

**Lilian Campos Pires**

***IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  
POSSÍVEIS MARCADORES MOLECULARES  
EM CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS  
CLARAS***

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Genética, para obtenção do  
Título de Mestre.

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Peitl Junior**

---

São José do Rio Preto – SP  
Fevereiro de 2009

Lilian Campos Pires

***IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  
POSSÍVEIS MARCADORES MOLECULARES  
EM CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS  
CLARAS***

Comissão julgadora

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

Presidente e Orientador:

2º Examinador:

3º Examinador:

4º Examinador:

5º Examinador:

São José do Rio Preto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/2009

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Estudos Genômicos, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) de São José do Rio Preto, SP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

***“ Para ser grande sê inteiro,  
Nada teu exagera ou exclui,  
Põe quanto és no mínimo que fazes,  
Assim, em cada lago  
A Lua toda brilha  
Porque alta vive...”***

**Fernando Pessoa**

## **Dedicatória Especial**

Ao meu filho Vinícius, a pessoinha mais especial que existe nesse mundo. Por ser meu estímulo e alívio em todos os momentos difíceis quando pensei em desistir... A força do nosso amor me trouxe até aqui...

“...futebol sem bola, Piu-piu sem Frajola, sou eu assim sem você...”

## **Dedicatória**

Àqueles que foram os responsáveis por esta realização, meus pais, Helena e Vitorino, que por diversas vezes se sacrificaram em nome de meu sonho e que, antes disso, acreditaram nele e nunca me deixaram desistir antes de realizá-lo. O meu muito obrigada pelo ombro na hora de desespero e pelo sorriso nas conquistas. Meus ANJOS, sem a sua presença constante durante estes anos eu não teria conseguido vencer todas as dificuldades! Tenham a absoluta certeza de que esta vitória também é de vocês!!

Às minhas irmãs que sempre foram minhas companheiras durante esta jornada. À Mimica que com seu jeitinho especial sempre me conquistou mesmo nas horas de briga. À Gé que durante estes anos foi meu segundo Anjo da Guarda, me salvando nos momentos difíceis, tenha certeza de que seu sacrifício será por mim lembrado para o resto da minha vida, e, por mais que eu agradeça nunca conseguirei alcançar a grandeza de seu gesto! À Laine sempre disposta a ajudar, e que me deu o meu maior presente, meu sobrinho querido, o Felipe.

## Agradecimento Especial

Ao meu orientador, Dr. Paulo Peitl Junior... Paulinho...

**Pela honra de ser sua primeira aluna, o que pra mim sempre foi motivo de orgulho...** Pela confiança, paciência e apoio constantes... Principalmente por compartilhar o meu entusiasmo e amor pela ciência... E por tudo que passamos juntos até aqui...



## Agradecimentos

À minha co-orientadora Dra. Paula Rahal, por ser mais que uma orientadora nos momentos necessários... Por me acolher no seu laboratório e confiar na minha capacidade científica me oferecendo a oportunidade de aprender sempre mais...

Ao Dr. Daniel Seabra e toda a equipe da Uro-Oncologia do Hospital de Câncer de Barretos pelo auxílio necessário e pela coleta das amostras utilizadas neste estudo.

À Dra. Lígia Maria Kerr, patologista do Hospital de Câncer de Barretos, pela contribuição nas análises histopatológicas das amostras.

À Tamara e o Tasso do Banco de Tumores do Hospital de Câncer de Barretos, pelo auxílio e disponibilidade quando precisei separar minhas amostras.

Aos Pacientes portadores de carcinoma renal de células claras, pois sem eles e a sua boa vontade em doar as amostras, este trabalho não teria sido realizado.

Ao Prof. Dr. José Antônio Cordeiro do Departamento de Epidemiologia e Saúde Coletiva da FAMERP pela disponibilidade e colaboração nas análises estatísticas.

À Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza pela amizade e auxílio em todos os dias no laboratório.

Aos professores do Departamento de Biologia pelo apoio e acolhida nesses anos.

Às coordenadora e a vice-coordenadora do Programa de Pós Graduação, Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingues e Profa. Dra. Lílian Madi-Ravazzi, pela atenção e disponibilidade em todos os momentos necessários e pela preocupação constante na nossa formação.

Aos membros da Banca Examinadora pela disponibilidade em ler e avaliar meu trabalho auxiliando em muito na minha formação.

Aos funcionários da Seção de pós-graduação pela disposição e auxílio durante todos esses anos.

À Lenira pelo carinho e disposição todos os dias no laboratório, sempre procurando nos ajudar em tudo.

## **Agradecimentos mais que especiais**

Ao meu eterno amigo Fernando Barbano e toda sua família... Geni, Elzio, Dudu e todos os outros... Por tudo...Por serem a minha segunda família...Por nunca me deixarem sozinha mesmo nos piores momentos e acima de tudo por devotarem a mim e ao meu filho um amor incondicional !!!!!!!

Meu muito obrigada por tudo... cada gesto de todos vocês nunca será esquecido....

## **Agradecimentos mais que especiais**

Ao meu amigo Buxo, Dr. Sergio de Moraes Aoki por todo o carinho e dedicação no tempo em que convivemos juntos no laboratório e mesmo depois à distância nas conversas científicas e nem tão científicas assim

!!!! E também pelas muitas baladas e risadas !!!!

À minha amiga querida Marina Curado Valsechi por todo carinho e amizade nesses dois anos. Pelo otimismo freqüente e pelo bom humor quando insistíamos em atormentá-la!!!! Além de companheira de ciência, uma amiga pra todas as horas e baladas !!!!!

À minha amiga Erica pelo carinho, pela paciência e principalmente pelo ombro amigo sempre !!!! Pelas consultorias científicas durante todo esse tempo.... E claro, mais recentemente uma nova amiga de baladas

!!!!

Amigas Superpoderosas... nunca vou esquecê-las !!!!

“ ...I'll be there for you these five words I swear to you...”

Ao meu companheiro de mestrado e amigo pra todas as horas, Marcelo Rúbio, por seu carinho e dedicação desde o momento em que nos conhecemos!!!!

Aos amigos do Grupo Câncer, Paulinho, Marina, Erica, Marília, Jucimara, Fernanda, André e Natália, que muito além de companheiros de laboratório foram meus amigos durante toda a caminhada.

Aos meus companheiros de laboratório, Paola, Carol Bonfim, Carol Jardim, Cíntia , Paulo , Felipe, Valéria, Lilian Miuky, Bianca, Renata, Ana Cláudia e Leonardo por todos os momentos bons e felizes durante meus dias no laboratório.

Aos meus amigos conquistados durante a pós-graduação, Hederson, Márcia, Julcimary, Mariana, Natália, Fabrício, Juliana, Adriana, nenedia e Maza por estarem presentes nessa etapa tão importante na minha vida !!!! O meu muito obrigada por todas as alegrias !!!

À minha amiga Beatriz Paixão e ao Gabi por toda a paciência e carinho quando eu precisei afastar o Paulinho de vocês !!!!!

Aos meus amigos da antiga, Fabiana Bettoni (Bu), Mariana Brait (Miss), Márcia Dellamano (Ceta) e o Jaó por tudo o que passamos desde a época da faculdade e do Ludwig... Tanta coisa que nem caberia aqui....

Meu amor por vocês é enorme!!!!!!

Ao meu amigo e companheiro de imprinting, Daniel Vidal (Big) por toda a ajuda e por todo o carinho em todos os momentos juntos e mesmo depois de separados pela geografia !!!!!

Aos meus companheiros de jornada enquanto estive no Instituto Ludwig, Anamaria, Anna Chris, Fabi, Fel, Daniel, Rapha, Erico, Ma Cris, Newton, Ricardo, Paula, Lilian, Murilo e Valéria, por tudo o que eu aprendi durante o tempo maravilhoso em que passamos juntos!!!! O mérito desse trabalho eu o compartilho com vocês.

Aos meus colegas de graduação, as minhas mais profundas saudades!!!!

Ao meu amigo Francisco (Kejão) pelo carinho, atenção e principalmente paciência durante a conclusão deste trabalho. As conversas nos dias de crise me ajudaram a seguir em frente sempre confiante !!!!

Mais uma vez agradeço a toda a minha família, minha mãe, meu pai, minhas irmãs, Elaine, Angélica e Miriam. Meu sobrinho lindo, Felipe. E o meu cunhado Marcos... Por tudo o que temos passado juntos desde sempre e pelo amor que nos une a cada dia!!!

Aos meus avós que mesmo de longe me trazem seu amor todos os dias. Todos os meus tios e tias e primos que desde meu primeiro vestibular me acompanham sempre torcendo e comemorando a cada vitória!!!!!!

À minha grande amiga e irmã Lenise... que, mesmo depois de tanto tempo longe uma da outra, continua uma amiga a contar em todas as horas !!!! Amiga, muito obrigada pelo ombro amigo nas minhas muitas horas de crise !!!!!!!

Ao meu amigo Marcos Ferreira por tudo!!!!!! Pelo carinho, pela atenção e principalmente pela boa vontade em ajudar em todos os momentos !!!!! Cada pequeno gesto nunca vai ser esquecido!!!!

À minha amiga Nicinha, por todo o carinho e apoio em todas as horas !!!

Aos meus novos amigos, Simoni, Aurélia, Guilherme e Juliano por  
todos os bons momentos de alegria !!!!

Ao meu querido amigo Eduardo e sua pequena Pantera por me  
trazer conforto e alegria nos momentos difíceis !!!!

E a Deus por tornar tudo isso possível !!!!

