I e II	86 (65,6%)
Tios/avós	4 (3,1%)	III e IV	44 (33,6%)
Nega	105 (80,2%)	Sem dados	1 (0,8%)
Sem dados	10 (7,6%)		
Tabagismo e/ou etilismo*		Invasão angiolinfática*	
Sim	69 (52,7%)	Presente	20 (15,3%)
Nega	47 (35,9%)	Ausente	106 (80,9%)
Sem dados	15 (11,5%)	Sem dados	5 (3,8%)
Tratamento*		Tipo Cirurgia	
Cirurgia	118 (90,1%)	Radical	101 (77,1%)
Cirurgia e outros	7 (5,3%)	Parcial	28 (21,4%)
Somente outros	1 (0,8%)	Sem dados	2 (1,5%)
Sem dados	5 (3,8%)		
Óbito*		Fuhrman	
Sim	18 (13,7%)	1 e 2	78 (59,5%)
Não	109 (83,2%)	3 e 4	53 (40,5%)
Sem dados	4 (3,1%)		

Resultados

Lateralidade*		Recidiva	
Rim esquerdo	58 (44,3%)	Sim	7 (5,3%)
Rim direito	69 (52,7%)	Não	85 (64,9%)
Ambos	1 (0,8%)	Sem dados	39 (29,8%)
Sem dados	3 (2,3%)		

*Ausência de dados de alguns pacientes nos prontuários. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

A maior parte dos casos foi de pacientes do sexo masculino 88 (67,2%), com idade igual ou superior a 50 anos 110 (84%), sendo de raça branca 91 (69,5%), apresentando sobrepeso 51 (38,9%), alguma comorbidade (*Diabetes mellitus*, doença renal crônica, hipertensão) 86 (65,6%), eram fumantes e/ou etilistas 69 (52,7%), e, apresentavam acometimento do rim direito (52,7%). A minoria dos pacientes apresentava um ou dois sintomas da tríade sintomatológica (hematúria, dor lombar e massa palpável) 26 (19,8%). Em relação a presença de histórico familiar de câncer, 12 pacientes (9,2%) relataram ter parentes de primeiro grau, e, apenas 4 (3,1%) tinham parentes de segundo grau com diagnóstico de câncer. Para associar dados clínico-epidemiológicos com prognóstico foi realizada análise de sobrevida global através de curvas de Kaplan-Meier e teste de log-rank. Pacientes que apresentavam pelo menos dois sintomas da tríade clássica apresentaram menor sobrevida ($54,7\% \pm 13,4\%$ versus $84\% \pm 5,3\%$; $p=0,005$), Figura 6A. Além disso, pacientes com acometimento do rim esquerdo tiveram menor sobrevida ($62,5\% \pm 10,4\%$ versus $90,3\% \pm 4,5\%$; $p=0,013$), Figura 6B.

No que diz respeito às informações histopatológicas, 102 pacientes possuíam diagnóstico de CCR do subtipo células claras (77,9%), 23 eram tumores do subtipo papilar (17,6%) e apenas seis eram do subtipo cromóforo (4,6%). A maioria dos pacientes tinha tumores em estágios T1 ou T2 (69,5%), Fuhrman entre graus 1 e 2 (59,5%) e presença de necrose tumoral (55,7%). A invasão angiolímfática foi detectada em 15,3% dos casos, metástase à distância foi identificada em 12 (9,2%) dos pacientes, enquanto apenas seis casos apresentavam metástase em linfonodos (4,6%). Ao realizar a associação desses dados com prognóstico, observou-se que os grupos de paciente com tumores grandes (>7cm) e com estadiamento T3/T4 apresentaram menores taxas de sobrevida ($p=0,004$; $p<0,0001$, respectivamente), Figuras 6C e 6D. Como esperado, tumores com estádios mais avançado III/IV tiveram associação significativa com menor sobrevida do paciente, quando comparados aos estádios iniciais ($42,4\% \pm 11,2\%$ versus $94,6\% \pm 4,2\%$; $p<0,0001$), Figura 6E. Pacientes com metástase à distância, com tumores Fuhrman 3 e 4, presença de necrose tumoral e com invasão angiolímfática também apresentaram sobrevida significativamente menor ($p<0,001$), Figuras 6F-6I). Além disso, dos 5 pacientes que tiveram linfonodos acometidos pela neoplasia, 3 foram à óbito, associando-se este parâmetro com menor sobrevida global ($p<0,0001$), Figura 6J.

Sobre o tratamento realizado, grande parte dos pacientes realizou intervenção cirúrgica (118 (90,1%), sendo 101 nefrectomias radicais (77,1%). Observou-se que, pacientes submetidos à intervenção cirúrgica e quimioterapia e/ou radioterapia (5,3%) apresentaram sobrevida global significativamente menor, quando comparados com aqueles que fizeram somente nefrectomia (90,1%), ($25\% \pm 20,4\%$ versus $84\% \pm 4,5\%$; $p < 0,0001$), Figura 6J-K.

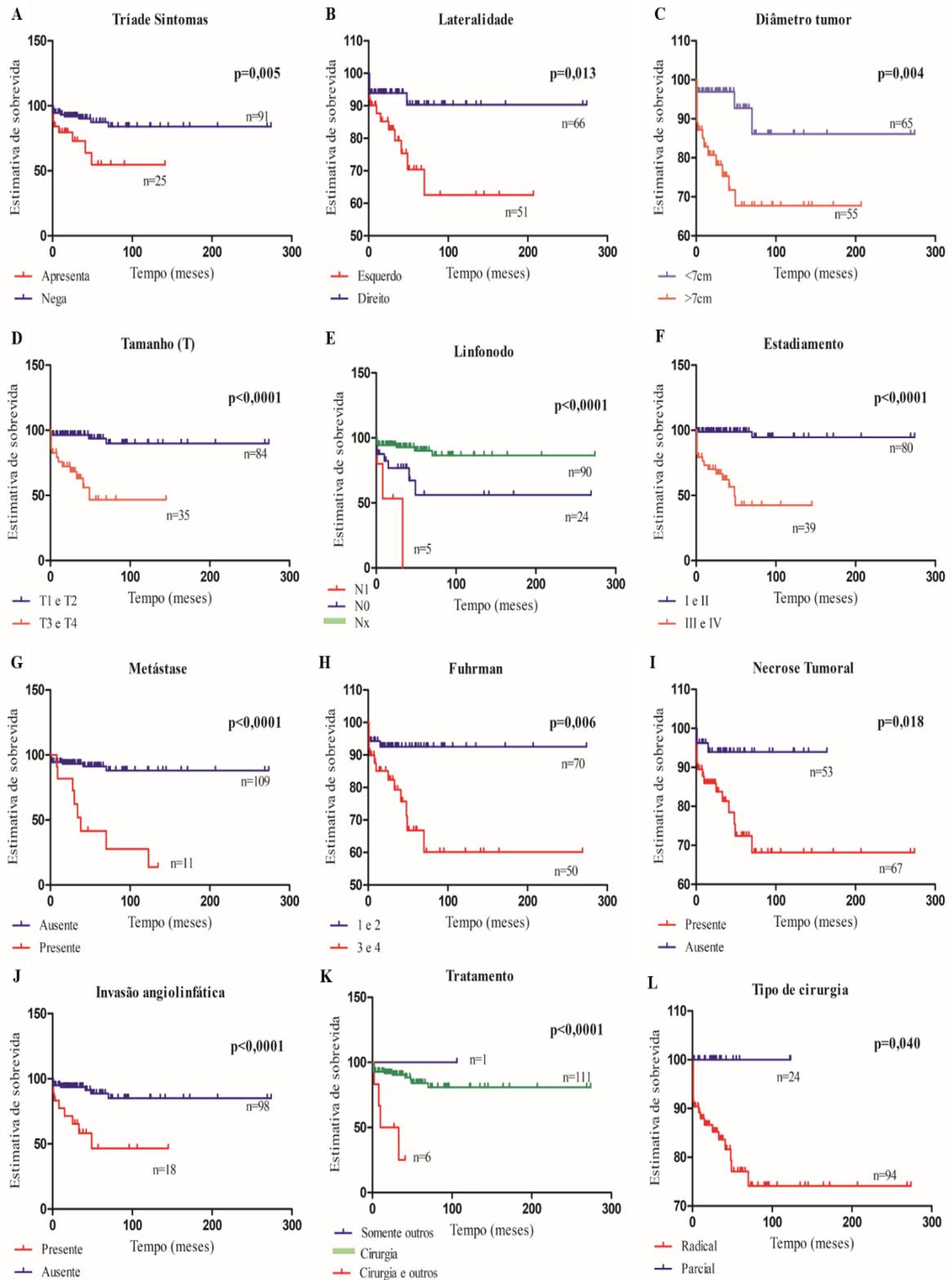


Figura 6 - Sobrevida geral dos pacientes de acordo com parâmetros clínicos, epidemiológicos e histopatológicos. A) Curva de sobrevida da tríade de sintomas. B) Curva de sobrevida de lateralidade. C) Curva de sobrevida de acordo com o diâmetro do tumor. D) Curva de sobrevida de acordo com tamanho do tumor. E) Curva de sobrevida sobre acometimento dos linfonodos. F) Curva de sobrevida de acordo com estadiamento. G) Curva de sobrevida da metástase a distância. H) Curva de sobrevida do grau de Fuhrman. I) Curva de sobrevida da necrose tumoral.

J) Curva de sobrevida da invasão angiolinfática. K) Curva de sobrevida do tratamento. L) Curva de sobrevida de acordo com tipo de cirurgia. Teste estatístico: Log-rank. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

5.2 EXPRESSÃO DE CA9/CAIX EM CCR

O potencial prognóstico do CA9 foi avaliado pela expressão gênica, utilizando duas bases de dados da plataforma Km-plotter. Observamos que as amostras tumorais apresentavam uma expressão de CA9, significativamente, mais elevada do que os tecidos NN. Além disso, foi possível observar que os casos metastáticos exibiram expressão mais elevada do que as amostras NN, porém menor do que as amostras tumorais isoladas ($p=3,15e-92$), conforme Figura 7A. Ao comparar os subtipos histológicos de CCR com amostras renais não neoplásicas, o CCRcc e o CCRp demonstraram expressão gênica mais elevada do que os tecidos NN, enquanto o subtipo CCRcr apresentou perfil oposto, exibindo menor expressão do que amostras NN (Figura 7B-D). É digno de nota que o subtipo CCRcc registrou os níveis mais elevados de CA9.

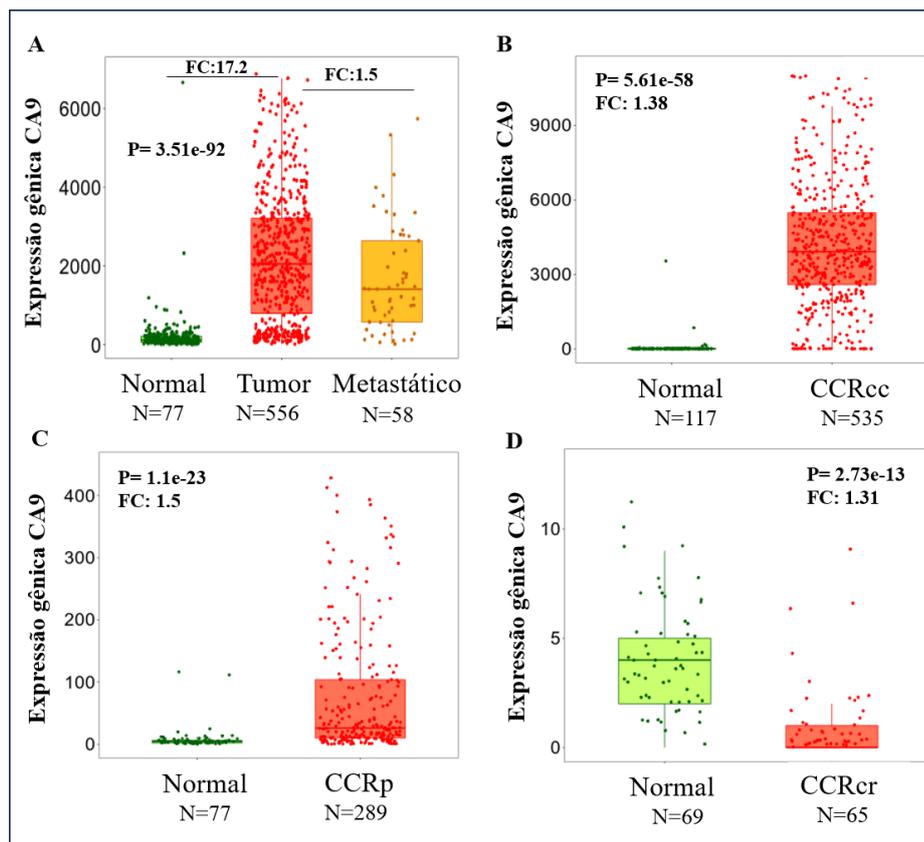


Figura 7 - Expressão gênica de CA9 em amostras tumorais, não neoplásicas e metastáticas. A) Comparação entre tecido não neoplásico (Normal), Tumor e tecido Metastático. Foi observada maior expressão no Tumor, seguido pelas amostras com metástase. B) Comparação entre o subtipo histológico CCRcc e tecido Normal, revelando expressão elevada nos tumores. C) Maior expressão no tumor subtipo CCRp em relação aos tecidos não neoplásicos. D) CCRcr expressa menos CA9 em comparação com os tecidos não neoplásicos. FC: *Fold-change*. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

De maneira interessante, a baixa expressão de CA9 foi significativamente associada a uma menor sobrevida global dos pacientes nos subtipos CCRcc ($p=0,0035$), conforme ilustrado na Figuras 8A. O subtipo CCRp demonstrou perfil oposto com a maior expressão de CA9 associada a menor sobrevida global, $p=0.019$ (Figura 8C). Ambos os grupos não apresentaram associações com sobrevida livre de recorrência (Figura 8B e 8D).

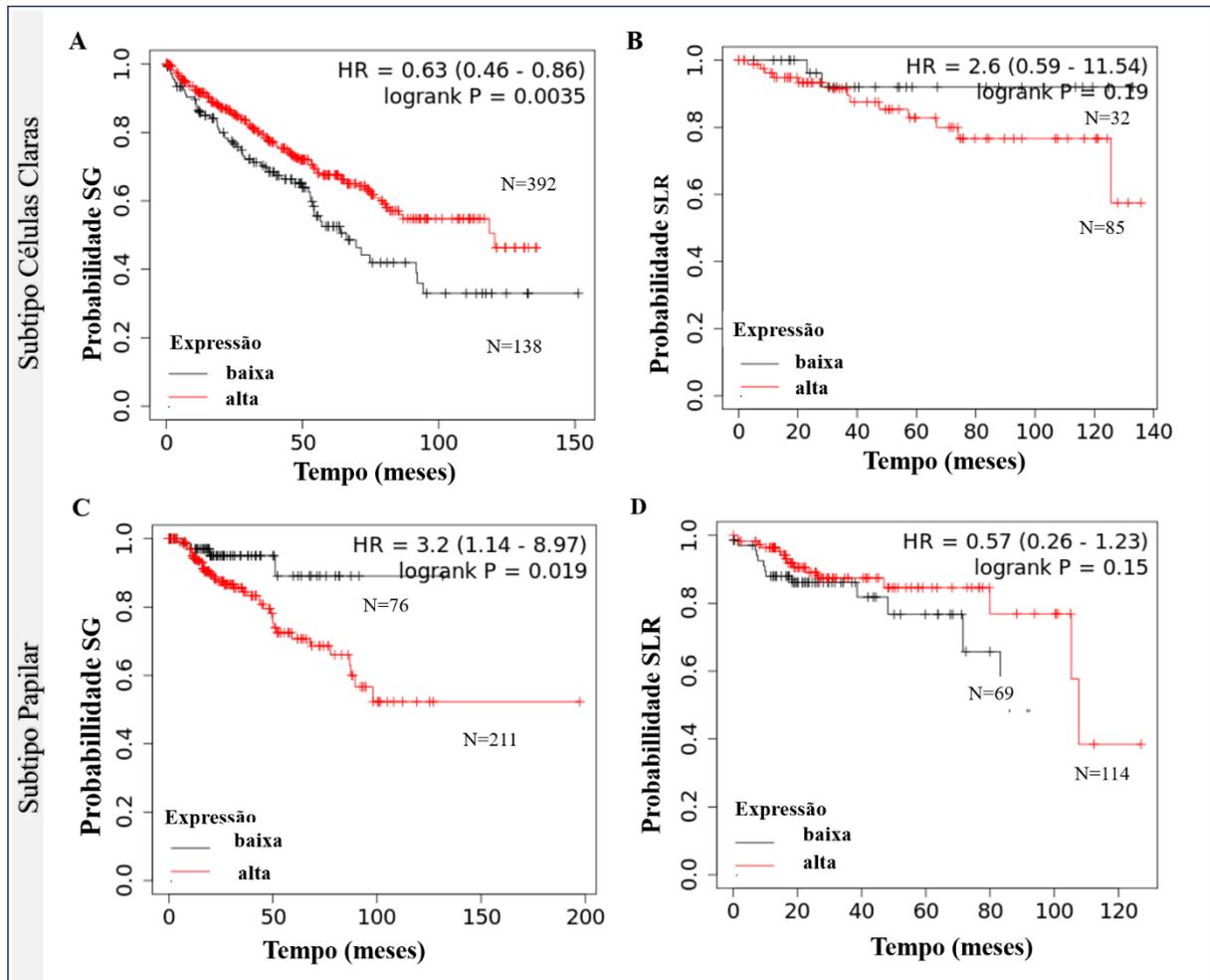


Figura 8 - Curvas de sobrevida de acordo com a expressão do gene CA9 nos subtipos células claras e papilar. A) Sobrevida global (SG) no subtipo CCRcc, revelando associação entre baixa expressão de CA9 e menor sobrevida. B) Sobrevida livre de recorrência (SLR) no subtipo CCRcc, indicando a ausência de diferenças significativas. C) Alta expressão de CA9 associada a menor sobrevida global no subtipo CCRp. D) Sobrevida livre de recorrência no subtipo CCRp sem associação com a expressão de CA9. HR: *hazard ratio*. SG: Sobrevida global. SLR: Sobrevida livre de recorrência. Teste estatístico: Log-rank. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Considerando a importância da expressão do gene CA9 no prognóstico do CCR, analisamos o perfil proteico em uma coorte de 117 casos com CCR. A imunomarcagem seguiu padrão citoplasmático e de membrana. Em relação à proporção de células marcadas, observamos que quatro casos (3,4%) apresentaram de 51%-80% de células positivas, os demais 113 casos (96,6%) apresentaram mais de 80% das células marcadas. De acordo com a intensidade de marcação, 14 casos tiveram intensidade fraca (12%), 65 marcações moderada

(55,6%), 38 de intensidade forte (32,5%) e nenhum caso negativo (Figuras 9A-C). Através da IHQ, notou-se positividade de expressão em 100% dos casos. Onde, o escore da imunohistoquímica indicou uma expressão forte de CAIX (escore 8-12) em 99 (84,6%) dos casos, moderada expressão (escore 4-6) em 18 (15,4%) dos casos e não apresentou nenhum caso no grupo negativo/fraco (escore 0-3). Entretanto, a presença de imunomarcacão positiva na grande maioria das amostras tornaram as análises mais limitadas.

De forma interessante, a expressão da CAIX não apresentou variações de expressão significativas de acordo com os diferentes subtipos de CCR. A intensidade (Figura 9D), assim como os escores de imunomarcacão (Figura 9E), demonstraram níveis menores no CCRcr em comparação com o CCRcc e CCRp, mas sem significância estatística. É possível observar que os subtipos CCRcc e CCRp demonstraram níveis de expressão semelhantes, Figura 9D. Isso se assemelha à intensidade, que foi notavelmente menor no CCRcr, Figura 9E. Dos casos de CCRcc, a maioria (77 de 90) e 18/21 dos casos de CCRp apresentaram uma expressão forte (escore 8-12), enquanto a distribuição de casos de CCRcr entre os grupos de expressão foram 4 fortes (escore 8-12) e dois casos moderados (4-6).

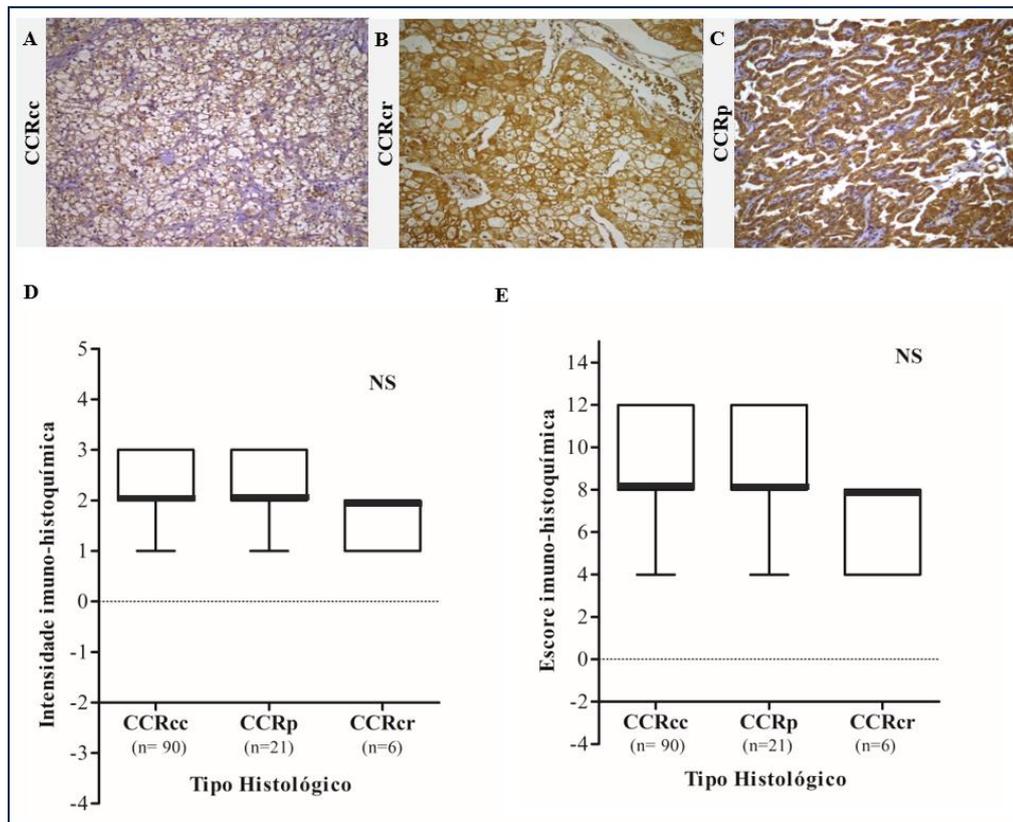


Figura 9 - Variação da expressão proteica de CAIX nos principais subtipos tumorais. A) Intensidade fraca com imagem representativa do subtipo CCRcc B) Intensidade moderada, imagem representativa do CCRcr. C) Intensidade forte sendo imagem representativa do CCRp. D) As intensidades variaram conforme os subtipos histológicos, com CCRcc e CCRp apresentando intensidades mais elevadas do que o CCRcr, mas sem

Resultados

significância. E) Variação do perfil de expressão da enzima entre os subtipos, sendo mais expresso no CCRcc, seguido pelo CCRp, sem significância. Teste estatístico: Kruskal-Wallis. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Encontramos associações significativas entre a expressão da proteína CAIX, o grau de Fuhrman e o tipo de cirurgia. Através do escore de imunomarcção, observamos maior expressão da enzima em casos com grau de Fuhrman 2 e 4. Especificamente, os escores diferiram significativamente entre os graus 1 e 4 ($p=0,038$), mostrando uma expressão mais alta da enzima em casos mais avançados. Houve também diferenças entre grau 2 e 3 ($p=0,016$) e grau 3 e 4 ($p=0,009$), como ilustrado na Figura 10A. Quando consideramos os subtipos tumorais separadamente, não encontramos associação significativa entre a expressão de CAIX e o grau de Fuhrman. Curiosamente, foi possível observar que os pacientes que foram submetidos a nefrectomia radical, apresentaram maior expressão da enzima ($p=0,025$), Figura 10B.