## RESUMO

Os dados de seqüência genômicas humanas depositados em bancos públicos têm fornecido uma oportunidade sem precedentes para pesquisadores decifram a funcionalidade do genoma humano. Essas informações são extremamente valiosas na prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer. O Cancer Genome Anatomy Project (CGAP), o Gene Expression Omnibus (GEO), o Genome Data Mining (GDM) e o Babelomics functional analysis of genome-scale experiments representam quatro importantes ferramentas para o estudo da genética funcional. O objetivo do presente trabalho foi o de explorar bancos de dados públicos para selecionar e validar a expressão de genes relacionados com o desenvolvimento e a progressão de carcinoma renal de células claras (CRcc). Utilizando ferramentas de bioinformática foi analisada a expressão gênica diferencial entre duas bibliotecas de SAGE elaboradas a partir de tecidos renais normais e de CRcc. Os resultados obtidos demonstraram alterações na expressão de genes participantes de importantes vias metabólicas. Baseando-se nessas análises, os genes *CDK7*, *CLDN1*, *CSTB*, *EPC2* e *ZNF706* foram selecionados e a expressão gênica diferencial desses foi avaliada por PCR em tempo real em 35 amostras de pacientes portadores de CRcc em diferentes estágios de progressão da doença e 1 amostra metastática. Paralelamente, utilizando-se a metodologia de RaSH foram elaboradas bibliotecas subtrativas entre o tecido neoplásico e o tecidos normal, sendo selecionados os genes *MATR3* e *PITPNB*. O *ZNF706* apresentou super expressão em relação aos tecidos normais, nas amostras tumorais analisadas independentemente do grau de evolução tumoral. O mesmo comportamento foi apresentado pelo gene *CSTB*, sendo que os maiores níveis de expressão foram observados nas amostras de estágio III de progressão tumoral. O gene *CDK7* apresentou níveis de expressão dependente do grau de evolução da doença, apresentando-se hipoexpresso nas amostras de estágio I, II e III e superexpresso nas amostras de estágio IV e na amostra de metástase retroperitoneal. Esse resultado demonstra uma clara associação entre a expressão da ciclina-quinase dependente 7 com a agressividade dos CRcc e sugere que esse gene pode ser considerado um marcador de evolução tumoral em CRcc. Os genes *CLDN1*, *EPC2* e *c-MYC* apresentaram-se hipoexpressos na maioria das amostras tumorais e este comportamento está associado ao potencial de agressividade do tumor. Os genes *MATR3* e *PITPNB* apresentaram aumento de expressão somente nas amostras de estágio IV e na amostra metastática, dessa forma estes genes podem ser considerados possíveis marcadores moleculares do potencial

agressivo do CRcc. A análise das vias metabólicas realizada por meio do programa *Ingenuity Pathways Analysis* demonstrou que os genes *CDK7*, *CLDN1*, *CSTB*, *EPC2*, *PITPNB* e *MATR3* estão envolvidos na mesma cascata metabólica mediada principalmente pelos genes *HNF4a* e *c-MYC*. Essa via está envolvida em diversos processos celulares que podem estar contribuindo de forma decisiva no estabelecimento e progressão dos CRcc e merecem ser melhor avaliados. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a análise *in silico* de bibliotecas de SAGE confirmadas por metodologias experimentais são capazes de revelar diferenças nos padrões de expressão gênica entre tecidos tumorais e normais e os dados originados dessa estratégia podem ser muito relevantes em estudos de evolução e progressão de tumores humanos.

Palavras-chave: Carcinoma Renal de Células Claras; expressão gênica; marcadores moleculares; RaSH; SAGE *in silico*; PCR em Tempo Real.

## Abstract

The data of human genomic sequences available in public database have provided an unpredictable opportunity for researchers to decipher the utility of human genome. This information is extremely valuable in prevention, diagnosis and cancer treatment. The Cancer Genome Anatomy Project (CGAP), the Gene expression Omnibus (GEO), the Genome Data Mining (GDM) and the Babelomics Functional Analysis of Genome-Scale Experiments do represent four important tools for functional genetics studies. This work aimed to explore public database to select and validate expression of genes related to development and progression of Clear Cell Renal Cell Carcinoma (ccRCC). The differential gene expression of two SAGE libraries from normal renal tissues and ccRCC was analyzed using bioinformatics tools. The results showed altered gene expression pattern in genes that participate in important metabolic pathways. Based on these analysis, the genes *CDK7*, *CLDN1*, *CSTB*, *EPC2* and *ZNF706* were selected and their differential gene expression was evaluated by Real Time PCR in 35 tissue samples from patients with ccRCC in different stages of disease progression and one metastatic sample. Simultaneously through RaSH methodology were elaborated subtractive libraries between normal and neoplastic tissues so the genes *MATR3* and *PITPNB* were selected. The *ZNF706* presented over expression in tumor tissues independent of tumor progression grade. The same behavior was presented by *CSTB* where the higher expression levels were observed in samples from stage IV of tumor progression. The *CDK7* gene presented expression levels dependent of disease evolution grade where the lowers levels were in stages I, II, III and presented over expression in samples from stage IV and retroperitoneal metastasis. This result shows a clear relationship between *CDK7* expression and the aggressiveness of ccRCC and suggests that this gene may be considered a biomarker of tumor evolution of ccRCC. The genes *CLDN1*, *EPC2* and *c-MYC* presented hypo expression in

most of tumor samples and this behavior is associated with aggressive potential of this tumor type. The genes *MATR3* and *PITPNB* presented over expression only in sample from stage IV of tumor progression and retroperitoneal metastatic sample so these genes could be a potential molecular markers of tumor aggressiveness. The analysis of metabolic pathways through *Ingenuity Pathways Analysis* demonstrates that *CDK7*, *CLDN1*, *CSTB*, *EPC2*, *PITPNB* and *MATR3* were involved in the same pathway mediated mainly by *HNF4 $\alpha$*  and *c-MYC*. This pathway is involved in diverse cellular processes that may be contribute in a critical way for the establishment and progression of ccRCC and deserve to be better evaluated. The results observed in the present work demonstrate that the in silico analysis of SAGE libraries confirmed by experimental methodologies are capable to reveal differences between expression pattern of normal and tumor tissues and the data generated by this strategy may be very relevant in studies of evolution and progression of human tumors.

Key-words: Clear Cell Renal Cell Carcinoma; gene expression; molecular markers; RaSH; SAGE in silico; Real Time PCR.

## Lista de Abreviaturas

<b>ADFP</b>	do inglês <i>adipose differentiation-related protein</i>
<b>CAIX</b>	do inglês <i>carbonic anhydrase IX</i>
<b>CCR</b>	Carcinoma de Células Renais
<b>CDK7</b>	do inglês <i>Cyclin-dependent kinase 7</i>
<b>cDNA</b>	do inglês <i>complementary DNA</i>
<b>CGAP</b>	do inglês <i>Cancer Genome Anatomy Project</i>
<b>CLDN1</b>	do inglês <i>claudin 1</i>
<b>CRcc</b>	Carcinoma Renal de Células Claras
<b>CSTB</b>	do inglês <i>Cystatin B</i>
<b>C<sub>T</sub></b>	do inglês <i>Cycle Threshold</i>
<b>DEPC</b>	do inglês <i>Di-etil pirocarbonato</i>
<b>DNA</b>	do inglês <i>acid desoxiribonucleic</i>
<b>EPC2</b>	do inglês <i>Enhancer of Polycomb 2, homolog</i>
<b>EST</b>	do inglês <i>Expressed Sequence Tag</i>
<b>GAPDH</b>	do inglês <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
<b>GPC3</b>	do inglês <i>glypican 3</i>
<b>HIF1<math>\alpha</math></b>	do inglês <i>Hypoxia- Inducible Factor 1<math>\alpha</math></i>
<b>Log</b>	Logarítimo
<b>Log<sub>2</sub></b>	Logarítimo na base 2
<b>MATR3</b>	do inglês <i>matrin 3</i>
<b>NCBI</b>	do inglês <i>National Center For Biotechnology Information</i>
<b>NCI</b>	do inglês <i>National Cancer Institute</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PCR</b>	do inglês <i>polimerase chain reaction</i>

<b>PITPNB</b>	do inglês <i>phosphatidylinositol transfer protein, beta</i>
<b>PSCA</b>	do inglês <i>Prostate stem cell antigen</i>
<b>RaSH</b>	do inglês <i>Rapid Subtraction Hybridization</i>
<b>RNA</b>	do inglês <i>acid ribonucleic</i>
<b>SAGE</b>	do inglês <i>Serial Analysis Gene Expression</i>
<b>TNM</b>	Sistema de estadiamento, T= tumor, N= linfonodo (node, do inglês), M= metástase
<b>VCAM-1</b>	do inglês <i>vascular cell adhesion molecule -1</i>
<b>VEGF</b>	do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>VHL</b>	do inglês <i>von Hippel Lindau</i>
<b>ZNF706</b>	do inglês <i>zinc finger 706</i>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> Esquema da metodologia de RaSH.....	42
<b>Figura 2</b> Esquema de desenho iniciadores para proteína ZNF706.....	50
<b>Figura 3</b> Avaliação da qualidade do RNA total em gel de agarose.....	58
<b>Figura 4</b> Avaliação da qualidade da síntese de DNA complementar.....	59
<b>Figura 5</b> Resultado da digestão com a enzima de restrição <i>MboI</i> .....	60
<b>Figura 6</b> Resultado da purificação da PCR dos adaptadores.....	61
<b>Figura 7</b> Resultado da PCR de colônias das bibliotecas de RaSH.....	63
<b>Figura 8</b> Seleção dos genes candidatos por meio de SAGE <i>in silico</i> .....	65
<b>Figura 9</b> Avaliação da expressão gênica por <i>microarray in silico</i> .....	66
<b>Figura 10</b> Expressão total dos genes <i>CDK7</i> , <i>CLDN1</i> , <i>CSTB</i> e <i>ZNF706</i> quantificada por PCR em Tempo Real.....	67
<b>Figura 11</b> Média da expressão relativa do gene <i>CDK7</i> .....	69
<b>Figura 12</b> Média da expressão relativa do gene <i>CLDN1</i> .....	71
<b>Figura 13</b> Média da expressão relativa do gene <i>CSTB</i> .....	73
<b>Figura 14</b> Média da expressão relativa do gene <i>EPC2</i> .....	74
<b>Figura 15</b> Média da expressão relativa do gene <i>MATR3</i> .....	75
<b>Figura 16</b> Média da expressão relativa do gene <i>PITPNB</i> .....	76
<b>Figura 17</b> Média da expressão relativa do gene <i>c-MYC</i> .....	78
<b>Figura 18</b> Média da expressão relativa do gene <i>ZNF706</i> .....	80
<b>Figura 19</b> Amplificação do gene <i>ZNF706</i> em amostras renais .....	81
<b>Figura 20</b> Mini preparação plasmidial dos clones do gene <i>ZNF706</i> .....	82
<b>Figura 21</b> Alinhamento do seqüenciamento do gene <i>ZNF706</i> .....	83
<b>Figura 22</b> Cromatograma do seqüenciamento do gene <i>ZNF706</i> .....	84
<b>Figura 23</b> Indução da expressão da proteína <i>ZNF706</i> .....	85
<b>Figura 24</b> Indução em larga escala e purificação da proteína <i>ZNF706</i> ...86	

**Figura 25** Avaliação das vias metabólicas e das interações entre os genes selecionados realizadas pelo software *Ingenuity pathways analyses*.....89

**Figura 26** Avaliação das vias metabólicas e das interações entre os genes selecionados realizadas pelo software *Ingenuity pathways analyses* e a correlação com estados patológicos do rim.....90

## Sumário

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
Carcinoma Renal de Células Claras.....	23
Biomarcadores Moleculares.....	26
Análise da Expressão Gênica.....	28
SAGE <i>in silico</i> .....	29
RaSH.....	31
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>MATERIAL e MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
Casuística e considerações éticas.....	34
Extração de RNA Total.....	34
Bibliotecas Subtrativas de RaSH.....	35
Seleção dos genes por SAGE <i>in Silico</i> .....	43
PCR em Tempo Real .....	43
Análise Estatística.....	48
Análise das Vias Metabólicas.....	48
Clonagem e expressão da proteína ZNF706.....	49
<b>RESULTADOS e DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
Caracterização das amostras.....	55
Preparo das Amostras.....	58
Elaboração das bibliotecas subtrativas de RaSH.....	59
Seleção dos genes candidatos por SAGE <i>in Silico</i> .....	64
Análise da Expressão Gênica.....	67
Clonagem e indução da proteína ZNF706.....	80
Análise das vias metabólicas.....	86

	22
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>92</b>

## **1- INTRODUÇÃO**

### **1.1 Carcinoma Renal de Células Claras**

O tumor renal representa aproximadamente 3% das mortes por câncer em todo o mundo e é considerada a mais letal entre as doenças urológicas. (PETRELLA and BRINCKERHOFF, 2006). Sua incidência tem aumentado progressivamente a cada ano nos Estados Unidos e na Europa nas últimas três décadas (LIPWORTH et al., 2006). Uma estimativa do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos prevê para 2008, 54.390 novos casos e 13.010 mortes pela doença, existindo uma predominância entre os homens, 33130 novos casos e 8100 mortes contra 21260 novos casos e 4910 mortes entre as mulheres (JEMAL et al., 2008). Em geral, a incidência deste tipo tumoral é maior em países economicamente desenvolvidos (CORGNA et al., 2007).