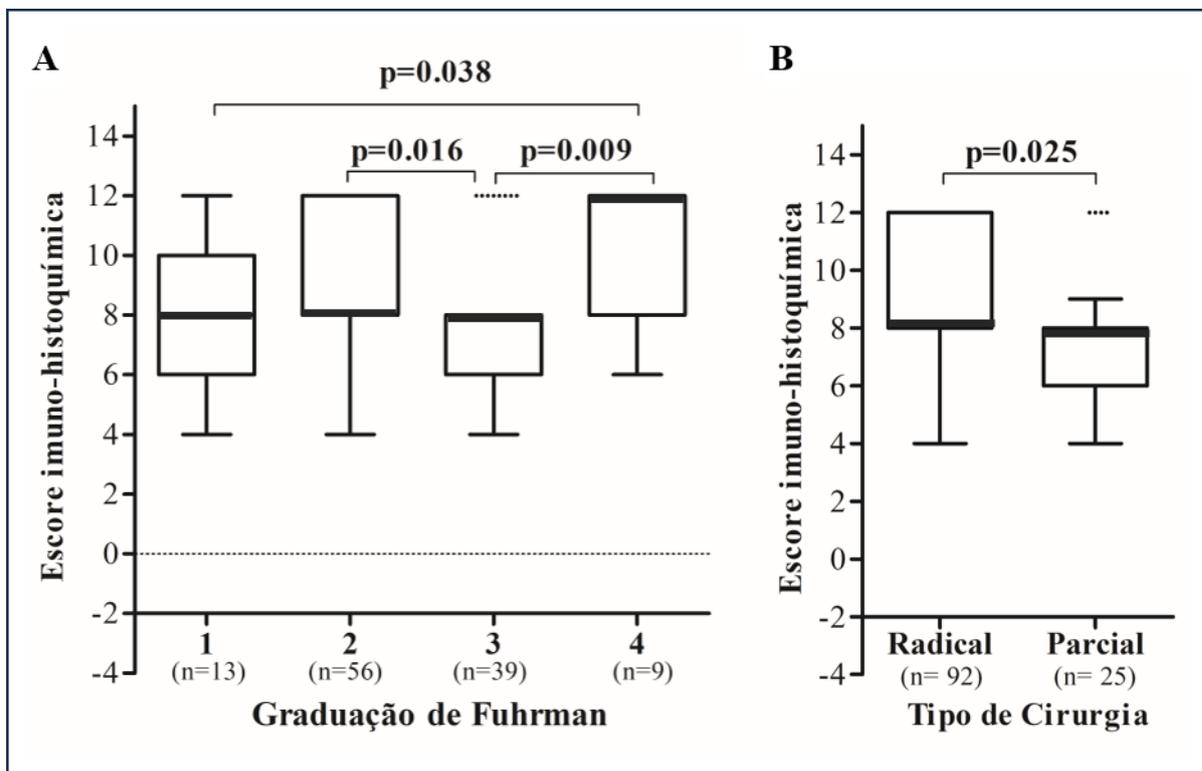


Figura 10 - Expressão proteica de CAIX associação de acordo com Grau de Fuhrman e tipo de tratamento cirúrgico. A) Associação significativa com grau de Fuhrman, sendo mais expressa nos graus 2 e 4. B) Associação da expressão com o tipo de cirurgia havendo mais expressão no tipo radical. Teste estatístico: Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Embora o valor prognóstico da expressão da proteína CAIX não tenha sido confirmado através da análise de sobrevida global, os pacientes classificados como de moderada expressão tiveram taxas de sobrevida mais baixas de modo geral e nos subtipos específicos (Figura 11A – D). Esse resultado mostra um perfil contrário do grupo CCRp ao observado na análise *in silico*, onde pacientes com alta expressão que apresentaram menor sobrevida, Figura 8C.

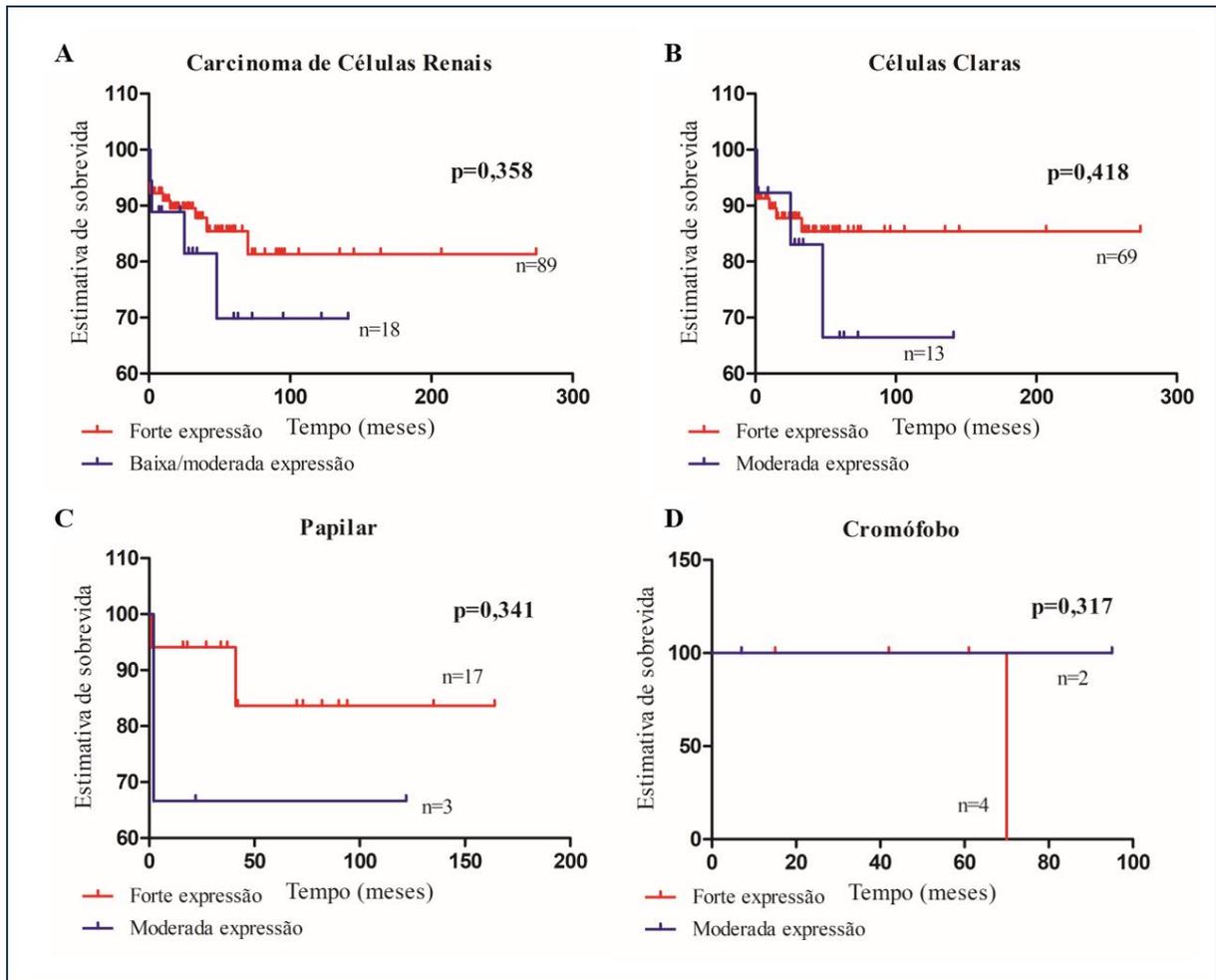


Figura 11 - Curvas de sobrevida de acordo com a expressão proteica de CAIX nos principais tipos histológicos de CCR. A) Curva de sobrevida do CCR, mostrando um perfil onde a moderada expressão associou a menor sobrevida, mas sem significância. B) Curva de sobrevida do CCRcc com perfil de moderada expressão associado a menor sobrevida, sem significância. C) Curva de sobrevida do CCRp mostrando que casos com moderada expressão tiveram pior prognóstico, mas sem significância. D) Curva de sobrevida do CCRcr. Teste estatístico: Log-rank. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Não foi observada qualquer outra associação significativa entre a expressão da proteína MTHFD2 e dados clínico-epidemiológicos, tais como sexo, idade, raça, presença de sintomas (hematúria, dor lombar e massa palpável), comorbidades (diabetes, hipertensão renal e doença renal), Índice de Massa Corporal (IMC), consumo de álcool e tabaco, história familiar de

cancer, nem com dados histopatológicos, incluindo envolvimento de gânglios linfáticos, presença de metástases, invasão angiolinfática e lateralidade.

5.3 EXPRESSÃO DE MTHFD2 NO CCR

O potencial prognóstico do MTHFD2 foi avaliado pela expressão do mRNA utilizando duas bases de dados da plataforma Km-plotter. Observamos que as amostras tumorais apresentavam uma expressão de *MTHFD2* significativamente mais elevada do que os tecidos NN. É importante ressaltar que as amostras metastáticas apresentaram uma expressão ainda maior em comparação com as amostras tumorais isoladas ($p=6,64e-69$), Figura 12A.

Comparando os subtipos histológicos do CCR com amostras renais não neoplásicas, o CCRcc apresentou maior expressão gênica que os tecidos NN, o subtipo CCRp exibiu perfil oposto e o CCRcr foi bastante semelhante ao NN (Figura 12B-D). É de salientar que o subtipo CCRcc foi o que apresentou os níveis mais elevados de *MTHFD2*.

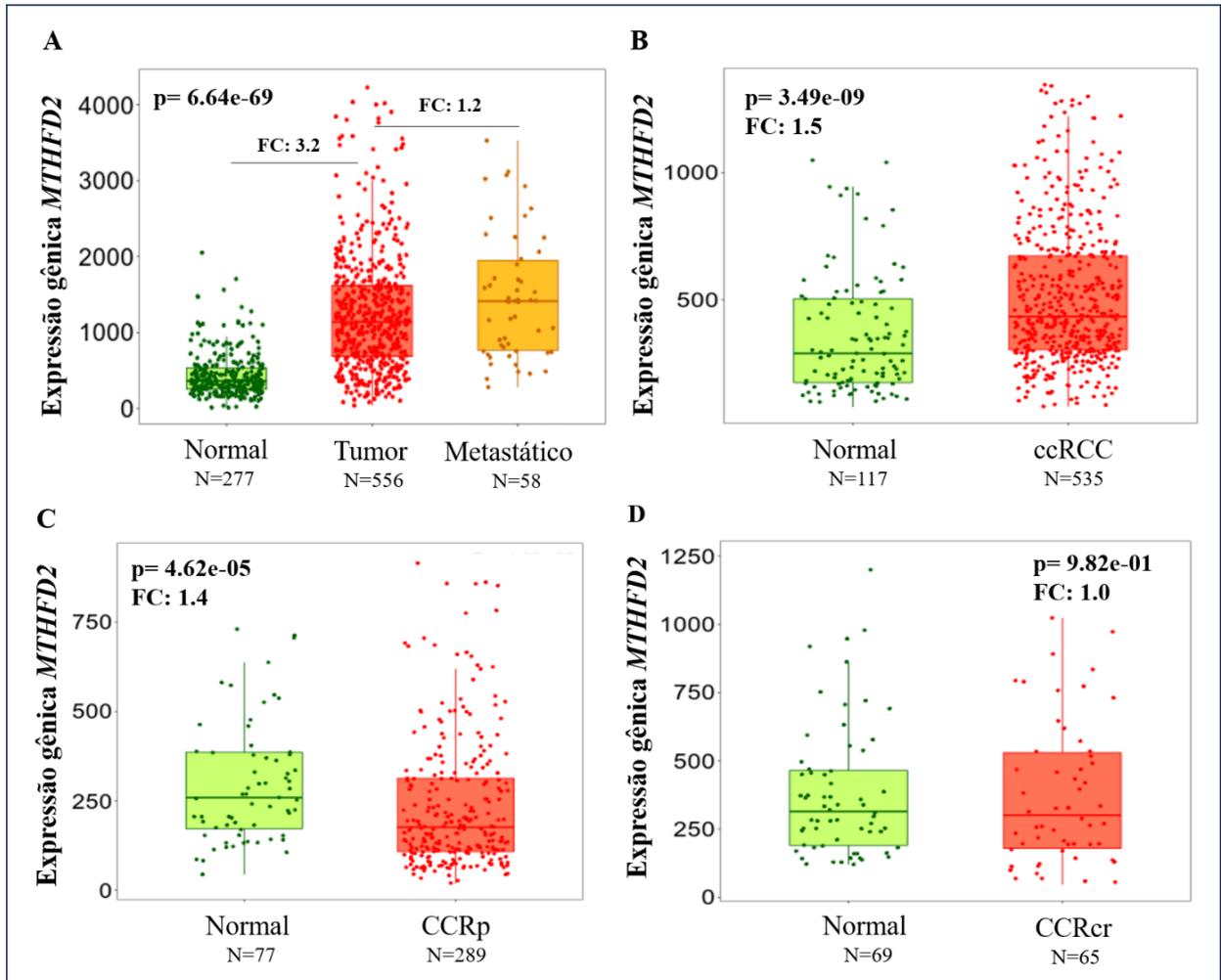


Figura 12 - Expressão do gene *MTHFD2* em amostras tumorais, não neoplásicas e metastáticas. A) Comparação da expressão do mRNA do *MTHFD2* entre amostras tumorais e não neoplásicas, evidenciando uma expressão significativamente superior em amostras tumorais, com um aumento ainda mais acentuado em amostras metastáticas. B-D) Comparação da expressão gênica do *MTHFD2* entre subtipos histológicos do CCR e tecidos não neoplásicos. O subtipo CCRcc demonstrou a mais alta expressão, em contraste, o CCRp exibiu níveis opostos, e o CCRcr manteve-se semelhante ao tecido não neoplásico. O subtipo CCRcc foi identificado com os níveis mais elevados de expressão de *MTHFD2*. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Além disso, a expressão mais elevada de *MTHFD2* foi significativamente associada a uma menor sobrevivência global dos pacientes nos subtipos CCRcc e CCRp, Figuras 13A e 13C. Curiosamente, o perfil de *MTHFD2* não mostrou associações com a sobrevivência livre de recorrência para pacientes com CCRcc (Figura 13B). Em vez disso, a alta expressão de *MTHFD2* estava relacionada com uma menor RFS na coorte de CCRp (Figura 13D).