Embora tenha sido notado um significativo avanço na detecção precoce dos tumores renais, proporcionada principalmente pela melhora nos procedimentos de imagem como a ultrassonografia, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética, o número de indivíduos diagnosticados com tumor renal cresceu drasticamente nas últimas cinco décadas alcançando índices alarmantes (DRUCKER, 2005).

Na década de 80, o tumor renal era visto, basicamente, de uma única forma; quanto maior o estágio, maior o grau da doença, evidenciando, assim um pior prognóstico. A partir da década de 90, cientistas moleculares e patologistas começaram a descrever o mesmo tumor renal com aspectos morfológicos e biológicos diferentes. Estas observações levaram a evidência de comportamentos biológicos e prognósticos distintos entre os diferentes tipos histológicos do Carcinoma Renal, tornando o diagnóstico patológico mais específico e de grande importância para a prática médica (VITO MANCINI et al., 2008).

O carcinoma renal pode ser classificado por meio do Sistema da Organização Mundial de Saúde (OMS) que define subtipos histológicos com comportamentos clínicos distintos. De acordo com esta classificação os subtipos mais comuns são denominados Carcinoma Renal de células claras, Carcinoma Papilífero, Carcinoma Cromofóbico e Oncocitoma renal. Alguns tipos raros também são definidos, tais como, carcinoma de ductos coletores de Bellini,

carcinoma medular e carcinoma renal associado à translocação no Xp11.2 (YOUNG et al., 2006).

O Carcinoma Renal de células claras (CRcc) ou Carcinoma de Células Renais (CCR) é o tipo mais comum, sendo responsável por 80 a 90% de todos os carcinomas renais, apresentando também o pior prognóstico (CHEN et al., 2005). Este tipo de tumor possui as maiores taxas de crescimento extrarenal, desenvolvimento de metástases e mortalidade (YOUNG et al., 2006). O CRcc pode ocorrer nas formas familiar e esporádica e sua incidência aumenta significativamente em pacientes na faixa etária entre 50 e 70 anos (BODMER et al., 2002). Entre os fatores de risco que podem favorecer o desenvolvimento do CRcc podemos citar o fumo, obesidade, hipertensão e drogas anti-hipertensivas, uso crônico de analgésicos, dieta, consumo de álcool, fatores hormonais e reprodutivos, transplante de rim, diálise por período longo e radiação (LIPWORTH et al., 2006).

O CRcc esporádico tem origem em células dos túbulos contorcidos proximais, suas células possuem citoplasma claro e membrana celular bem evidenciada. Macroscopicamente, o tumor apresenta coloração amarela, devido a um grande acúmulo de lipídios nas células (LABER, 2006; SULLIVAN et al., 2007). Na maioria dos casos, as células claras formam pequenos grupos. Quando na ausência das células claras, o diagnóstico pode basear-se na detecção de uma rede vascular característica. O CRcc é também denominado de Carcinoma Renal do tipo convencional, para evitar o termo “claro”, uma vez que nem todos os tumores deste grupo apresentam células claras (VITO MANCINI et al., 2008).

Estudos citogenéticos e moleculares identificaram deleções no braço curto do cromossomo 3 como sendo o evento genético mais comum no CRcc, ocorrendo em 10% dos casos (BODMER et al., 2002). Mutações somáticas do gene von Hippel-Lindau (*VHL*) localizado na região 3p25-26, estão presentes em 43-57% dos CRcc e a hipermetilação do promotor e silenciamento desse gene em 11-19% dos casos (MARTINEZ et al., 2000; NELSON et al., 2007; VITO MANCINI et al., 2008). Sullivan e colaboradores (2007) demonstraram que a perda de heterozigose no braço curto dos cromossomos 8 e 9 é mais eficiente que o estadiamento do tumor na predição de recorrência da doença.

A inativação do gene *VHL* está presente nos pacientes portadores de CRcc esporádico, onde um dos alelos apresenta-se mutado e o outro se encontra inativado por hipermetilação da região promotora (HERMAN et al., 1994; ILIOPOULOS, 2006; LIM et al., 2007). Estas duas mudanças genéticas ocorrem independentemente, uma vez que não existe o componente hereditário. As inativações esporádicas e hereditárias do gene *VHL* levam aos mesmos efeitos, uma vez que o gene *VHL* deixa de exercer a atividade inibitória do gene *HIF1 $\alpha$*  o que resulta na superexpressão deste gene levando a hipervascularização característica do CRcc (SUFAN et al., 2004; LIM et al., 2007). No CRcc esporádico, diferente da forma hereditária, o fenótipo resultante dessas alterações é um tumor único que usualmente ocorre em idade avançada. Nenhuma mutação no gene *VHL* foi encontrada nos outros subtipos histológicos do carcinoma renal (GNARRA et al., 1994; LIM et al., 2007).

O CRcc esporádico é caracterizado pela ausência de sintomas iniciais, metástases freqüentes e resistência aos tratamentos rádio e quimioterápicos usualmente utilizados (ALLORY et al., 2005). Adicionalmente um terço dos pacientes apresenta metástases ao diagnóstico, e mais de 50% reincidem após a nefrectomia (MIGNOGNA et al., 2006; PETRELLA et al., 2006). Aproximadamente dois terços dos CRcc são localizados, os pacientes são tratados cirurgicamente e alguns deles podem ser considerados curados (SULLIVAN et al., 2007).

O prognóstico do CRcc é baseado no estadiamento do tumor e no grau histológico e aproximadamente 30% dos pacientes desenvolvem metástases apresentando uma expectativa de vida de 12 meses, dentre os sítios metastáticos mais comuns estão parênquima pulmonar, ossos, fígado e cérebro (TAKAHASHI et al., 2001; SHOME et al., 2007).

A nefrectomia parcial ou total e a imunoterapia são metodologias já bem estabelecidas e além desses, outros tratamentos como quimioterapia, terapia hormonal e radioterapia também têm sido utilizadas na terapêutica dos CRcc (DRUCKER, 2005; PETRELLA et al., 2006). A imunoterapia com interleucina-2 e interferon- $\alpha$  são bastante efetivas no tratamento do carcinoma renal de células claras, entretanto, somente 25% dos pacientes respondem a este tipo de tratamento (YOUNG et al., 2006).

## 1.2 Biomarcadores moleculares

O futuro do tratamento do câncer está no conceito de medicina personalizada, um modelo que se baseia nas características do indivíduo e não somente na doença, utilizando as características moleculares dos tumores para combinar os pacientes certos com tratamentos específicos. Dessa forma, a combinação entre as informações tecnológicas com a ciência e os tratamentos clínicos, poderão determinar sensíveis melhorias na saúde e na qualidade de vida do paciente (YEATMAN et al., 2008).

Muitos sistemas de classificação têm sido utilizados na tentativa de prever o prognóstico de pacientes portadores de CRcc. Para isso são utilizadas variáveis clínicas para determinar o seguimento, o tempo de progressão e a sobrevida destes pacientes. Entre as variáveis clínicas estão, o estadiamento TNM (Tamanho do tumor; acometimento de linfonodos; presença de metástases à distância), o grau de estadiamento do tumor, a presença de necrose ou invasão vascular no tumor primário, a sintomatologia ao diagnóstico e algumas variantes laboratoriais. Apesar de essas variáveis clínicas fornecerem informações importantes da biologia do tumor, elas não são suficientes para uma caracterização definitiva do potencial invasivo do tumor bem como da sua capacidade de recidivar. Portanto, para uma caracterização mais completa do tumor, se torna necessária a identificação de novos marcadores moleculares, cuja utilização pode contribuir com as equipes médicas que optarão pelos melhores tratamentos baseados nas características de cada paciente e seu tumor e não mais baseados em dados estatísticos populacionais. Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de aumentar a eficácia destes sistemas por meio da investigação de alterações moleculares predizendo novos biomarcadores que possam influenciar nas características clínicas dos tumores (RINI, 2006; DE WEVER et al., 2007).

Os biomarcadores, moléculas biológicas indicadoras do estado fisiológico e também de mudanças durante um processo patológico, podem ser produzidos pelo próprio tumor, pelos tecidos vizinhos ou pelas metástases. Existem diferentes tipos de marcadores moleculares incluindo DNA, RNA, proteínas e hormônios (SRINIVAS et al., 2002; GARNERO; VOORZANGER-ROUSSELOT, 2007). Estes marcadores são importantes assinaturas moleculares do fenótipo de uma célula que auxiliam na detecção precoce do câncer e

avaliação de risco potencial, uma vez que alterações moleculares antecedem a manifestação clínica da doença (NEGM et al., 2002). A utilidade dos biomarcadores está na habilidade de fornecer uma indicação precoce da doença; a possibilidade de identificação, na população saudável, de indivíduos sob alto risco de desenvolver determinado tipo de câncer; na determinação do prognóstico do paciente com câncer; instrumento para a predição precoce de recorrência do tumor; progressão e desenvolvimento de metástases e no monitoramento da eficácia do tratamento antitumoral utilizado (SRINIVAS et al., 2001; GARNERO; VOORZANGER-ROUSSELOT, 2007).

Atualmente existe a necessidade de marcadores capazes de prever a ocorrência de metástases e o prognóstico da doença em pacientes com tumor primário. Marcadores com a capacidade de, no momento do diagnóstico do tumor primário, distinguir entre tumores que poderão ou não responder ao tratamento desenvolvido e indicar também tumores que irão desenvolver metástases, ajudando assim, a delinear o melhor esquema de tratamento para cada paciente, desta maneira, evitando os efeitos adversos dos tratamentos adjuvantes sem necessidade (JIANG; LIM et al., 2007).

Na última década, muitos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de identificar marcadores moleculares capazes de ajudar na elucidação da biologia do Carcinoma Renal de células claras. Vários genes têm sido identificados como possíveis marcadores moleculares para este tipo tumoral, entre eles o *CAIX*, *ADFP*, *Ki-67*, entretanto, os resultados mostraram-se contraditórios e nenhum dos genes pode ainda ser considerado um bom marcador molecular. A pesquisa por biomarcadores enfrenta muitos desafios, entre eles a variabilidade das amostras dos pacientes causada por diferenças na idade, sexo, exercícios, dieta, entre outros fatores. (KOLCH et al., 2005; JIANG, 2007).