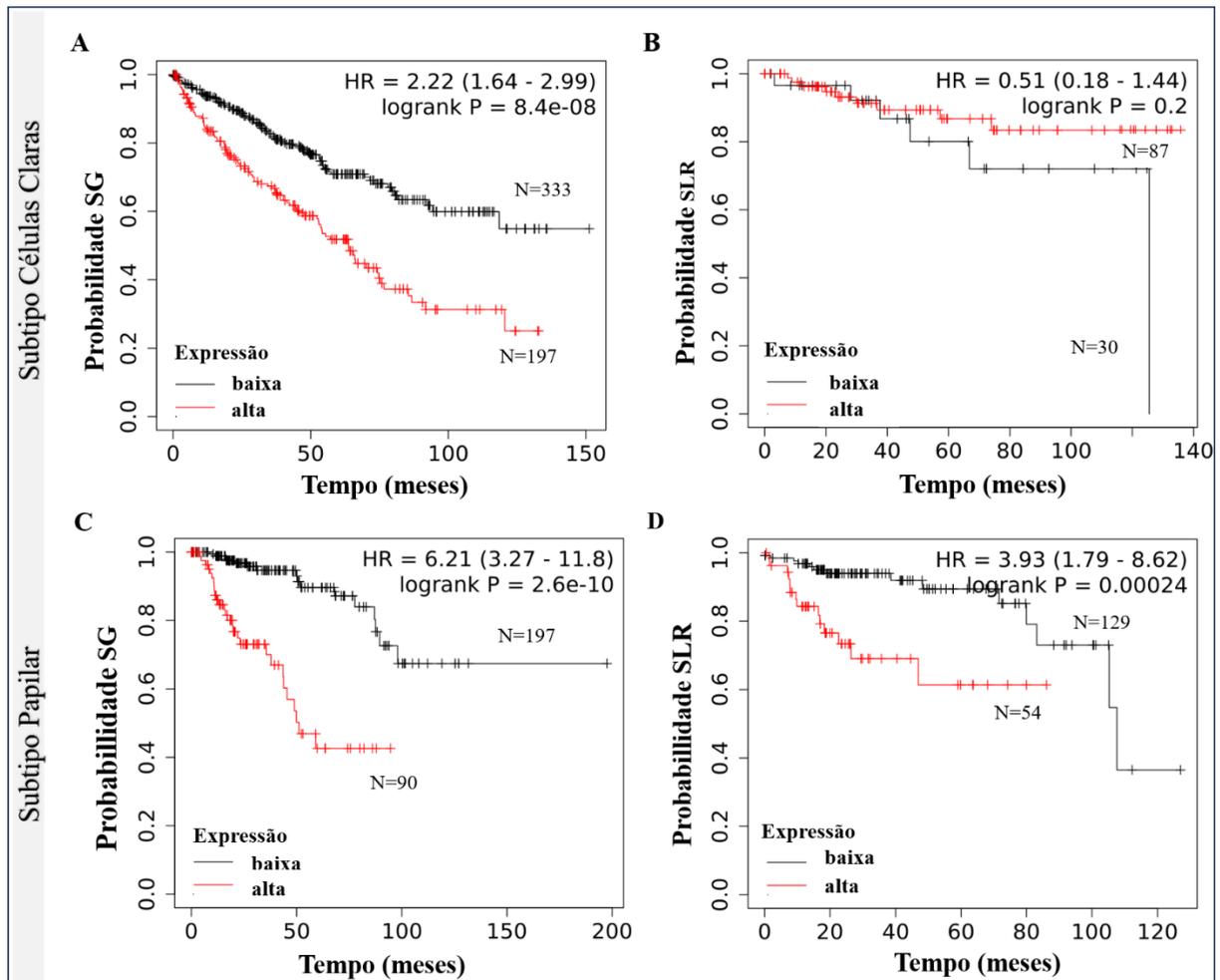


Figura 13 - Sobrevida de pacientes com CCRcc e CCRp de acordo com a expressão do gene *MTHFD2*. A - C) Associação da expressão elevada de *MTHFD2* com menor sobrevivência global nos subtipos CCRcc e CCRp. B) Ausência de associação entre o perfil de *MTHFD2* e a sobrevivência livre de recorrência em pacientes com CCRcc. (D) Associação da alta expressão de *MTHFD2* com menor tempo de recorrência na coorte de CCRp. HR: *hazard ratio*. SG: Sobrevida global. SLR: Sobrevida livre de recorrência. Teste estatístico: Log-rank. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Considerando a relevância da expressão do gene *MTHFD2* no prognóstico do CCR, investigamos o seu perfil proteico em uma coorte de 117 CCR. O padrão de imunomarcção foi predominantemente citoplasmático, com positividade membranosa encontrada apenas em alguns casos. Em relação à porcentagem de células, 66 dos 117 (56,4%) casos apresentaram mais de 76% de células positivas, 19 (16,2%) tiveram <5%, quatro casos (3,4%) tiveram 6%-25%, 10 (8,5%) tiveram 26-50%, e 18 casos (15,4%) mostraram 51%-75% de células coradas. Dezenove tumores foram negativos (16,2%), 68 apresentaram intensidade fraca (58,1%), 21 foram moderados (17,9%) e nove casos (7,7%) tiveram forte coloração (Figuras 14A-C). O escore imuno-histoquímica revelou alta expressão de *MTHFD2* (escore ≥ 4) em 60,7% dos casos, independentemente do subtipo histológico.

Curiosamente, a expressão de MTHFD2 variou significativamente de acordo com os subtipos de CCR. A intensidade (Figura 14D), bem como os escores de imunomarcção (Figura 14E), foram significativamente menores no CCRcc em comparação com CCRp e CCRcr ($p < 0,05$). A maioria dos casos de CCRp (20 de 21) e todos os cinco casos de CCRcr apresentaram expressão elevada (pontuações ≥ 4), enquanto a proporção de casos de CCRcc nos grupos baixo e alto foi bastante semelhante ($p < 0,000$, chi-quadrado).

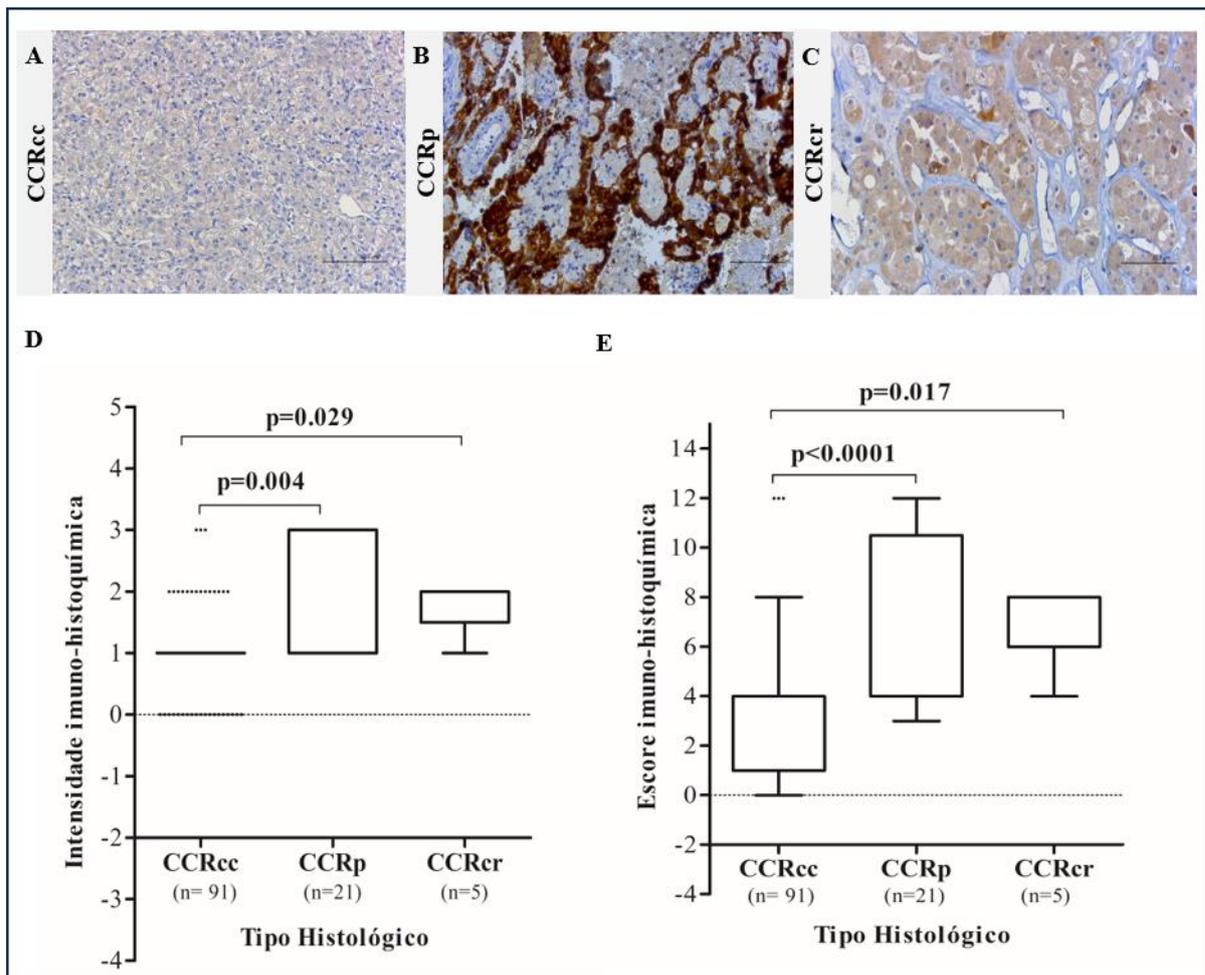


Figura 14 - Expressão proteica de MTHFD2 avaliada por imunohistoquímica nos diferentes tipos histológicos de CCR. A) Intensidade fraca com imagem representativa do subtipo CCRcc. B) Intensidade forte com imagem representativa do subtipo CCRp. C) Intensidade moderada com imagem representativa do subtipo CCRcr. D) Variação da intensidade da imunomarcção entre os subtipos de CCR. CCRp e CCRcr apresentaram intensidades mais elevadas. E) Comparação dos escores de imunomarcção entre os subtipos de CCR. Observa-se uma expressão significativamente menor de MTHFD2 no CCRcc em comparação com o CCRp e CCRcr. Teste estatístico: Kruskal-Wallis. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Foram encontradas associações significativas entre a expressão da proteína MTHFD2, o grau de Fuhrman e o diâmetro do tumor. Nos tumores classificados como de alta expressão (escores ≥ 4), 39/71 (54,9%) casos eram maiores do que 7 cm, enquanto apenas 16/45 (35,6%) casos com baixa expressão eram tumores grandes (Odds ratio= 2,2; IC95%: 1,024-4,765;

$p=0,042$). De forma semelhante, os 37/71 (52,1%) casos com MTHFD2 elevada eram Fuhrman graus 3 e 4, enquanto no grupo de baixa expressão, poucos casos 11/47 (23,4%) tinham Fuhrman graus avançados (Odds ratio= 3,918; IC95%: 1,689-9,086; $p=0,001$). Além disso, o escore de imunomarcção aumentou de acordo com os graus de Fuhrman, sendo maior nos tumores 3 e 4 em comparação com 1 e 2 ($p=0,003$), Figura 15A. Especificamente, os escores foram significativamente diferentes entre os graus 1 e 3 ($p=0,020$), conforme ilustrado na Figura 15B. Considerando os subtipos tumorais separadamente, o carcinoma de células claras manteve associação significativa entre a expressão de MTHFD2 e o grau de Fuhrman (Odds ratio = 4,364; IC95%: 1,719-11,079; $p=0,001$), o que não foi observado para os tumores papilares e cromófbos. Onde, o escore de imunomarcção também aumentou de acordo com os graus de Fuhrman, sendo maior nos tumores de grau avançado (3 e 4) em comparação com graus iniciais (1 e 2), $p=0,009$, Figura 15C. Houve uma diferença estatisticamente significativa nos escores entre os graus 1 e 3 ($p=0,011$), conforme mostrado na Figura 15D.

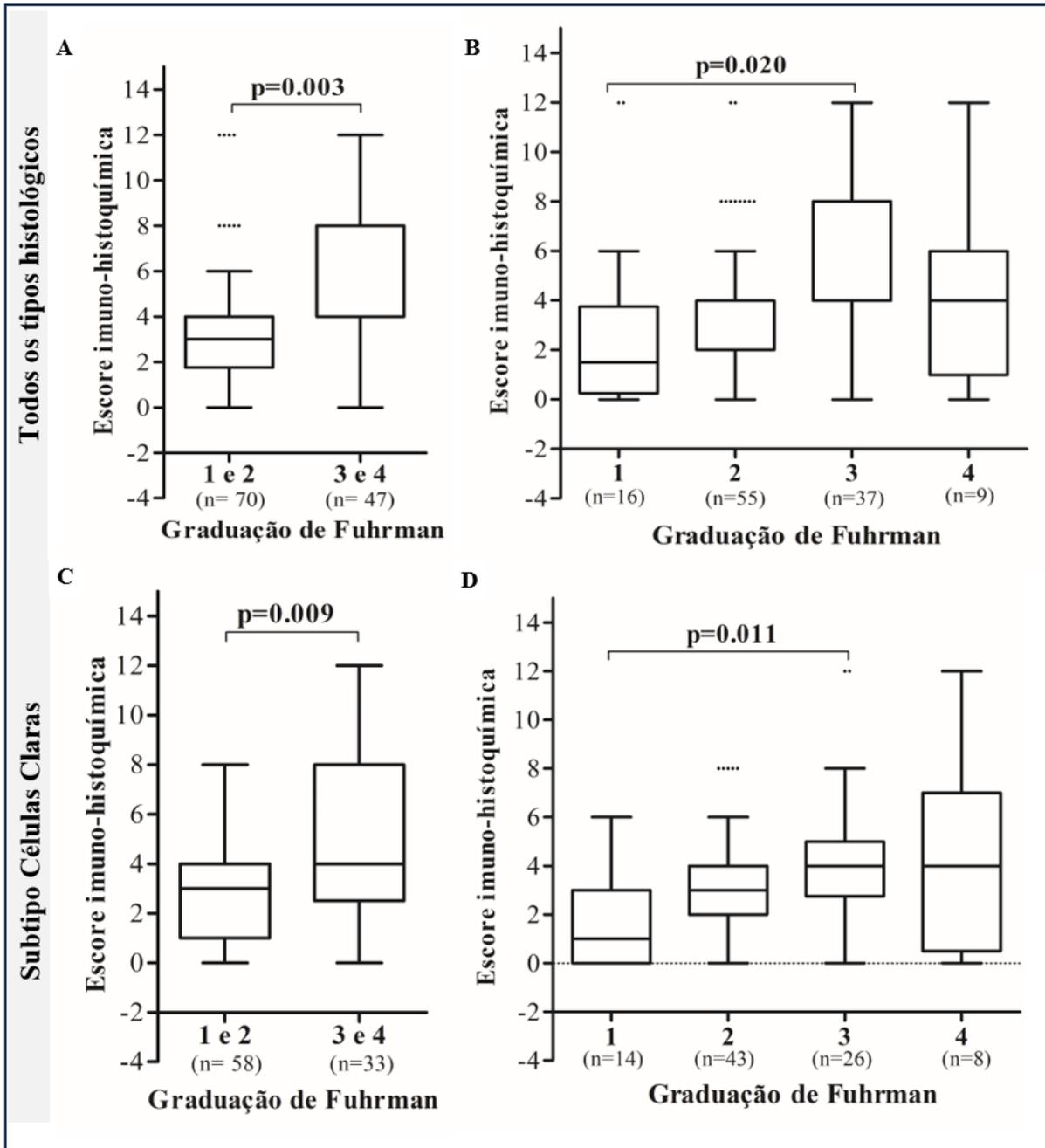


Figura 15 - Expressão proteica de MTHFD2 de acordo com Grau de Fuhrman em Carcinoma de Células Renais. A) Aumento do escore de imunomarcção conforme os graus de Fuhrman, com maior expressão nos tumores de 3 e 4. B) Diferenças significativas nos escores entre os graus 1 e 3. C) Associação entre a expressão de MTHFD2 e o grau de Fuhrman no subtipo células claras, com aumento do escore nos tumores de grau mais avançado (3 e 4) em relação aos graus iniciais. D) Diferença significativa nos escores entre os graus 1 e 3. Testes estatísticos: Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Resultados

Embora a expressão da proteína MTHFD2 não tenha demonstrado valor prognóstico nas análises de sobrevida global para os casos de CCR (Figura 16A), foi observado que pacientes com alta expressão no subtipo papilar apresentaram taxas de sobrevida mais baixas (Figura 14C). No entanto, para os subtipos CCRcc e CCRcr, a análise foi desafiadora devido à sobreposição das curvas e ao baixo número de casos no CCRcr (Figuras 16B e 16D).

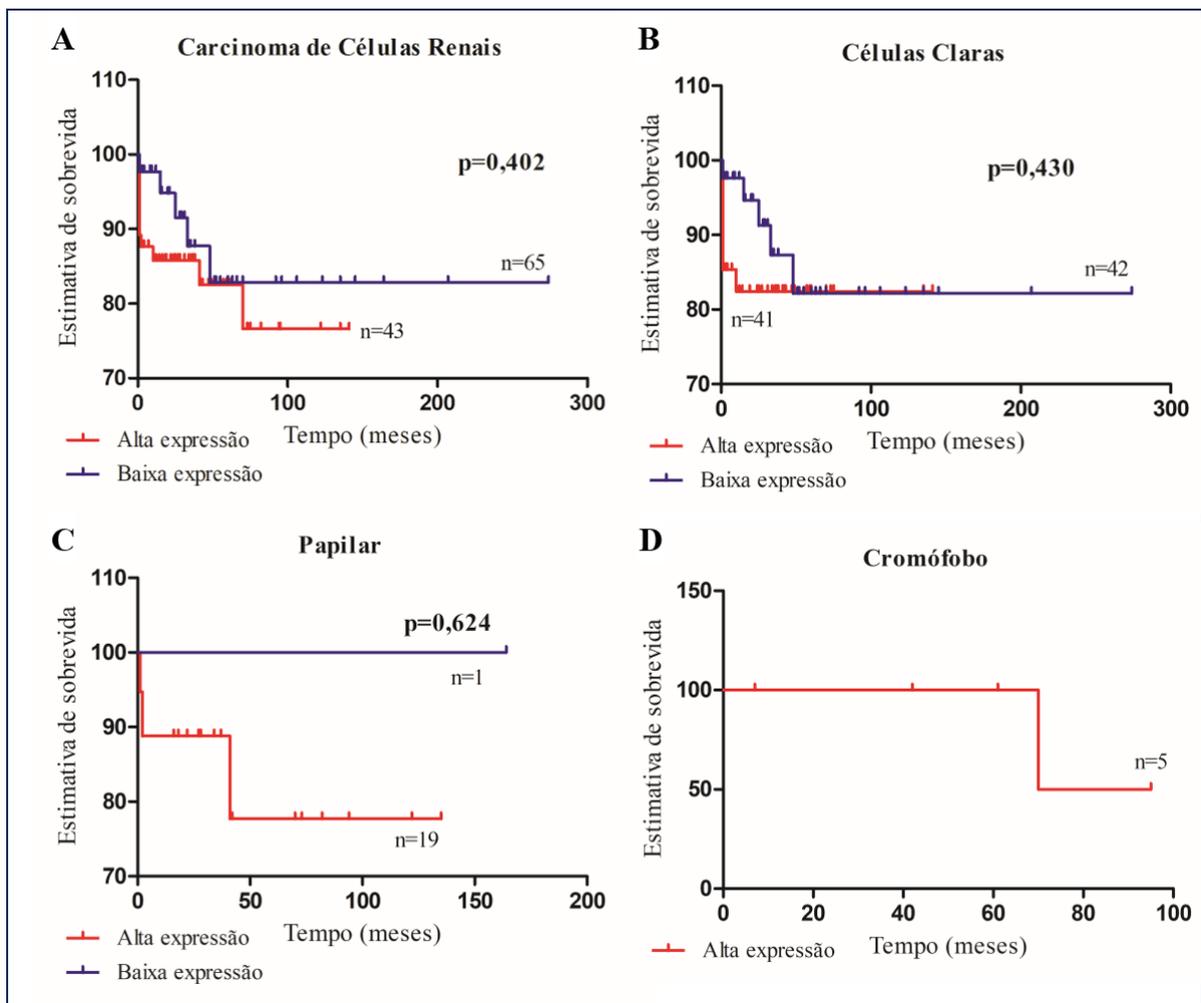


Figura 16 - Sobrevida dos pacientes como CCR de acordo com o padrão de expressão proteica de MTHFD2. A) Curva de sobrevida do CCR. B) Curva de sobrevida do CCRcc. C) Curva de sobrevida do CCRp mostrando que casos com alta expressão tiveram pior prognóstico, mas sem significância. D) Curva de sobrevida do CCRcr. Teste Estatístico: Log Rank.

Não foi observada qualquer outra associação significativa entre a expressão da proteína MTHFD2 e dados clínico-epidemiológicos, tais como sexo, idade, raça, presença de sintomas (hematúria, dor lombar e massa palpável), comorbidades (diabetes, hipertensão renal e doença renal), Índice de Massa Corporal (IMC), consumo de álcool e tabaco, história familiar de cancro, nem com dados histopatológicos, incluindo envolvimento de gânglios linfáticos, presença de metástases, invasão angiolinfática e lateralidade.

6 DISCUSSÃO

O carcinoma de células renais (CCR) é a neoplasia renal mais comum no rim, representando cerca de 2% a 3% de todos os tipos de tumores que acontecem em adultos (BAHADORAM et al., 2022; CHEN et al., 2012). Em nosso estudo, a maioria dos casos avaliados por imuno-histoquímica era de pacientes com mais de 50 anos de idade (84%, n=110) e do sexo masculino (67,2%, n=88), com proporção masculino:feminino de 2:1, semelhante aos dados observados na literatura (NG et al., 2008). Ainda sobre esta coorte, 54 pacientes (38,8%) apresentavam sobrepeso ou obesidade, 19 (13,7%) eram eutróficos, e 51,07% informaram ser fumantes e/ou consumidores de álcool. Esse perfil está em consonância com a literatura, visto que uso de tabaco e seus derivados, consumo de álcool e obesidade são fatores de risco associados ao CCR. De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, existem evidências suficientes que indicam associação causal entre tabagismo e CCR, aumentando até duas vezes o risco de carcinogênese (BAHADORAM et al., 2022; CAPITANIO et al., 2019; CORGNA et al., 2007; SAFIRI et al., 2020; THEIS et al., 2008).

O CCR apresenta um curso assintomático na maioria dos pacientes. Cerca de 5% a 10% dos casos apresentam a tríade dor no flanco, hematúria e massa palpável, comum nos estágios avançados da doença (CORGNA et al., 2007; NG et al., 2008b) e apenas 30% dos pacientes são diagnosticados com base nos sintomas (CAPITANIO; MONTORSI, 2016). A sintomatologia dos casos incluídos neste estudo foi desafiadora, pois a maioria relatou dor lombar, sintoma relacionado a diversas doenças. Somente 19,8% dos pacientes relataram, pelo menos, dois sintomas da tríade, que demonstrou associação com menor taxa de sobrevida global, sugerindo doença mais avançada neste grupo de pacientes. Observamos que 69 pacientes desenvolveram tumor no rim direito, 58 no rim esquerdo e um caso foi bilateral. Vale ressaltar que pacientes com tumor no rim esquerdo apresentaram sobrevida global, significativamente, menor. Os resultados corroboram com Strauss et al. (2019), que relataram características mais agressivas do tumor e menor sobrevida associadas a tumores no rim esquerdo, o que pode ser atribuído aos padrões de propagação linfática associado à lateralidade do órgão (STRAUSS et al., 2019).

O estadiamento do câncer renal é realizado de acordo com as diretrizes da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), considerando o tamanho do tumor (T), envolvimento dos linfonodos (N) e presença de metástases (M). A classificação TNM fornece informações importantes sobre o estágio e prognóstico da doença (AJCC, 2017). Em nossa casuística, 65,6% dos tumores estavam nos estágios iniciais (I/II) e 33,6% nos estágios avançados (III/IV). A maioria (69,5%) tinha classificação T1 ou T2, enquanto 29,8% eram T3 ou T4. Dentre os 30

casos, cujos gânglios linfáticos foram avaliados, seis (4,6%) foram N1 e metástases foram diagnosticadas em 12 pacientes (9,2%). A predominância de tumores em estágios iniciais, pequenos e com baixo incidência de metástases, pode estar relacionada com diagnóstico incidental de casos assintomáticos, pelo aumento significativo do uso de exames de imagem como tomografia e ultrassonografia, além da conscientização sobre a importância dos exames regulares (BAHADORAM et al., 2022; RINI; CAMPBELL; ESCUDIER, 2009; VERMASSEN et al., 2017). Apesar dos avanços, 40% dos pacientes com CCR localizado desenvolvem metástases mesmo após a intervenção cirúrgica (BAHADORAM et al., 2022b), reforçando a importância do diagnóstico precoce na contenção da progressão da doença (RINI; CAMPBELL; ESCUDIER, 2009).

A maioria dos casos avaliados por imuno-histoquímica era subtipo células claras (77,9%), seguido do papilar (16,6%) e cromofóbo (4,6%). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) descrevem 16 subtipos histológicos de CCR, sendo o CCRcc, CCRp e o CCRcr correspondentes a 75-80%, 15-20% e 5% dos casos respectivamente (LINDGREN; SJÖLUND; AXELSON, 2018). Ainda no contexto histopatológico, a necrose tumoral, presença de invasão angiolinfática e grau nuclear de Fuhrman são fatores importantes relacionados ao prognóstico da doença (AJCC, 2017) e foram indicadores significativos de sobrevida global nos pacientes do HC-UFTM. A proporção de pacientes que foram à óbito foi, relativamente, baixa (13,7%), sugerindo desfecho favorável da doença na população estudada. De maneira geral, o CCR é reconhecido como o câncer urogenital mais letal, com taxas de mortalidade entre 30% e 40%, que têm diminuído significativamente, na maioria dos países, devido avanços no diagnóstico precoce e nas terapias disponíveis (HSIEH et al., 2019; MILLER et al., 2018).