O maior entendimento da biologia do CRcc, principalmente revelados pelos estudos da expressão gênica, contribuiu para a identificação de vários marcadores promissores, sendo que muitos deles esperam por uma validação prospectiva. A utilidade clínica destes marcadores moleculares no CRcc ou em qualquer tumor, depende da facilidade, da reprodutibilidade, a validade do teste e da habilidade de melhorar as variáveis clínicas utilizadas na rotina médica. Futuramente, a associação dos dados revelados com os estudos

dos marcadores moleculares associados às variáveis clínicas em CRcc permitirão um melhor prognóstico e a seleção de pacientes para opções terapêuticas específicas ( RINI, 2006).

### 1.3 Análise da Expressão Gênica

Modificações fisiológicas e patológicas das funções celulares estão intrinsecamente associadas a alterações nos padrões da expressão gênica. Assim, a identificação de genes diferencialmente expressos tem sido usada como uma importante ferramenta para o reconhecimento de genes cujos produtos estão envolvidos com o desenvolvimento e progressão de determinados tumores, assim como a ação de drogas sobre estes.

Existem atualmente diversas técnicas que permitem a detecção de genes diferencialmente expressos, como a hibridação subtrativa (HEDRIK et al., 1984), “*Differential display*” (LIANG and PARDEE, 1992), análise da diferença representativa (RDA) (LISITSYN et al., 1993; HUBANK and SCHATZ, 1994), análise seriada da expressão gênica (SAGE - *Serial analysis of gene expression*,) (VELCULESCU et al., 1995) e *cDNA Microarrays* (SCHENA et al., 1995), todas elas apresentando algumas vantagens e desvantagens.

Nas últimas décadas, acompanhando o desenvolvimento de novas metodologias e os avanços tecnológicos principalmente os da área de informática, a biologia molecular evoluiu muito, proporcionando a avaliação da expressão gênica de inúmeros genes simultaneamente. A associação entre essas importantes ferramentas tem contribuído na caracterização do perfil molecular de diversas doenças entre elas o câncer renal. Nesse contexto, com o objetivo de avaliar os mecanismos moleculares da tumorigênese e progressão do CRcc, Takahashi e colaboradores (2001), utilizando a técnica de *cDNA Microarray*, analisaram o padrão de expressão gênica de pacientes com essa doença. Os autores relatam dois padrões distintos de expressão, um deles caracterizado por pacientes com sobrevida livre de doença após cinco anos e sem evidência clínica de metástase e o outro caracterizado por pacientes portadores de uma forma agressiva da doença, com média de sobrevida livre de doença de 25,4 meses.

Nesse mesmo sentido, Hirota e colaboradores (2006), utilizando as técnicas de *Microarray* e *Laser Beam Microdissection* encontraram 978 genes diferencialmente expressos entre o CRcc e o córtex renal normal. Estudos de *Microarray* revelaram ainda a diminuição da expressão do gene *VCAM-1* em CRcc, inferindo que esse pode ser um forte marcador de recorrência após o tratamento cirúrgico, em pacientes acometidos pelo CRcc (SHIOI et al., 2006).

Outro gene que tem sua expressão aumentada em CRcc em relação ao córtex renal normal é o *PSCA*. Dados de PCR em tempo real e imunohistoquímica revelaram que o aumento da expressão deste gene está associado a carcinogênese e progressão tumoral, indicando um pior prognóstico (ELSAMMAN et al., 2006).

Podemos notar dessa forma, que os estudos direcionados no sentido de avaliar a expressão gênica têm sido eficazes em prover relevantes informações sobre os processos do estabelecimento e da progressão das neoplasias.

### **1.3.1 Análise serial da expressão gênica (SAGE) *in silico***

Atualmente, os avanços tecnológicos permitem que os métodos para análise de expressão gênica em larga escala sejam utilizados rotineiramente. Um destes métodos é a análise serial da expressão gênica (SAGE – *Serial Analysis of Gene Expression*), que fornece a contagem dos transcritos presentes nos tecidos analisados e possui um formato adequado para a geração de uma base de dado digital da expressão gênica de um dado tecido. Desta maneira, o método de SAGE permite fazer uma análise do número de transcritos presentes em um tecido e do nível de expressão de cada transcrito (VELCULESCU et al., 1995). Vários estudos de expressão gênica vêm sendo realizados com a abordagem de SAGE e em todos, os resultados demonstram a eficiência do método na identificação de genes diferencialmente expressos auxiliando na compreensão dos determinantes de cada fenótipo celular e dos eventos transcricionais que acompanham a aquisição de propriedades funcionais (EL-RIFAI et al., 2002; MYEROWITZ et al., 2002; FUJII and AMREIN, 2002; OSHIRO et al., 2002; UNTERGASSER et al., 2002). O SAGE é um método pouco tendencioso (*unbiased*)

baseado em três afirmações, (1) uma pequena seqüência de cDNA (*tag* ou etiqueta) derivada de posições precisas dentro do RNA mensageiro de cada transcrito é suficiente para identificar unicamente um transcrito; (2) as *tags* podem ser ligadas umas as outras para formar longas seqüências de DNA chamadas concatâmeros, que são clonados e seqüenciados e em seguida; (3) as *tags* podem ser identificadas com auxílio do software SAGE 2000 (Invitrogen), por meio da identificação dos sítios da enzima-âncora (*NlaIII*). O nível de expressão do transcrito pode ser quantificado pelo número de vezes que ele se repete na biblioteca (PIQUEMAL et al., 2002). Esta metodologia foi descrita em 1995 e já está bem estabelecida, sendo amplamente utilizada em diferentes projetos (VELCULESCU et al., 1995; 2000).

O CGAP (*Cancer Genome Anatomy Project*) é um programa interdisciplinar estabelecido e administrado pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI – *National Cancer Institute, EUA*) para gerar informações e ferramentas tecnológicas para decifrar a biologia molecular da célula cancerosa. O CGAP disponibiliza dados de SAGE realizados por diferentes centros de pesquisa no mundo que avaliaram tecidos de cérebro (normal e vários tipos de tumores), cólon (normal e adenocarcinoma), coração, rim (normal e embrionário), fígado, pulmão, músculo, ovário (normal e tumoral), pâncreas (normal, adenocarcinoma e carcinoma), peritônio (normal e tumoral), placenta, próstata (normal e tumoral), retina, pele (melanoma), medula espinhal, estômago (normal, adenocarcinoma e carcinoma), vasos sanguíneos (normal, hemangioma, estimulado), leucócitos, fibroblastos. A metodologia de SAGE apresenta o melhor custo-benefício para gerar dados sobre expressão gênica, quando comparado aos dados fornecidos pela análise de *EST* (*expressed sequence tags* ou fragmentos de seqüências expressas). Em vista disso, o CGAP apóia a produção de bibliotecas de SAGE e seu sequenciamento e atualmente é o maior fornecedor de dados sobre expressão gênica, depositados na página da Internet do NCBI – *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE>). Nesta base de dados, as *tags* geradas por SAGE são relacionadas a grupos de *Unigene* (*clusters Unigene*) e aquelas que estiverem diferencialmente expressas podem ser identificadas, juntamente com os níveis de expressão das *tags*.

O SAGE Genie é outra divisão do *website* do CGAP, composto de um conjunto de ferramentas para processar os dados gerados por SAGE, entre elas o SAGE *Anatomic Viewer* (Visor Anatômico do SAGE), onde é possível visualizar os níveis de expressão de transcritos para qualquer gene de forma comparativa entre tecidos normais e malignos, baseando-se em dados de bibliotecas de SAGE que já foram geradas, de 114 tipos celulares, que reúnem 5,2 milhões de *tags*, visualizados utilizando-se ferramentas computacionais. Para gerar uma lista confiável, foram analisados 6.800.316 *tags* de 171 bibliotecas de SAGE, e foram separados os *tags* únicos (464.825). Destes *tags*, foram removidas as seqüências de adaptadores, variações de uma base e aqueles que foram detectados apenas uma vez, diminuindo o número de *tags* únicos para 267.777. Erros de seqüenciamento também foram filtrados, ocorrendo remoção de 73.549 *tags* potencialmente errôneos, e então restaram 194.126 *tags* confiáveis, que formam a lista disponível na página da Internet, ao lado de suas contagens (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE/Download>) (BOON et al., 2002). Dessa forma, esses bancos de dados públicos além de representarem uma fonte confiável de dados possibilitam uma avaliação global da expressão gênica em tumores humanos.

A utilização desses dados como ferramenta de estudo além de minimizar os custos experimentais pode ser extremamente eficiente no sentido de prover informações relevantes para a seleção de genes candidatos cujos produtos desempenham funções cruciais para o desenvolvimento e a progressão neoplásica.

### **1.3.2 Rapid Subtraction Hybridization (RaSH)**

A elaboração de bibliotecas subtrativas de cDNA também representa uma poderosa ferramenta para o estudo da expressão gênica diferencial entre dois tecidos.

Uma modificação na técnica de hibridação subtrativa, chamada de supressão da hibridação subtrativa (SSH) (DIATCHENKO et al., 1996), tem sido muito utilizada, por exemplo, para a produção de bibliotecas de cDNA de tecido, específica para a identificação de genes relacionados com o processo tumorigênico (JIN et al., 1997; NUPPONNEN et al., 1998; NELSON et al., 1999; YANG et al., 1999). Nessa metodologia, as seqüências

diferencialmente expressas são amplificadas e as concentrações das mais ou menos abundantes são equalizadas.

Recentemente foi descrita uma nova metodologia de hibridação subtrativa denominada RaSH (*Rapid Subtraction Hybridization*). Nessa técnica os processos de subtração de cDNAs são simplificados, apresentando algumas vantagens sobre outras técnicas, como uma grande eficiência na subtração e uma significativa redução dos custos (JIANG et al., 2000) (Figura1). Essa metodologia tem sido utilizada com sucesso para a identificação e clonagem de genes diferencialmente expressos em diferentes situações, como por exemplo, durante a progressão tumoral de melanomas (BOURKERCHE et al., 2004; PEITL et al., 2009a); resistência à infecção pelo *HIV* (SIMM et al., 2001) e também para a avaliação dos efeitos do tratamento de algumas drogas como Interferon e Mezerina (JIANG et al., 2000), Cisplatina (PEITL et al., 2009b) e Anexina-1 (RODRIGUES-LISONI et al., 2006). Em todos esses estudos a expressão gênica diferencial revelada pelo RaSH foi confirmada por métodos de validação, como RT-PCR semi-quantitativo, PCR em Tempo Real e Northern Blot, ratificando dessa forma a eficiência da metodologia.

## 2- OBJETIVOS

Tendo em vista o exposto, o presente trabalho teve o objetivo geral de identificar e caracterizar possíveis marcadores moleculares presentes em carcinoma renal células claras (CRcc). Atendendo aos seguintes objetivos específicos:

1. Caracterizar as possíveis diferenças no padrão de expressão gênica entre amostras tumorais e tecido normal com a elaboração de bibliotecas subtrativas de cDNA a partir de RNAs extraídos de amostras de CRcc e córtex renal normal, por meio da metodologia de RaSH;

2. Avaliar e comparar virtualmente a expressão gênica diferencial de amostras tumorais e normais em bancos de dados públicos de SAGE (*SAGE in silico*), identificando clusters de genes cuja expressão altera-se coordenadamente, constituindo redes ou vias metabólicas ou de sinalização, assim, com o auxílio de ferramentas de Bioinformática e bancos de dados, selecionar genes candidatos a marcadores moleculares;

3. Validar a expressão diferencial desses genes candidatos por PCR em tempo real (PCR quantitativa) em córtex renal normal e amostras de pacientes portadores de CRcc;

4. Clonar, superexpressar e purificar proteínas codificadas pelos genes selecionados.

### **3- MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Casuística e considerações éticas**

O presente trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Nº 099 /2007) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Banco de Tumores (Nº 019/07) ambos da Fundação Pio X – Hospital do Câncer de Barretos. Todos os participantes foram informados sobre os objetivos da pesquisa e assinaram o termo de consentimento aprovado pelas comissões acima citadas (Anexo A).

Como material de estudo foram utilizadas 35 amostras teciduais de Carcinomas Renais de células claras e uma amostra metastática, adquiridas junto ao Banco de Tumores situado no Hospital de Câncer de Barretos, sob coordenação da Profa. Dra. Paula Rahal, IBILCE / UNESP. Como grupo controle foram utilizadas amostras de tecido de córtex renal normal provenientes dos mesmos pacientes, as quais foram avaliadas por patologistas e histologistas para a certificação da ausência de células tumorais.

Os materiais coletados após ressecção cirúrgica foram armazenados imediatamente em nitrogênio líquido e encaminhados ao banco de tumores para processamento e análise através das técnicas descritas abaixo.

As informações referentes ao diagnóstico, ao local da lesão, o estadiamento, idade, sexo, etnia, exposição a fatores de risco (fumo e álcool), história familiar, tratamento, evolução, foram adquiridas após um minucioso levantamento dos prontuários médicos.

#### **3.2 Extração de RNA total**

A extração de RNA seguiu a técnica descrita por Sambrook e Russel (2001) com modificações, sendo que o sucesso da técnica depende principalmente da obtenção de RNA em quantidade e de boa qualidade. Para extração do RNA, as amostras teciduais foram transferidas para tubos de 15mL estéreis e adicionados 1mL a 3mL de TRIzol (Life Technologies, Grand Island, NY), de acordo com o tamanho da amostra e processadas em ultra-homogenizador (Polytron).

As amostras maceradas foram divididas em alíquotas de 1ml em tubos estéreis de 1,5mL, e adicionados 200µL de clorofórmio em cada tubo. Após agitação vigorosa durante

um minuto as amostras foram incubadas por três minutos à temperatura ambiente e centrifugados a 10.000rpm por 15 minutos a 4°C. A fase superior foi transferida para um tubo novo e adicionou-se 500µL de isopropanol para precipitação do RNA. Após a incubação de 10 minutos à temperatura ambiente a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado com 1ml de etanol 75% e após centrifugação por cinco minutos a 4°C, sob velocidade de 6.000rpm, o sobrenadante foi descartado e o sedimento seco à temperatura ambiente. O RNA extraído foi então eluído em 30µL de água DEPC (dietil pirocarbonato).

A determinação da concentração dos RNAs ( $1DO_{260} = 40\mu\text{g/mL}$ ) foi realizada no aparelho ND 1000 Spectrophotometer (Nanodrop), medindo-se a densidade óptica nos seguintes comprimentos de ondas:  $DO_{260}/DO_{280}$ . Uma alíquota de 1µg da amostra foi submetida a uma corrida eletroforética em gel de agarose 1% para análise da integridade da amostra. Depois de isolados, quantificados e checados quanto à qualidade, os RNAs foram então submetidos à síntese de DNA complementar (cDNA) com a enzima transcriptase reversa.

### **3.3 RaSH**

#### **3.3.1 Obtenção do DNA complementar (cDNA)**

Para a reação de Transcrição reversa (RT), foi utilizado o Kit Superscript II Reverse Transcriptase (200U/µL) (Invitrogen), com modificações. Foram utilizados 15µg do RNA total ao qual foi adicionado 1µL de oligo (dT) ancorado (0,5µg/µL), 1µL de dNTPs mix (10 mM) e água estéril para um volume final de 12µL. Em seguida, o material foi incubado a 65°C por cinco minutos e transferido imediatamente para o gelo. Após essa etapa, foram acrescentados os seguintes reagentes: 2µL de DTT (0.1mM), 1µL de RNaseOUT (40U/µL), 4µL de tampão 5X Superscript e incubados a 42°C por dois minutos. Ao término da incubação, foi adicionado 1µL da enzima transcriptase reversa *Superscript II Reverse Transcriptase* (200U/µL). O material foi incubado a 42°C por 50 minutos e a reação foi finalizada com a inativação da atividade enzimática a 70°C por 15 minutos.

Após a reação de RT, foi realizada a síntese da segunda fita de cDNA. Ao volume total da primeira reação foram adicionados 30µL de 5X Second strand buffer (Invitrogen), 3µL de dNTPs mix (10mM), 1µL de RNase H (2U/µL) (Invitrogen), 1µL de DNA ligase (10U/µL) (usb), 1µL de Tampão da ligase 10X (usb), 1µL de DNA polimerase I (42U/µL) (usb) e água estéril para um volume final de 150µL. Na seqüência, o material foi misturado e incubado a 16°C por duas horas com agitação periódica. Após esse período, foram adicionados 2µL de T4 DNA polimerase (10U/µL) (usb) e incubado novamente a 16°C por cinco minutos. Após a incubação a reação foi transferida para o gelo e foram adicionados 10µL de EDTA (0,5M) e procedeu-se a extração com 180µL de fenol e clorofórmio (1:1) e precipitação a -80°C durante duas horas com 500µL de etanol 100% gelado e 70µL de acetato de amônio 7,5M.

Após a precipitação os tubos foram centrifugados a 13.000rpm por 20 minutos à temperatura de 4°C e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 500µL de etanol 70% gelado ao sedimento e os tubos foram novamente centrifugados a 13.000rpm por 20 minutos à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o sedimento seco à temperatura ambiente. O cDNA segunda fita foi ressuscitado em 45µL de água DEPC (dieltil pirocarbonato).

### **3.3.2. Controle da qualidade do cDNA**

A qualidade da reação de síntese cDNA das amostras de CRcc e amostras de tecido normal foi avaliada por meio da amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction) de um fragmento de 613pb do gene *β-ACTINA* que serve como controle para transcritos abundantes.

As reações foram processadas em 12,5µL, contendo de 100 a 500 ng de cDNA, Tampão 1X, dNTP mix (210µM), MgCl<sub>2</sub> (1,5mM), oligonucleotídeos (0,4µM) e Taq DNA Polimerase (0,5 unidade). Em todos os experimentos, um dos tubos não recebeu DNA, para atuar como controle de contaminação.

A reação consistiu de uma etapa inicial de desnaturação de quatro minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, um minuto de anelamento dos

oligonucleotídeos a 60°C e um minuto a 72°C para extensão das cadeias, além de extensão final a 72°C por sete minutos.

Após a reação, os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% , juntamente com um marcador de 100pb (*Gene Ruler*, Fermentas), para verificar a amplificação de um fragmento de 613pb referente ao gene  $\beta$ -*ACTINA*. O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta.

Os oligonucleotídeos  $\beta$ -ACTF - 5' GGCATCGTGATGGACTCCG 3' e  $\beta$ -ACTR - 5'GCTGGAAGGTGGACAGCG 3' foram utilizados para amplificação do fragmento de 613pb do gene  $\beta$ -*ACTINA*.

### 3.3.3. Elaboração da biblioteca subtrativa RaSH

Para construção das bibliotecas, em uma primeira etapa, os cDNAs dupla fita das duas amostras foram digeridos com a enzima de restrição *Mbol* (Invitrogen). Foram adicionados 2 $\mu$ L da enzima (10U/ $\mu$ L) e 5,5 $\mu$ L do tampão da enzima ao volume total da reação da segunda fita de cDNA (45 $\mu$ L). Os tubos foram incubados a 37°C por uma hora. Após esse período, foram adicionados mais 2 $\mu$ L da enzima de restrição *Mbol* e o material foi incubado novamente a 37°C por mais duas horas.

Após a digestão enzimática, 3 $\mu$ L do produto foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, juntamente com um marcador de 100pb (*Gene Ruler*, Fermentas), para verificar a eficiência da digestão das amostras. O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta.

Os produtos digeridos foram purificados com fenol e clorofórmio e foram incubados a -80°C por 16 horas para precipitação. Após este período , os tubos foram centrifugados a 13.000rpm por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 500 $\mu$ L de etanol 70% gelado e seguiu-se de centrifugação a 13.000rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o sedimento seco em temperatura ambiente. Os produtos digeridos foram ressuspensos em 15 $\mu$ L de água DEPC.

Para criar sítios de ancoragem, as amostras digeridas com a enzima *MboI* foram ligadas aos adaptadores XDPN14 – CTGATCACTCGAGA e XDPN12 - GATCTCTCGAGT. Ao volume total de produto digerido foram adicionados 11µL do adaptador XDPN14 (20µM) e 7,5µL do adaptador XDPN12 (20µM), a solução foi desnaturada a 55°C por um minuto e a temperatura foi, então, reduzida a 14°C lentamente por aproximadamente uma hora. Após essa reação, foram adicionados 8µL da enzima T4 DNA ligase (5U/µL) (USB) e 4,5µL de tampão da enzima e incubado por um período de 16 horas à temperatura de 14°C.

Para verificar a eficiência da reação de ligação com os adaptadores e também aumentar a quantidade do produto, foram realizadas reações de PCR utilizando como iniciador o oligonucleotídeo XDPN18 - CTGATCACTCGAGAGAATC. As reações foram processadas em 50µl de volume total, contendo tampão 1X, dNTP mix (0,6mM), MgCl<sub>2</sub> (1,5mM), XDPN18 (0,6µM), Taq DNA Polimerase (0,5 unidade) e 2µL do produto da ligação. A reação consistiu de uma etapa de desnaturação inicial de cinco minutos a 72 °C, 25 ciclos de um minuto de desnaturação a 94 °C, um minuto de anelamento dos oligonucleotídeos a 55 °C, um minuto de extensão das cadeias a 72 °C e um ciclo de três minutos a 72 °C para a extensão final. O produto amplificado, então, foi purificado por meio de extração com fenol/clorofórmio (1:1) e o resultado foi visualizado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. As amostras purificadas foram quantificadas no aparelho ND 1000 Spectrophotometer (Nanodrop).