No entanto, 77,1% dos casos HC-UFTM (n=101) foram submetidos à nefrectomia radical, o que pode ser explicada pela predominância de tumores grandes, já que 62 pacientes apresentavam tumores com diâmetro >7 cm. Observou-se associação significativa entre nefrectomia radical e menor sobrevida global dos pacientes, o que pode estar relacionado às características clínicas e biológicas de tumores mais agressivos. Apenas 8 pacientes, foram submetidos a quimioterapia/radioterapia e/ou imunoterapia. Apesar das terapias direcionadas à inibição das vias de angiogênese e imunoterapias terem mostrado eficácia, especialmente para CCRcc com metástases. A falta de marcadores prognósticos consolidados persiste como uma lacuna tanto na literatura quanto na prática clínica. A busca por marcadores precisos que possam prever a progressão da doença e sua resposta ao tratamento continua sendo um desafio,

ênfatisando a necessidade de pesquisas nesse campo (APANOVICH et al., 2021; ZISMAN et al., 2001).

Neste contexto, estudos apontam a relação da Anidrase carbônica nove (*CA9/CAIX*) com a sobrevivência das células cancerígenas e sua influência na resistência ao tratamento, sugerindo sua viabilidade como um indicador prognóstico valioso (COURCIER et al., 2020; SHUCH; LI; BELLDEGRUN, 2008; STILLEBROER et al., 2010). A investigação torna-se ainda mais relevante porque no subtipo mais frequente de CCR (células claras), a expressão da CAIX pode ser desencadeada tanto pela inativação do gene supressor de tumor *von Hippel-Lindau (VHL)* quanto pelo ambiente de hipóxia (STILLEBROER et al., 2010). Através de análises bioinformáticas investigamos o perfil de expressão do gene *CA9*. Ao examinar duas bases de dados distintas, notamos expressão elevada e mais significativa nos tecidos tumorais e com metástases em comparação com tecidos normais. Aprofundando a investigação nos subtipos específicos do CCR, tanto o CCRcc quanto o CCRp exibiram maior expressão gênica em comparação com os tecidos não neoplásicos, diferente do CCRcr. sendo o CCRcc o que mais expressou. Semelhante ao estudo de Apanovich et al., (2021), o CCRcc foi o subtipo que mais expressou *CA9* (APANOVICH et al., 2021).

Ao analisar o perfil proteico, notamos padrão semelhante com o de expressão gênica, pois todas as amostras foram positivas para CAIX, enquanto CCRcr expressou menos enzima comparado aos outros subtipos. Esses achados estão em conformidade com o estudo de Büscheck et al., (2018), que analisou uma ampla coorte composta por casos de vários subtipos de CCR (n=1809) e observou expressão predominante da CAIX no CCRcc, enquanto o CCRcr, em sua maioria, apresentou escores negativos. Este estudo também identificou que subtipos menos comuns, como CCR papilar de células claras, neoplasia cística multilocular de células renais de baixo potencial maligno, CCR túbulo-cístico e CCR medular, exibiam forte expressão da enzima. No entanto, eles relataram ausência de expressão, na maioria dos casos papilíferos, em contraste com nossos dados. Isso sugere que a expressão de CAIX pode ter papel de expressão e possível agressividade distinto entre os subtipos de CCR, destacando a importância de investigar o seu papel nos diferentes tipos, para explorar seu potencial como biomarcador prognóstico e alvo terapêutico (BÜSCHECK et al., 2018).

Apesar de não significativo, observamos escore de expressão proteica maior nos estágios iniciais (I e II) do CCR. Esse achado alinha-se com o estudo de Apanovich et al., (2021), que descreveu diminuição coordenada nos níveis de expressão, pela técnica de PCR, de acordo com

a progressão tumoral (APANOVICH et al., 2021). De maneira interessante e contrária ao esperado, identificamos associação significativa entre expressão da CAIX e grau de Fuhrman. A comparação direta mostrou diferença entre os graus 1 e 4, indicando mediana de expressão maior no grau 4, o que sugere comportamento mais agressivo. Büscheck et al., (2018) observaram associação entre alta expressão proteica da CAIX e grau de Fuhrman menor, estádios mais baixos do tumor, ausência de metástases e maior tempo de sobrevida livre de recorrências em CCRcc. Já para o CCRp, o mesmo estudo identificou alta expressão associada com menor sobrevida livre de recorrências. Outro estudo, conduzido por Bui et al., em 2003, em uma coorte com 321 CCRcc, observaram que a presença de metástases e baixos níveis de expressão de CAIX estavam relacionados a um desfecho desfavorável da doença, demonstrando associação significativa com menor sobrevida, grau de Fuhrman, tamanho tumoral e comprometimento de linfonodos. Em nossa investigação, não pudemos estabelecer uma relação clara entre a expressão proteica e outros parâmetros clínico-histopatológicos. Uma limitação foi o baixo número de casos com metástase e envolvimento dos gânglios linfáticos, o que compromete as comparações entre grupos.

Quanto a sobrevida, observamos que tanto no subtipo CCRcc quanto no CCRp, a alta expressão do gene *CA9* foi associada a menor sobrevida global, corroborando com os estudos de Bui et al., 2003 e Büscheck et al., (2018). Já na análise da proteína, no subtipo CCRp, a expressão moderada de CAIX sugeriu menor sobrevida global comparada a alta expressão. Apesar desse achado demonstrar perfil oposto do observado na análise *in silico*, a falta de significância impossibilita elaborar conclusões, mas ressalta a complexidade do carcinoma de células renais. Destaca-se ainda que, poucos pacientes em nossa coorte evoluíram a óbito, limitando o poder da análise estatística. Estudos com coortes semelhantes também não conseguiram determinar a importância prognóstica do CAIX por expressão proteica. Zerati et al., (2013) analisaram CAIX por imuno-histoquímica em uma coorte brasileira com 95 amostras de CCRcc sem metástases e não encontraram associações com sobrevida ou parâmetros clínico-histopatológicos, como estágio do tumor, tamanho, grau de Fuhrman e invasão microvascular e da gordura perirrenal. De maneira semelhante, Ingels et al., (2017), avaliaram 143 casos de CCRcc livre de metástases e não encontraram associação entre os níveis de expressão da enzima com sobrevida global. É possível considerar a hipótese de que o baixo número de pacientes que foram à óbito e a predominância de casos sem metástases foram as principais limitações.

Esses achados lançam dúvidas sobre a real importância da CAIX no prognóstico e progressão do CCR. Com base nos resultados apresentados e em estudos similares, sugere-se

que a avaliação da CAIX em pacientes sem metástases pode não ser suficiente para inferir seu potencial valor. Portanto, são necessárias investigações mais abrangentes, com diferentes subtipos histológicos, uma vez que a maioria dos estudos se concentra no CCRcc. No entanto, os resultados do CCRp são intrigantes e merecem atenção específica.

O segundo marcador investigado em nosso estudo foi o *MTHFD2*, enzima que tem sido considerada biomarcador de prognóstico em diferentes tipos de câncer. Considerando a contribuição da *MTHFD2* para a homeostase redox através da produção de NADPH, os seus níveis elevados promovem um ambiente adequado para a progressão do câncer e metástases (JU et al., 2020). A enzima suporta a síntese de nucleotídeos, que é essencial para sustentar altas taxas de proliferação de células tumorais (REINA-CAMPOS; DIAZ-MECO; MOSCAT, 2020).

Estudos em bases de dados TCGA destacaram a hiperexpressão de *MTHFD2* em amostras tumorais em comparação com amostras não neoplásicas. Wei et al., 2019 observaram uma maior expressão de *MTHFD2* em 25 dos 31 tipos de câncer (80,6%), incluindo o subtipo CCRcc. No entanto, ainda não foram estabelecidos parâmetros específicos para aplicar a investigação do gene ou da proteína *MTHFD2* no diagnóstico do carcinoma das células renais. Por isso, analisamos associações entre expressão gênica e proteica com características clínicas e histopatológicas do CCR.

Os nossos resultados revelaram que o CCRcc apresenta expressão elevada de *MTHFD2* em comparação com as amostras normais. Em contraste, o CCRp apresenta níveis, significativamente, mais baixos, enquanto o CCRcr apresentou padrão de expressão semelhante às amostras normais. Estes resultados corroboram os de Green et al., 2019, que avaliaram a expressão gênica numa coorte de CCRcc e em amostras não neoplásicas. Como esperado para um candidato a oncogene, os níveis de *MTHFD2* foram encontrados aumentados em outros tipos de câncer, como colorretal (WEI et al., 2019), carcinoma urotelial (ZHU et al., 2022), câncer de mama (HUANG et al., 2021), carcinoma de células escamosas do esôfago (HE et al., 2020) e adenocarcinoma de pulmão (SHI et al., 2021).

A expressão do gene *MTHFD2* foi ainda maior em amostras metastáticas de CCR, sugerindo que ele promove um comportamento agressivo. Além disso, a *MTHFD2* foi associada à sobrevida global em pacientes com CCRcc e CCRp, onde a alta expressão associou-se a pior prognóstico. E, à sobrevida livre de recorrência no grupo CCRp, observando maior expressão relacionada a menor sobrevida livre de recorrências. Esses achados concordam com estudos que mostram a expressão gênica da *MTHFD2* como biomarcador prognóstico no câncer

de mama (HUANG et al., 2022; NILSSON et al., 2014), câncer colorretal (WEI et al., 2019) e carcinoma urotelial (ZHU et al., 2022). Em relação ao CCR, um estudo sobre biomarcadores relacionados ao metabolismo em CCRcc e CCRp revelou sete genes de alto risco. Dentre os quais, a superexpressão de *MTHFD2* foi associada com prognóstico ruim e óbito (HUANG et al., 2022). De forma consistente e coerente com nossos achados, Green et al., (2019) observaram superexpressão do gene *MTHFD2* nos estágios tumorais II, III e IV, bem como associada a taxas de sobrevivência mais curtas em um grupo de CCRcc (GREEN et al., 2019).

Para validar os resultados impressionantes da expressão gênica da *MTHFD2*, investigamos o padrão proteico em 117 tecidos de CCR por meio de imuno-histoquímica, um método de baixo custo, comumente utilizado para complementar o diagnóstico patológico do câncer (BELLIZZI, 2020; TARIQ et al., 2018). Apesar dos resultados acessíveis e simples fornecidos pela imunomarcção, existem poucos estudos avaliando a expressão *in situ* de *MTHFD2* associada ao prognóstico e agressividade tumoral (DENG et al., 2023; Ju et al., 2020; LI et al., 2021; LIN et al., 2018; LIU et al., 2014; YAO et al., 2021). Em nossa coorte, a alta expressão foi observada em 60,7% dos casos, independentemente do subtipo histológico. Esse perfil foi mais frequente e com escores mais elevados nos tumores pRCC e chRCC do que no ccRCC. Lin et al., 2018 examinaram a expressão proteica de *MTHFD2* em 137 tecidos de CCR e identificaram alta expressão na maioria dos casos (58,4%), especialmente, no subtipo de células claras (LIN et al., 2018). A expressão aumentada de *MTHFD2* também foi observada em uma pequena coorte de CCRcc (33 casos) em comparação com tecidos normais (34 casos), embora o estudo não tenha estabelecido associações com dados clínicos, histopatológicos ou de sobrevivência (GREEN et al., 2019). Através de experimentos *in vivo* e *in vitro*, comprovou-se que o *knockdown* de *MTHFD2* reduz o tamanho tumoral, prejudica a proliferação, migração e invasão celular (GREEN et al., 2019), sugerindo um papel essencial para progressão do CCR. Além disso, a *MTHFD2* regula positivamente o *HIF-2 α* , favorecendo a atividade glicolítica no CCRcc, que é conhecida por estar associada a níveis elevados do fator induzido por hipoxia (HIF). No contexto específico do CCRcc, mais de 80% dos casos apresentam acúmulo de *HIF- α* e amplificação de transcritos de genes-alvo do HIF devido à perda da função de *von Hippel-Lindau (VHL)* (GREEN et al., 2019). Já nos demais subtipos de CCR, a *MTHFD2* pode ser um importante fator desencadeante de distúrbios metabólicos, contribuindo para um comportamento tumoral agressivo.

Quanto a agressividade, identificamos expressão predominante de *MTHFD2* em tumores maiores (> 7cm), ou seja, com classificações T2, T3 e T4 de acordo com o TNM.