Após a amplificação, 10µg do produto de PCR das amostras foram digeridos por 30U da enzima *XhoI* (10U/µL) (Invitrogen) em um volume final de 60µL, e incubado a 37°C por três horas e a 65°C por 10 minutos para a inativação da atividade enzimática. Após a digestão, foi realizada extração com fenol/clorofórmio e precipitação com etanol 70%, e finalmente, as amostras foram ressuspensas em 20µL de tampão de eluição (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM).

Procedeu-se então a elaboração das duas bibliotecas subtrativas, denominadas Subtração R e Subtração RC conforme a Tabela 1. Em ambas as bibliotecas, a amostra teste, chamada de TESTER foi digerida com a enzima de restrição *XhoI* (Invitrogen) que retira a seqüência dos adaptadores e cria os sítios para clonagem no vetor *p-ZERO*

(Invitrogen), também digerido com a enzima *Xho*I. Já a amostra controle, chamada de DRIVER, não foi submetida à digestão enzimática, conservando assim, as seqüências adaptadoras. Desta maneira, foi realizada a subtração das seqüências diferencialmente expressas entre as amostras, por meio da hibridização de 100ng da amostra TESTER, 3µg da amostra DRIVER em 10 µl de solução de hibridização (0,5 M NaCl; 50mM Tris, pH:7,5; 0,2% SDS/40% (vol/vol) formamida) e, após fervura por cinco minutos, a solução foi incubada a 42 °C durante 48 horas. Após a subtração, foi realizada nova extração em fenol/clorofórmio e nova precipitação com etanol 70% e as amostras foram ressuspendidas a 20µL de tampão de eluição (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM).

**Tabela 1:** Descrição das bibliotecas construídas no RaSH.

<b><i>SUBTRAÇÃO R – TUMOR X NORMAL</i></b>		
<b>Tipo de amostra</b>	<b>Concentração da amostra</b>	<b>Resultado da Subtração</b>
TESTER - amostra tumoral	100ng	Genes exclusivamente expressos na amostra tumoral
DRIVER - amostra normal	3µg	
<b><i>SUBTRAÇÃO RC – NORMAL X TUMOR</i></b>		
<b>Tipo de amostra</b>	<b>Concentração da amostra</b>	<b>Resultado da Subtração</b>
TESTER - amostra normal	100ng	Genes exclusivamente expressos na amostra normal
	3µg	
DRIVER - amostra tumoral		

### 3.3.4 Clonagem e Sequenciamento

As amostras de ambas as bibliotecas foram clonadas utilizando-se o Kit pZERO Cloning™ (Invitrogen), numa reação de ligação contendo 0,5µL de plasmídeo digerido previamente pela enzima de restrição *Xho*I, 1U da T4 DNA ligase (10U/µL) (USB), e 3µL de cada subtração e incubado a 16°C por quatro horas. Após a ligação, foi realizada uma extração em fenol/clorofórmio e então, foram adicionados etanol 70%, acetato de amônio 7,5M e glicogênio (20mg/mL) e as amostras permaneceram por 16 horas a -80°C para precipitação do produto. Após o período de precipitação, as amostras foram lavadas com etanol 100% e eluídas em 6µL de tampão de eluição (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM).

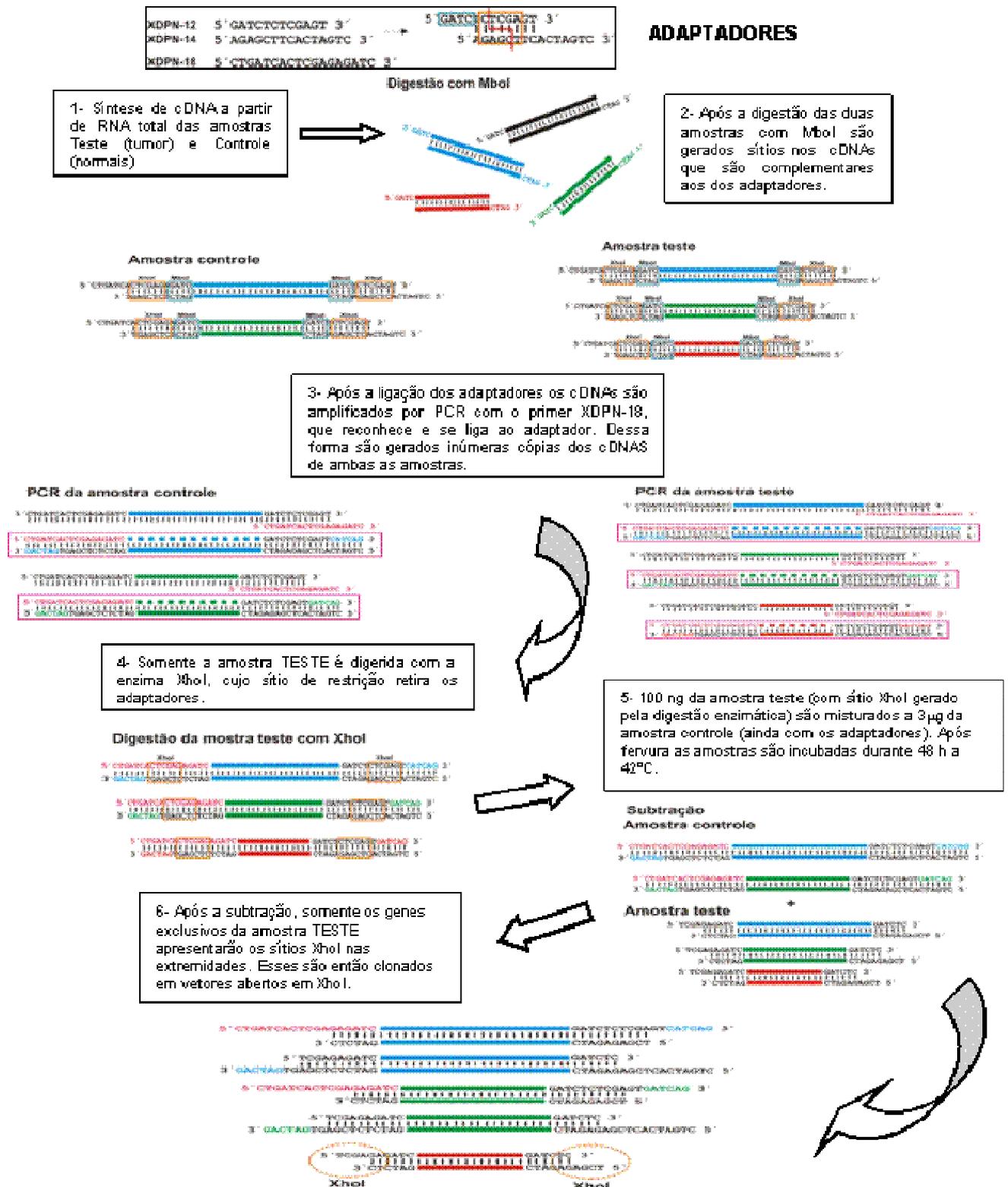
A transformação foi realizada com a transferência de 3µL da reação de ligação para alíquotas de 50µL de bactérias *E.coli* TOP10 quimicamente competentes seguida de incubação por 30 minutos no gelo. Após esse período foi realizado o choque térmico a 42 °C durante 40 segundos, então as células foram novamente colocadas no gelo por dois minutos.

A seguir, foram adicionados 250µL de meio SOC líquido e as bactérias foram incubadas por uma hora a 37 °C sob agitação de 200rpm. Em seguida, 100µL das células foram transferidas para placas contendo 25mL de meio LB low salt sólido e 100mg/mL do antibiótico zeocina e deixadas na estufa a 37 °C por 16 horas.

Após o crescimento das bactérias em meio sólido, todas as colônias foram selecionadas e transferidas para o meio líquido em placa de 96 poços contendo zeocina (100mg/mL). A eficiência de clonagem foi verificada por meio das reações de amplificação dos fragmentos das colônias. A reação de PCR foi realizada com iniciadores universais M13 que se anelam em seqüências do plasmídeo anterior e posterior a inserção do fragmento na clonagem. As reações foram realizadas em um volume final de 45µl contendo 3,2µM de iniciadores pUC/M13, 0,5U Taq DNA polimerase, 125µM de cada dNTP, tampão (Tris-HCl 10mM (pH8. 3); KCl 50 mM; 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>) e 1µl da cultura em meio líquido. As condições da reação foram: desnaturação inicial de três minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 40 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a 55°C por 40 segundos, extensão a 72°C por 55 segundos e um passo de extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto dessa amplificação foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose 1% para verificação do sucesso da clonagem.

Os fragmentos de DNA das colônias foram seqüenciados segundo a técnica de terminação com dideoxynucleotídeos descrita por Sanger e Coulson (1977), utilizando-se o Kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare), seguindo as instruções do fornecedor. Os produtos do seqüenciamento foram submetidos à eletroforese no seqüenciador automático de ABI377 (Applied Biosystems). A análise dos fragmentos clonados foi realizada com o auxílio de ferramentas de Bioinformática ([www.gdm.fmrp.usp.br](http://www.gdm.fmrp.usp.br)) desenvolvidas pelo grupo Computacional do Centro de Terapia Celular/Hemocentro/FMRP-USP.

Figura 1- Esquema da Metodologia de RaSH.



### **3.4 SAGE *in silico***

A seleção dos genes para a validação da expressão gênica diferencial em CRcc foi realizada *in silico* utilizando dados depositados no CGAP (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>) gerenciado pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information) pelo programa H2G (*Hyper and Hypoexpressed Genes*) desenvolvido no Laboratório de Bioinformática do Centro Regional de Hemoterapia (Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto). O programa H2G permite selecionar genes com padrão diferente de expressão entre dois tecidos com base nos parâmetros de razão e diferença. Estes parâmetros são suficientes para a seleção de genes candidatos a serem validados por métodos laboratoriais.

Foram analisadas as bibliotecas: SAGE\_Kidney\_carcinoma\_B\_D2, originadas de carcinoma renal grau III, IV e a biblioteca SAGE\_Kidney\_normal\_B\_1, de rim normal.

Para a seleção dos genes foram considerados os 1000 genes mais expressos e os 1000 menos expressos de cada amostra.

Os 1000 genes mais expressos na biblioteca de SAGE de carcinoma renal e os 1000 genes hipoeexpressos foram submetidos então à análise no programa Gene ontology (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es>). Esse programa agrupa e compara os genes de acordo com as funções moleculares e processos biológicos que desempenham nos tecidos.

### **3.5 Padronização das reações de PCR em tempo real**

#### **3.5.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores**

A padronização das reações de PCR em tempo real foi realizada inicialmente com o gene *GAPDH* que foi utilizado como controle endógeno. Para isso os oligonucleotídeos iniciadores inter-exons foram desenhados, com auxílio do programa *Primer3* (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Os oligonucleotídeos foram desenhados para que os produtos tivessem entre 80 e 150pb e apresentassem temperatura de anelamento de aproximadamente 60° C. Para a seleção da concentração ideal dos iniciadores, que garantem sua saturação, foram realizadas reações de padronização com as concentrações de 0,25µM; 0,4µM; 0,5µM; 0,6µM e 0,8µM.