Embora nenhuma associação significativa tenha sido encontrada com estadiamento tumoral, nosso resultado está de acordo com estudos anteriores em CCR e carcinoma espinocelular de esôfago, que relataram expressão elevada da proteína associada a estadios mais avançados do tumor, considerando I/II *versus* III/IV (LIN et al., 2018; HE et al., 2020). No câncer da bexiga, enquanto a expressão gênica está associada a estadios tumorais avançados, o padrão proteico mostrou apenas tendência (DENG et al., 2023). Além disso, observamos associação significativa entre alta expressão de MTHFD2 e grau de Fuhrman mais elevado independente do subtipo histológico e ao avaliar CCRcc separadamente. Até o momento, nenhum estudo analisou esse parâmetro de acordo com o perfil de expressão de MTHFD2. Vale ressaltar que o grau de Fuhrman é uma classificação tumoral baseada na morfologia nuclear e é considerado um fator prognóstico pela diretriz da 8ª edição da AJCC (AJCC, 2017).

Curiosamente, identificamos maior proporção de amostras com expressão elevada da proteína MTHFD2 em tumores com necrose, apesar de não ter demonstrado significância estatística. De acordo com a diretriz da AJCC de 2017, a presença de necrose é um fator de prognóstico para o CCR. No entanto, estudos sobre a expressão do gene ou da proteína MTHFD2 no CCR não avaliaram esse parâmetro específico (LIN et al., 2018; HUANG et al., 2021). Em nossa análise, o padrão da proteína MTHFD2 não teve associação com sobrevida dos pacientes, apesar da alta expressão ter sugerido menor sobrevida global no grupo de CCRp. Três estudos diferentes descreveram associações significativas da imunomarcação de MTHFD2 com sobrevida, sendo um estudo realizado com 78 amostras de carcinoma do esôfago, 323 amostras de câncer de pulmão e 137 casos de CCR (HE et al., 2020; Li et al., 2021; LIN et al., 2018; YAO et al., 2021). É importante notar que a maioria dos nossos casos possui desfecho favorável da doença, ou seja, baixa taxa de óbitos e metástases. Assim, os resultados devem ser interpretados com cautela devido ao número limitado de casos em cada grupo comparado.

Não observamos variações na expressão de MTHFD2 em relação às características clínicas e epidemiológicas dos pacientes, como sexo e idade, corroborando com estudos anteriores com diferentes tipos de câncer, tais como os de Lin et al., (2018), He et al., (2020) e Li et al., (2021), Zhu et al., (2022). No entanto, no estudo de Yao et al., (2021), realizado em grande coorte de câncer de pulmão, foram identificadas associações entre a expressão de MTHFD2 e o sexo dos indivíduos.

Em resumo, a expressão elevada de MTHFD2 parece ter papel crucial no CCR, influenciando negativamente o prognóstico, pois sua hiperexpressão gênica revela desfechos desfavoráveis, como metástases e menor sobrevida nos subtipos CCRcc e CCRp. Destacamos,

portanto, a importância prognóstica da *MTHFD2* no CCR e a necessidade de explorar subtipos melhor os subtipos histológicos. A imunomarcção revelou a alta expressão de *MTHFD2* em tumores com características de maior agressividade, além da variação nos padrões de expressão entre os diferentes subtipos histológicos. Estes resultados levantam questões sobre o valor preditivo da *MTHFD2*, sugerindo a expressão do gene como um biomarcador de prognóstico valioso, enfatizando a importância de mais estudos com coortes maiores e específicas do subtipo, a fim de validar o seu significado para a investigação histopatológica do CCR e aplicação clínica.

7 CONCLUSÃO

Podemos concluir que:

1. O padrão de expressão gênica tanto da *CA9* quanto da *MTHFD2* demonstrou maior expressão nos tecidos tumorais e metastáticos. Já a expressão proteica, em ambas as enzimas, demonstrou níveis elevados de expressão nos tecidos tumorais, onde, houve alta positividade de CAIX em todos os casos e alta expressão de MTHFD2 (escore ≥ 4) em 60,7% dos casos.
2. A análise *in silico* dos níveis de expressão gênica de *CA9* demonstrou associação significativa com a sobrevida global em casos de CCRcc e CCRp. Sendo a baixa expressão associada a pior prognóstico no CCRcc e a alta expressão relacionada ao pior prognóstico no CCRp. A imunomarcção para CAIX não mostrou associação com sobrevida. O subtipo CCRp mostrou perfil de expressão proteico oposto ao observado na expressão gênica, e o perfil de expressão moderada indicou menor sobrevida global (sem significância estatística). Já a hiperexpressão gênica de *MTHFD2* teve associação significativamente a menor sobrevida global (CCRcc e CCRp) e sobrevida livre de recorrências (CCRp). Enquanto a expressão proteica apenas sugeriu que alta expressão de MTHFD2 pode estar relacionada a menor sobrevida no subtipo CCRp .
3. A expressão proteica da CAIX foi similar entre os três subtipos histológicos de CCR e mostrou associação com os parâmetros clínicos e histopatológicos grau de Fuhrman e tipo de cirurgia. Enquanto o padrão de imunomarcção de MTHFD2 diferiu entre os subtipos histológicos, sendo mais elevados nos tumores papilíferos e cromófobos. A alta expressão proteica de MTHFD2 se associou com grau de Fuhrman elevado e tumores grandes ($> 7\text{cm}$), além de ser mais elavada em tumores com presença de necrose (não significante). Os resultados de MTHFD2 sugerem valor preditivo para características histopatológicas de agressividade tumoral.

REFERÊNCIAS

- AL-AHMADIE, H. A. et al. Carbonic anhydrase IX expression in clear cell renal cell carcinoma: An immunohistochemical study comparing 2 antibodies. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 32, n. 3, p. 377–382, mar. 2008.
- APANOVICH, N. et al. The Choice of Candidates in Survival Markers Based on Coordinated Gene Expression in Renal Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 615787, 11 maio 2021.
- American Joint Committee on Cancer (AJCC). AJCC Cancer Staging Manual. **AJCC Cancer Staging Manual**. 2017;211–2.
- BARTHA, Á.; GYÖRFFY, B. TNMplot.com: A Web Tool for the Comparison of Gene Expression in Normal, Tumor and Metastatic Tissues. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 5, p. 1–12, 1 mar. 2021.
- BELLIZZI, A. M. An Algorithmic Immunohistochemical Approach to Define Tumor Type and Assign Site of Origin. **Advances in anatomic pathology**, v. 27, n. 3, p. 114–163, 1 maio 2020.
- BUI, M. H. T. et al. **Carbonic Anhydrase IX Is an Independent Predictor of Survival in Advanced Renal Clear Cell Carcinoma: Implications for Prognosis and Therapy**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://aacrjournals.org/clincancerres/article-pdf/9/2/802/2087301/df0203000802.pdf>>.
- BÜSCHECK, F. et al. Aberrant expression of membranous carbonic anhydrase IX (CAIX) is associated with unfavorable disease course in papillary and clear cell renal cell carcinoma. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 36, n. 12, p. 531.e19–531.e25, 1 dez. 2018.
- CAPITANIO, U. et al. **Epidemiology of Renal Cell Carcinoma [Figure presented]**. **European Urology** Elsevier B.V., , 1 jan. 2019.
- CAPITANIO, U.; MONTORSI, F. **Renal cancer**. The Lancet. **Anais...Lancet Publishing Group**, 27 fev. 2016.
- CECERSKA-HERYĆ, E. et al. Are antioxidant enzymes essential markers in the diagnosis and monitoring of cancer patients - A review. **Clinical biochemistry**, v. 93, p. 1–8, 1 jul. 2021.
- CHEN, X. S. et al. **Anticancer strategies based on the metabolic profile of tumor cells: Therapeutic targeting of the Warburg effect**. **Acta Pharmacologica Sinica** Nature Publishing Group, , 1 ago. 2016.
- CHEN, Y. J. et al. An introduction of an easy-operating and economical technique for tissue microarray preparation. **Journal of Clinical Pathology**, v. 73, n. 7, p. 403–407, 1 jul. 2020.
- CHEN, Z. et al. Overexpression of G6PD is associated with poor clinical outcome in gastric cancer. **Tumor Biology**, v. 33, n. 1, p. 95–101, 2012.
- CORGNA, E. et al. Renal cancer. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 64, n. 3, p. 247–262, dez. 2007.
- COURCIER, J. et al. **Carbonic anhydrase ix in renal cell carcinoma, implications for disease management**. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 1 out. 2020.
- DUCKER, G. S.; RABINOWITZ, J. D. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 1, p. 27–42, 10 jan. 2017.
- EBLE, John. Tumors of the Kidney, bladder, and related urinary structures. Series 5. **American Registry of Pathology**, December 2021.
- ECKERT, A. W. et al. Investigation of the prognostic role of carbonic anhydrase 9 (CAIX) of the cellular mRNA/protein level or soluble CAIX protein in patients with oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, 2 jan. 2019.
- FUKUMURA, D. et al. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 15, n. 5, p. 325–340, 1 maio 2018.

- GONTHIER, K. et al. Reprogramming of Isocitrate Dehydrogenases Expression and Activity by the Androgen Receptor in Prostate Cancer. **Molecular cancer research : MCR**, v. 17, n. 8, p. 1699–1709, ago. 2019.
- GREEN, N. H. et al. MTHFD2 links RNA methylation to metabolic reprogramming in renal cell carcinoma. **Oncogene**, v. 38, n. 34, p. 6211, 22 ago. 2019.
- GUSTAFSSON SHEPPARD, N. et al. The folate-coupled enzyme MTHFD2 is a nuclear protein and promotes cell proliferation. **Scientific Reports**, v. 5, 13 out. 2015.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation**. **Cell**, 4 mar. 2011.
- HE, H. et al. High Expression of Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase 2 (MTHFD2) in Esophageal Squamous Cell Carcinoma and its Clinical Prognostic Significance. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 26, 23 fev. 2020.
- HE, L. et al. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. **Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**, v. 44, n. 2, p. 532–553, 1 dez. 2017.
- HSIEH, J. J. et al. Renal cell carcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 9 mar. 2017.
- HUANG, J. et al. MTHFD2 facilitates breast cancer cell proliferation via the AKT signaling pathway. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 22, n. 1, 2 maio 2021.
- HUMPHREY, P. A. et al. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours. **European Urology**, v. 70, n. 1, p. 106–119, 1 jul. 2016.
- INAMURA, K. Renal Cell Tumors: Understanding Their Molecular Pathological Epidemiology and the 2016 WHO Classification. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 10, 20 out. 2017.
- INGELS, A. et al. Vimentin over-expression and carbonic anhydrase IX under-expression are independent predictors of recurrence, specific and overall survival in non-metastatic clear-cell renal carcinoma: a validation study. **World Journal of Urology**, v. 35, n. 1, p. 81–87, 1 jan. 2017.
- ISMAIL, T. et al. **Interplay between mitochondrial peroxiredoxins and ROS in cancer development and progression**. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 1 set. 2019.
- JU, H. Q. et al. NADPH homeostasis in cancer: functions, mechanisms and therapeutic implications. **Signal Transduction and Targeted Therapy** 2020 5:1, v. 5, n. 1, p. 1–12, 7 out. 2020.
- KIM, E. K.; KIM, H. M.; KOO, J. S. Expression of Glucose Metabolism-Related Proteins in Adrenal Neoplasms. **Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology**, v. 88, n. 6, p. 424–433, 1 nov. 2021.
- KIM, K. H. et al. In-house manual construction of high-density and high-quality tissue microarrays by using homemade recipient agarose-paraffin blocks. **Korean Journal of Pathology**, v. 47, n. 3, p. 238–244, 2013.
- KONNO, M. et al. The one-carbon metabolism pathway highlights therapeutic targets for gastrointestinal cancer (Review). **International journal of oncology**, v. 50, n. 4, p. 1057–1063, 1 abr. 2017.
- KRUPENKO, N. I. et al. Aldh1l2 knockout mouse metabolomics links the loss of the mitochondrial folate enzyme to deregulation of a lipid metabolism observed in rare human disorder. **Human genomics**, v. 14, n. 1, 1 dez. 2020.