Essas reações foram processadas em triplicata com volume de 20 $\mu$ L, contendo 20ng do cDNA proveniente da linhagem celular Hep-2 (linhagem celular de câncer de laringe), 10 $\mu$ L de Power Master Mix SYBR<sup>TM</sup> Green (Applied Biosystem) e os oligonucleotídeos iniciadores nas concentrações referidas acima. O Power Master Mix SYBR<sup>TM</sup> Green contém todos os componentes para a reação de PCR em tempo real, exceto a amostra, os oligonucleotídeos iniciadores e a água. Entre esses componentes, estão a enzima AmpliTaq Gold®, que catalisa a reação; a enzima UNG, que degrada DNA dupla fita contendo uracila; o corante SYBR Green, fluoróforo que se intercala em DNA de fita dupla; os dNTPs e o ROX, a referência passiva da reação.

As reações compreenderam uma incubação inicial de dois minutos a 50°C para a ativação da enzima UNG. Em seguida, realizou-se um passo de 10 minutos a 95 °C para inativação da atividade enzimática, evitando, dessa forma, que a enzima degrade os produtos da termociclagem a ser iniciada em seguida e também para a ativação da enzima AmpliTaq Gold®. Posteriormente, seguiram-se 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e um minuto a 60°C para anelamento dos iniciadores e extensão dos fragmentos. Foi acrescentado um passo de dissociação de aproximadamente 20 minutos de duração, no qual ocorre um aumento gradual de 60°C para 95°C a 0,2°C porá cada segundo. A curva de dissociação teve como objetivo a verificação de ocorrência de dímeros de oligonucleotídeos, produtos inespecíficos e de contaminações. A Tabela 2 apresenta as seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para cada gene e os resultados do teste de otimização.

**Tabela 2:** Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação por PCR em tempo real dos genes candidatos a marcadores moleculares e do gene *GAPDH* (controle endógeno) e a concentração otimizada de cada oligonucleotídeo iniciador.

<b>Gene</b>	<b>Oligonucleotídeos</b>	<b>[ ] otimizada</b>
<b><i>GAPDH</i></b>	F - 5' ACCCACTCCTCCACCTTTGA 3' R - 5' TCCACGAGTTCTTGTCCATTC 3'	0,5µM
<b><i>CDK7</i></b>	F - 5' TTTGGGAGCCCCAATAGAG 3' R - 5' ACAGCCCACATGTCCACAC 3'	0,5µM
<b><i>CLDN1</i></b>	F - 5' GGTGCAGAAGATGAGGATGG 3' R - 5' CATTGACTGGGGTCATAGGG 3'	0,4µM
<b><i>CSTB</i></b>	F - 5' TGTCATTCAAGAGCCAGGTG 3' R - 5' GGGAGAGATTGGAACACTCG 3'	0,5µM
<b><i>EPC2</i></b>	F - 5' GCAAGGACATGCCTGATCTC 3' R - 5' TTGCTGTGCTGAAATTGCTC 3'	0,5µM
<b><i>MATR3</i></b>	F - 5' TGGAGCAAGTCACAGTCGTC 3' R - 5' AATTCCTGGTGCTGGATTTG 3'	0,5µM
<b><i>C-MYC</i></b>	F - 5' CTT CTC TGA AAG GCT CTC C 3' R - 5' GTA GAA ATA CGG CTG CAC 3'	0,5µM
<b><i>PITPNB</i></b>	F - 5' CATGGCACAACCAGACTTG 3' R - 5' AATGCTGGGTCTTCATCAGC 3'	0,5µM
<b><i>ZNF706</i></b>	F - 5' AAATGCCAAAAAGCAAGCTG 3' R - 5' TGCTTGCTCTCAAAGTGCTG 3'	0,5µM

A eficiência de amplificação dos iniciadores específicos para os transcritos alvo e os genes normalizadores foram calculadas de acordo com a equação:  $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ . Nesta equação, o slope corresponde à inclinação da reta obtida quando se analisa a variação do CT dos transcritos alvo e normalizador em função do log de diferentes quantidades de cDNA. Para a realização do cálculo acima citado, foram realizadas diluições seriadas de cDNA de *Hep-2*, que foi sintetizado a partir de 2µg de RNA total, sendo as concentrações finais utilizadas: 100ng, 50ng, 25ng, 12,5ng, 6,25ng. As amostras de cDNA nas concentrações citadas foram submetidas à amplificação por PCR em tempo real. O teste foi realizado para cada gene utilizando a concentração de oligonucleotídeos otimizada anteriormente (Tabela 3).

**Tabela 3:** Valor do slope e eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR em Tempo Real.

<b>Gene</b>	<b>Slope</b>	<b>Eficiência</b>
<b><i>GAPDH</i></b>	-3.285	2,01
<b><i>CDK7</i></b>	-3,225	2,04
<b><i>CLDN1</i></b>	-3,641	1,88
<b><i>CSTB</i></b>	-3,300	2,00
<b><i>EPC2</i></b>	-3,415	1,96
<b><i>MATR3</i></b>	-3,34	1,99
<b><i>C-MYC</i></b>	-3,432	1,95
<b><i>PITPNB</i></b>	-3,43	1,95
<b><i>ZNF706</i></b>	-3,300	2,00

### 3.5.2 Síntese de DNA complementar para a validação por PCR em Tempo real

Para reação de RT foi utilizado o Kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems). Foram utilizados 5µg de RNA total, aos quais foram adicionados 1,25µL de oligo dT (0,5µg/µL), 2,5µL de dNTPs mix (25X), 5µL iniciadores randômicos (10X), 5µL de Tampão de Transcriptase Reversa (10X), 2µL de RNase OUT (40U/µL), 5µL da enzima Multiscribe Reverse Transcriptase (50U/µL), e água para completar o volume final de 50µL. A reação consistiu de uma etapa inicial de 25°C durante 10 minutos, e foi finalizada com uma incubação a 37°C por 120 minutos.

Após a etapa de síntese, os cDNAs produzidos tiveram sua qualidade avaliada por meio de uma reação de PCR para o gene da *β-ACTINA* já descrita anteriormente.

### 3.5.3 Validação dos genes diferencialmente expressos por PCR em tempo real

Após a etapa de padronização, foi realizada a análise da expressão diferencial dos genes selecionados. A expressão diferencial dos transcritos de interesse foi determinada pelo método de quantificação relativa em relação a genes normalizadores utilizando como amostra de referência de cDNA da amostra renal normal. Para tanto, foram utilizados RNAs provenientes de tecido tumoral de 35 pacientes, de uma amostra metastática e um pool de amostras normais para minimizar as variações, uma vez que não eram amostras controle do mesmo paciente.

Para o cálculo da expressão diferencial foi utilizando o modelo matemático proposto por PFAFFL (2001);

$$R = (E \text{ alvo})^{\Delta CT_{\text{alvo}}} / (E \text{ endógeno})^{\Delta CT_{\text{endógeno}}}$$

Onde, “E alvo” corresponde à eficiência de amplificação dos iniciadores específicos para o transcrito alvo, “E normalizador” corresponde à eficiência de amplificação dos iniciadores específicos para o gene normalizador, “ΔCT alvo” corresponde à diferença entre o CT do transcrito alvo obtido para a amostra em análise e o CT do transcrito alvo obtido para a

amostra referência, “ $\Delta$ CT normalizador” corresponde à diferença entre o CT do gene endógeno obtido para a amostra em análise e o CT do gene endógeno obtido para a amostra referência.

O *cut-off* para validação de cada gene foi de  $\geq 2.0$  fold change, tanto para expressão reduzida como aumentada.

### **3.6 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada para avaliar se existe associação entre a expressão gênica e o estadiamento tumoral, assim, os valores da expressão gênica (R) foram analisados, por meio do teste não-paramétrico de Kruskal Wallis. Os valores de *P* menor que 0,05 foram considerados significantes. Foi realizada outra análise com o intuito de verificar a significância da expressão global de cada gene em todas as amostras avaliadas no trabalho, para isso, foi utilizado o teste não-paramétrico de Wilcoxon. As análises estatísticas foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. José Antônio Cordeiro do Departamento de Epidemiologia e Saúde Coletiva da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Farmep).

### **3.7 Análise das vias metabólicas dos genes validados**

Com a intenção de avaliar as vias metabólicas nas quais os genes selecionados participam e estabelecer as possíveis relações entre eles, os dados obtidos foram submetidos ao software Ingenuity pathways analyses (IPA) (<http://www.ingenuity.com>). Esse programa organiza e dispõe os genes em mapas de vias celulares através da sobreposição com o banco de dados do software, que contém mais de 20 mil genes, e gera redes de associações entre eles. Essas redes descrevem as relações funcionais entre os produtos gênicos baseando-se em interações biológicas conhecidas descritas na literatura.

### 3.8 Clonagem e expressão da proteína znf706

Baseando-se nos dados obtidos durante a evolução do projeto a proteína zinc finger 706 (ZNF706) foi escolhida para ser clonada e induzida. A seqüência da proteína codificada pelo gene *ZNF706* foi obtida após estudos em bancos de dados genômicos públicos. Baseando-se nessa seqüência foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação completa do gene *ZNF706* tendo como molde cDNAs sintetizados a partir de RNAs extraídos das amostras tumorais de CRcc. Além da seqüência iniciadora dos genes, foram adicionados à construção dos oligonucleotídeos: a) uma cauda de seis histidinas posteriormente utilizada nos processos de purificação, b) sítios de restrição *Tagzime* para a retirada da cauda de histidina da proteína purificada, c) Um códon de iniciação, para início da tradução inclusive da cauda de poli-Histidina e d) um *overhang* necessário para a inserção do produto amplificado no vetor de expressão (Figura 2).

```
>gi|110227592|ref|NM_016096.3| Homo sapiens zinc finger
protein 706 (ZNF706), transcript variant 2, mRNA
CAGAAAGGCACATGGGCGGGGCTGCGAGGAGCAGGCGGGGCGGGGCGCCGAGGAGAGC
GGCGCGGCGTGC GCGGGCAGGAGGCGTAGTGGTCTCCCCTAAGGCTGAGGCGGCGGCGG
GCGCGCGGCGGCGGGCGGGCGTGC GAGGCTGTTGTGCTCCCGGCTCTCGTGTTCCTCCTC
CTGAGCGGGTGGAGGAGGCCAAGCGGTGCTGGGCGGCTCCCCCTTCCTTTCCCTCCG
GCGTCCCTCCCCGGCCCTCTCGGCTGCACTGTCTCTCCGACGCAAGACTGTCCCGGCC
CGGATATGGCTCGTGGACAGCAGAAAATTCAGTCTCAGCAGAAAAATGCCAAAAAGCAA
GCTGGACAAAAGAAGAAACAAGGACATGACCAAAGGCTGCTGCCAAAGCTGCCTTAAT
ATATACCTGCACTGTCTGTAGGACACAAATGCCAGACCCTAAGACCTTCAAGCAGCACT
TTGAGAGCAAGCATCCTAAGACTCCACTTCCTCCAGAATTAGCTGATGTTTCAGGCATAA
GGTTGTTTACAGGTGAATTCATGACACCTTTGACTCTTCTACTGTCTCAGACCTTAGGT
AACATACCTGCAGCTGCTTTTCTAACAACTGTTGATCAGCAAAAATAAAGGGGCTACA
GAAACACTCATTTTTATGCTGTTCCCTCTTGGGCTTCATGCAAAGACAATTCTGTGTAA
ATGTACAGTTGACTCTGATTTGGAAAATATGAAAATCAGTCCATCCTTGTATAAAAAAT
TTTTTTACAATTGTAATTATATTGATGTTTATATTGTGTAATAAATACTCATTTAATAAA
ATAGTACTTTGATTTACGACATCACAGGATAAATGGTTTTAGAAAATCTGTTCTAACTT
TCCACATTATTTGCCTTATAAAAAATCTAATGAATTCATCAGCTAGAATTGCAAGTGCAA
TTCTTATATCCCTTTCTCTGCTCAGTGGCAGGTTCCCTCAGTTAACTAGAGCAGACTGA
TTCATTAATAATTGTGCATACGATTTTATGGGCAGCTGATGATCTAGGTGAAAAATGACT
TATCTGCTGCCTTAGTATATTGCGGTTATGTGTCATTGTACCCCTCTGATCATTTCCTG
TGTTTGAGTTGGAATATTTAAAAAACTAACTAGTCTAAAAAATAAAAA
```