- LABA, P.; WANG, J.; ZHANG, J. Low level of isocitrate dehydrogenase 1 predicts unfavorable postoperative outcomes in patients with clear cell renal cell carcinoma. **BMC cancer**, v. 18, n. 1, p. 852, ago. 2018.
- LEE, S. H.; GRIFFITHS, J. R. **How and why are cancers acidic? Carbonic anhydrase ix and the homeostatic control of tumour extracellular ph.** **CancersMDPI AG**, , 1 jun. 2020.
- LI, Q. et al. MTHFD2 promotes ovarian cancer growth and metastasis via activation of the STAT3 signaling pathway. **FEBS open bio**, v. 11, n. 10, p. 2845–2857, 1 out. 2021.
- LIN, H. et al. MTHFD2 overexpression predicts poor prognosis in renal cell carcinoma and is associated with cell proliferation and vimentin-modulated migration and invasion. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 51, n. 2, p. 991–1000, 1 nov. 2018.
- LINDGREN, D.; SJÖLUND, J.; AXELSON, H. Tracing Renal Cell Carcinomas back to the Nephron. **Trends in Cancer**, v. 4, n. 7, p. 472–484, 1 jul. 2018.
- LJUNGBERG, B. Nephron-Sparing Surgery Strategy: The Current Standard for the Treatment of Localised Renal Cell Carcinoma. **European Urology Supplements**, v. 10, n. 3, p. e49–e51, 1 maio 2011.
- LIRA et al. **Atualizações em Nefropatologia.** [s.l., Capitulo 2.] Editora Creative, 2022.
- BAHADORAM, S. et al. Giornale Italiano di Nefrologia In Depth Review Renal cell carcinoma: an overview of the epidemiology, diagnosis, and treatment. 2022.
- LU, Y.-X. et al. ME1 Regulates NADPH Homeostasis to Promote Gastric Cancer Growth and Metastasis. **Cancer research**, v. 78, n. 8, p. 1972–1985, abr. 2018.
- LYON, P. et al. B vitamins and one-carbon metabolism: Implications in human health and disease. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 1–24, 1 set. 2020.
- MANINI, C.; LÓPEZ, J. I. The Labyrinth of Renal Cell Carcinoma. **Cancers**, v. 12, n. 2, 1 fev. 2020.
- MILLER, K. D. et al. Cancer Statistics for Hispanics/Latinos, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 425–445, nov. 2018.
- MOCH, H. An overview of renal cell cancer: pathology and genetics. **Seminars in cancer biology**, v. 23, n. 1, p. 3–9, fev. 2013.
- MORENO-SÁNCHEZ, R. et al. Physiological Role of Glutamate Dehydrogenase in Cancer Cells. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 9 abr. 2020.
- MOTZER, R. J. et al. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 12, p. 1103–1115, 21 mar. 2019.
- NAGY, Á.; MUNKÁCSY, G.; GYÖRFFY, B. Pancancer survival analysis of cancer hallmark genes. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 6047, 1 dez. 2021.
- NG, C. S. et al. **Renal cell carcinoma: Diagnosis, staging, and surveillance.** **American Journal of Roentgenology**, out. 2008.
- NILSSON, R. et al. Metabolic enzyme expression highlights a key role for MTHFD2 and the mitochondrial folate pathway in cancer. **Nature Communications**, v. 5, 23 jan. 2014.
- NOGUCHI, K. et al. The mitochondrial one-carbon metabolic pathway is associated with patient survival in pancreatic cancer. **Oncology letters**, v. 16, n. 2, p. 1827–1834, 1 ago. 2018.
- OMS, Organização mundial de saúde, 2016.
- PIRES, A. R. C.; DA MATTA ANDREIUOLO, F.; DE SOUZA, S. R. TMA for all: A new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built needles. **Diagnostic Pathology**, v. 1, n. 1, 2006.
- RASMUSSEN, F. Metastatic renal cell cancer. **Cancer imaging : the official publication of the International Cancer Imaging Society**, v. 13, n. 3, p. 374–380, 2013.

- RATHER, G. M. et al. **In cancer, all roads lead to NADPH. Pharmacology and Therapeutics** Elsevier Inc., 1 out. 2021.
- REINA-CAMPOS, M.; DIAZ-MECO, M. T.; MOSCAT, J. **The complexity of the serine glycine one-carbon pathway in cancer. Journal of Cell Biology** Rockefeller University Press, , 6 jan. 2020.
- RINI, B. I.; CAMPBELL, S. C.; ESCUDIER, B. Renal cell carcinoma. **The Lancet**, v. 373, n. 9669, p. 1119–1132, 28 mar. 2009.
- RODRÍGUEZ JASSO, V. H.; SERRANO BRAMBILA, E.; MALDONADO ALCARAZ, E. Prognostic factors in localised and regionally advanced renal cell carcinoma. **Actas Urológicas Espanolas**, v. 32, n. 3, p. 320–324, 2008.
- SAFIRI, S. et al. The burden of kidney cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990–2017. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.
- SHI, Y. et al. MTHFD2 promotes tumorigenesis and metastasis in lung adenocarcinoma by regulating AKT/GSK-3 β / β -catenin signalling. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 25, n. 14, p. 7013, 1 jul. 2021.
- SHUCH, B.; LI, Z.; BELLDEGRUN, A. S. **Carbonic anhydrase IX and renal cell carcinoma: Prognosis, response to systemic therapy, and future vaccine strategies. BJU International, Supplement**, 2008.
- SNEZHKINA, A. V. et al. ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, 2019.
- SPENCER, N. Y.; STANTON, R. C. Glucose 6-phosphate dehydrogenase and the kidney. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 26, n. 1, p. 43–49, jan. 2017.
- STILLEBROER, A. B. et al. Carbonic Anhydrase IX in Renal Cell Carcinoma: Implications for Prognosis, Diagnosis, and Therapy. **European Urology**, v. 58, n. 1, p. 75–83, 1 jul. 2010.
- STRAUSS, A. et al. Tumor laterality in renal cancer as a predictor of survival in large patient cohorts A STROBE compliant study. **Medicine (United States)**, v. 98, n. 17, 1 abr. 2019.
- TAKACOVA, M. et al. Carbonic anhydrase IX is a clinically significant tissue and serum biomarker associated with renal cell carcinoma. **Oncology Letters**, v. 5, n. 1, p. 191–197, 1 jan. 2012.
- TARIQ, N. et al. **ROLE OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN SUBTYPING RENAL CELL CARCINOMAS WITH OVERLAPPING MORPHOLOGICAL FEATURES** *Ayub Med Coll Abbottabad*. [s.l]. Disponível em: <<http://www.jamc.ayubmed.edu.pk>>.
- THEIS, R. P. et al. Smoking, environmental tobacco smoke, and risk of renal cell cancer: A population-based case-control study. **BMC Cancer**, v. 8, 24 dez. 2008.
- TOMITA, Y. Early renal cell cancer. **International journal of clinical oncology**, v. 11, n. 1, p. 22–27, fev. 2006.
- TOSTAIN, J. et al. Carbonic anhydrase 9 in clear cell renal cell carcinoma: A marker for diagnosis, prognosis and treatment. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 18, p. 3141–3148, 1 dez. 2010.
- VAN DER MIJN, J. C. et al. Transcriptional and metabolic remodeling in clear cell renal cell carcinoma caused by ATF4 activation and the integrated stress response (ISR). **Molecular carcinogenesis**, v. 61, n. 9, p. 851–864, 1 set. 2022.
- VERMASSEN, T. et al. Therapeutic approaches in clear cell and non-clear cell renal cell carcinoma. **Acta Clinica Belgica: International Journal of Clinical and Laboratory Medicine**, v. 72, n. 1, p. 12–18, 2 jan. 2017.
- WEI, Y. et al. The effect of MTHFD2 on the proliferation and migration of colorectal cancer cell lines. **OncoTargets and Therapy**, v. 12, p. 6361–6370, 2019.

WHO, World organization, 2020.

YAO, S. et al. One carbon metabolism in human lung cancer. **Translational lung cancer research**, v. 10, n. 6, p. 2523–2538, 1 jun. 2021.

YU, C. et al. Down-regulation of MTHFD2 inhibits NSCLC progression by suppressing cycle-related genes. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 24, n. 2, p. 1568–1577, 1 jan. 2020.

ZERATI, M. et al. Carbonic anhydrase IX is not a predictor of outcomes in non-metastatic clear cell renal cell carcinoma - a digital analysis of tissue microarray. **International Braz J Urol**, v. 39, n. 4, p. 484–492, 2013.

ZHU, L. et al. MTHFD2 is a potential oncogene for its strong association with poor prognosis and high level of immune infiltrates in urothelial carcinomas of bladder. **BMC Cancer**, v. 22, n. 1, 1 dez. 2022.

ZHU, Z.; LEUNG, G. K. K. More Than a Metabolic Enzyme: MTHFD2 as a Novel Target for Anticancer Therapy? **Frontiers in oncology**, v. 10, 28 abr. 2020.

ZISMAN, A. et al. Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 6, p. 1649–1657, 15 mar. 2001

ANEXOS**Anexo I- Protocolo de imuno-histoquímica CAIX**

1. Raspar o excesso de parafina (costas da lâmina) e deixar 5 minutos na estufa;
 2. Desparafinizar os cortes em xilol por no mínimo 25 minutos;
 3. Passar as lâminas em soluções de álcool absoluto, 90%, 80% e 70%, água corrente e água destilada;
 4. Recuperação antigênica: Panela Pascal (Tampão CITRATO 1:10 - diluído em água destilada);
 5. Destampar os tubetes e deixar as lâminas esfriarem no tampão por 25 minutos (TA);
 6. Escorrer o tampão e lavar as lâminas com água destilada 6x e 1x com tampão PBS uso;
 7. Enxugar em volta do corte e colocar as lâminas em uma cuba escura e úmida;
 8. Passar a caneta (Dako Pen) em volta do corte;
 9. Bloqueio da peroxidase (reagente kit EasyPath): cobrir o corte. Incubar por 30 minutos TA;
 10. Lavar 2x de 5 minutos cada com PBS uso;
 11. Enxugar em volta do corte;
 12. Bloqueio das proteínas (reagente kit EasyPath): cobrir o corte. Incubar por 25 minutos TA;
 13. Não lavar;
 14. Enxugar em volta do corte;
 15. Incubar com anticorpo primário (Anti-CA9 policlonal de rato, FNab01167, 1:70, Finetest) - diluir em PBS/BSA2% (4mL PBS uso + 0,08g albumina bovina) - Overnight na geladeira;
 16. Lavar 2x de 5 minutos cada com PBS uso;
 17. Enxugar em volta do corte;
 18. Incubar com Polímero (reagente kit EasyPath): cobrir o corte. Incubar por 1 hora TA;
 19. Lavar 2x de 5 minutos cada com PBS uso;
 20. Enxugar em volta do corte;
 21. Revelar com DAB-DAKO (1mL substrato + 1 gota cromógeno) por 3 minutos TA. Parar a reação com água corrente;
 22. Contra corar com Hematoxilina por 30 segundos;
 23. Lavar em água corrente por 2 minutos
 24. Desidratar em álcool absoluto, diafanizar em xilol e montar com lamínula e entelan.
- Controle positivo: Carcinoma de células renais subtipo células claras.

Anexo II- Protocolo de imuno-histoquímica MTHFD2

1. Raspar o excesso de parafina (costas da lâmina) e deixar 5 minutos na estufa;
 2. Desparafinizar os cortes em xilol por no mínimo 25 minutos;
 3. Passar as lâminas em soluções de álcool absoluto, 90%, 80% e 70%, água corrente e água destilada;
 4. Recuperação antigênica: Panela Pascal (Tampão CITRATO 1:10 - diluído em água destilada);
 5. Destampar os tubetes e deixar as lâminas esfriarem no tampão por 25 minutos (TA);
 6. Escorrer o tampão e lavar as lâminas com água destilada 6x e 1x com tampão PBS uso;
 7. Enxugar em volta do corte e colocar as lâminas em uma cuba escura e úmida;
 8. Passar a caneta (Dako Pen) em volta do corte;
 9. Bloqueio da peroxidase (reagente kit EasyPath): cobrir o corte. Incubar por 30 minutos TA;
 10. Lavar 2x de 5 minutos cada com PBS uso;
 11. Enxugar em volta do corte;
 12. Bloqueio das proteínas (reagente kit EasyPath): cobrir o corte. Incubar por 25 minutos TA;
 13. Não lavar;
 14. Enxugar em volta do corte;
 15. Incubar com anticorpo primário (Anti-MTHFD2 policlonal de rato, HPA049657, 1:40, Sigma) - diluir em PBS/BSA2% (4mL PBS uso + 0,08g albumina bovina) - Overnight na geladeira;
 16. Lavar 2x de 5 minutos cada com PBS uso;
 17. Enxugar em volta do corte;
 18. Incubar com Polímero (reagente kit EasyPath): cobrir o corte. Incubar por 1 hora TA;
 19. Lavar 2x de 5 minutos cada com PBS uso;
 20. Enxugar em volta do corte;
 21. Revelar com DAB-DAKO (1mL substrato + 1 gota cromógeno) por 5 minutos TA. Parar a reação com água corrente;
 22. Contra corar com Hematoxilina por 30 segundos;
 23. Lavar em água corrente por 2 minutos
 24. Desidratar em álcool absoluto, diafanizar em xilol e montar com lamínula e entelan.
- Controle positivo: rim normal.

Anexo III- Confecção dos *tissues microarrays*- TMA

- 1- Cortar o molde de coreldraw e demarcar os pinos na fita adesiva;
- 2- Colocar os blocos doadores na estufa pôr no mínimo 5 minutos de 4 em 4;
- 3- Coletar áreas demarcadas do bloco ainda morno;
- 4- Com auxílio de uma pinça pegar o material coletado e posicioná-lo acima do seu local pré-estipulado no mapa de localização;
- 5- Após posicionar todos os fragmentos coletados, colocar molde para inserção da parafina líquida;
- 6- Deixar a parafina esfriar por 40 minutos;
- 7- Desmoldar os blocos e dar banho de parafina;
- 8- Cortar no micrótomo 3 μ , utilizando lâminas com silano.