#### Oligonucleotídeos

```
ZNF706F 5' CATCACCATCAGATGGCTCGTGGACAG 3'
ADAPTF 5' CACCATGAAACATCACCATCACCATCAG 3'
ZNF706 5' TTATGCCTGAACATCAGCTA 3'
```

Histidina  
 Sítio de restrição Tagzyme  
 Start códon  
 CACC overhang para ligação  
 no vetor

**Figura 2** - seqüência completa do gene ZNF706 e a estratégia de construção dos oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação em amostras de CRcc.

### 3.8.1 Amplificação do gene ZNF706 em amostras tumorais

As reações de PCR para amplificação do gene ZNF706, após a padronização, foram realizadas utilizando 2µL do cDNA da amostra tumoral de CRcc, 10µL de água, 5µL de tampão B 5X, 2µL dNTPs (10mM), 2µL do iniciador ZNFR, 2µL do iniciador ZNFF e 2µL da enzima elongase (Invitrogen). O ciclo de amplificação foi de 30 segundos a 94°C, 94°C por um minuto, 65°C por um minuto e 30 segundos, 10 ciclos onde a temperatura foi diminuída 1°C por ciclo até 55°C, 72°C por um minuto, 25 ciclos de 94°C por um minuto, 55°C por um

minuto e 30 segundos e extensão final de um minuto a 72° C. Após a checagem da amplificação em gel de agarose procedeu-se novo PCR com 2µL produto da primeira reação e o iniciador adaptador ZNFADPT nas mesmas condições de amplificação.

### 3.8.2 Ligação do gene ao vetor de expressão

A clonagem do produto amplificado do gene *ZNF706* foi realizada utilizando o kit de expressão Champion pET Directional TOPO Expression Kit (Invitrogen) seguindo as normas do fabricante. 50µL do produto fresco da amplificação com o adaptador do gene *ZNF706* purificado foram submetidos à ligação ao vetor de expressão pET101 com a seguinte reação: 2 µL do produto de PCR, 1 µL salt solution, 4 µL água e 1µL do vetor pET101. A reação ocorreu à temperatura ambiente durante 30 minutos e o produto da ligação foi transformado quimicamente em bactérias *E. coli* TOP 10 com choque térmico a 42°C por 40 segundos. Após a transformação foram adicionados 250µL de meio SOC e as bactérias foram mantidas a 37°C durante uma hora sob agitação e plaqueadas em meio LB sólido com Ampicilina (50mg/ml) como antibiótico seletivo e incubadas em estufa a 37°C por 16 horas. Dez colônias transformantes foram selecionadas e após crescimento a 37° C por 16 horas em meio líquido com antibiótico foram submetidas à extração plasmidial com o kit PureLink kit plasmid mini prep (Invitrogen). A eficiência da clonagem foi avaliada por PCR direto do vetor utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para o gene *ZNF706* com a mesma ciclagem utilizada na amplificação do gene.

### 3.8.3 Seqüenciamento

Todos os clones que apresentaram o inserto amplificado do gene *ZNF706* foram então submetidos ao seqüenciamento no aparelho ABI377 utilizando o kit Dyynamic ET Terminator (GE-Healthcare- USA) para a verificação da seqüência completa do gene e da direção correta do inserto no vetor. As reações de seqüenciamento foram realizadas

utilizando 4µL da miniprep, 4µL do Dye ET terminator Mix, 2µL do oligonucleotídeo T7 terminator (5pmol/µL) e 2µL de água. Após a incubação das amostras durante 10 minutos a 95°C, as reações foram mantidas no gelo, misturadas ao mix e submetidas a 25 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo de, 95°C por 20 segundos, 15 segundos a 55°C e um minuto a 60°C. Concluída a reação de seqüenciamento as amostras foram precipitadas utilizando 2µL de acetato de sódio e 80µL de álcool 95%, centrifugadas e lavadas em 150µL de etanol 70%. Após secagem, à temperatura ambiente, foram adicionados 1,4µL de corante a cada amostra e essas desnaturadas por dois minutos a 95°C. A eletroforese foi conduzida no aparelho ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Os eletroforogramas obtidos foram analisados por meio do programa Sequencing Analysis versão 3.3 e as seqüências foram posteriormente analisadas por meio do *software* “Sequencer versão 3.1 automático” e alinhadas com o auxílio do programa BLAST (NCBI).

#### **3.8.4 Indução da expressão protéica**

Com os vetores de expressão contendo os insertos desejados, foi iniciada a padronização dos processos de expressão e purificação protéica. Assim, 3µL do vetor de expressão pET101, portando o gene *ZNF706* clonado foram utilizados para a transformação química em bactérias BL21DE3 e crescidas em 10mL de meio LB líquido com ampicilina (50mg/mL) sob agitação a 37°C por 16 horas. Após o crescimento do pré-inóculo, 500µL da cultura foi submetida à leitura da DO 600nm (0,5-0,8). As culturas foram então fracionadas em alíquotas de 10 ml e procederam-se os testes de indução com IPTG. Cada cultura foi induzida pela adição de IPTG nas concentrações de 0,5mM e 1mM. Alíquotas de 500µL foram retiradas da cultura no momento da indução (tempo zero) e 2, 4, e 16 horas após a adição do IPTG para se estabelecer o melhor tempo de indução. Essas alíquotas foram centrifugadas e armazenadas a -20°C. Os sedimentos foram então fracionados, utilizando um sonicador, em tampão de lise para o rompimento da parede celular e extração das proteínas e submetidas à avaliação por SDS–PAGE segundo Laemmli (1970), para avaliação da indução e testes de solubilidade da proteína.

### 3.8.5 Indução em larga escala da proteína

Após a confirmação da expressão da proteína ZNF706 heteróloga foram conduzidos os experimentos de indução em larga escala da proteína. Para isso 3mL do pré-inoculo transformado com o clone MP3, crescido por 16 horas sob agitação, foram adicionados em 300mL de meio LB líquido suplementado com 300 $\mu$ L de ampicilina (50mg/mL). Após atingir a DO 600nm de 06-08 a cultura foi dividida fracionada em 10 tubos de centrifuga descartáveis contendo 30mL da cultura aos quais foram adicionados 75 $\mu$ L de IPTG (0,5mM). As culturas foram mantidas durante quatro horas a 37°C sob agitação, centrifugadas a 13000rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento armazenado a -20°C. O sedimento congelado da cultura de 30mL foi eluído em 5mL de tampão de sonicação (100mM NaCl, 10mM tris, 50mMNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH8), sonicado durante 30 segundos e centrifugados. Foram retirados 50 $\mu$ L do sobrenadante e adicionados 40 $\mu$ L de Tampão de amostra 4X (240mM Tris, 0,8 SDS 10%, 200mM beta mercapto, 40% glicerol, azul de bromofenol). O pellet foi ressuspendidoem 1mL de Tampão de sonicação 1X contendo 6M de uréia. A 50 $\mu$ L da solução foram adicionados 40 $\mu$ L de tampão de amostra 4X. Todas as amostras foram incubadas a 95°C durante 15 minutos e 12 $\mu$ L de cada amostra foram aplicados ao gel SDS-PAGE.

### 3.8.6 Purificação da proteína

O sobrenadante obtido após a sonicação das culturas celulares foi purificado utilizando *beads* magnéticos Talon Dynabeads (Invitrogen) segundo as instruções do fornecedor. Assim, 50 $\mu$ L de Talon Dynabeads (200mg) foram adicionados em 700 $\mu$ L de tampão de ligação em um tubo de centrifuga. Os *beads* foram passados pelo magneto por dois minutos e o tampão descartado. Os *beads* foram ressuspendidos em 100 $\mu$ L de tampão de lavagem e a proteína his-tag foi adicionada e incubada durante 10 minutos sob leve agitação. Após a passagem durante dois minutos no magneto, o sobrenadante foi descartado e os *beads* lavados por quatro vezes com 700 $\mu$ L de tampão de lavagem, sendo a solução passada pelo magneto a cada lavagem. As proteínas foram então retiradas dos *beads* após incubação por cinco minutos em 100 $\mu$ L de tampão de eluição com passagem pelo magneto e transferência do sobrenadante para um tubo novo. A proteína purificada foi

quantificada por espectrometria e apresentou uma concentração de 0,7mg/mL, quantidade suficiente para alguns estudos estruturais.

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização das amostras

No presente estudo foram analisadas amostras pareadas com o tecido renal normal de 35 pacientes portadores de CRcc e uma amostra metastática de retroperitônio. Somente um paciente não apresentou dados clínicos disponíveis, sendo considerado como desconhecido nas nossas análises.

Os dados clínicos dos 36 pacientes mostraram quem 45,8% eram do sexo feminino e 54,2% do sexo masculino, com idade variando de 28 a 79 anos sendo a média de 56,41 anos. Observando o estadiamento TNM, 31,4% (11/35) dos pacientes foram classificados em Tipo I, 34,2% (12/35) Tipo II, 11,4% (4/35) Tipo III e 20% (7/35) Tipo IV (Tabela 4).

**Tabela 4:** Dados clínicos dos pacientes com CRcc – Código utilizado no PCR em Tempo Real; tipo de procedimento cirúrgico e estadiamento.

<b>Código</b>	<b>Cirurgia</b>	<b>Estadiamento</b>
T1	Nefrectomia radical / rim esquerdo	Tipo III - "T3 N0 M0"
T2	Nefrectomia radical / rim direito	Tipo II - "T2 N0 M0"
T3	Nefrectomia radical / rim direito	Tipo IV - "T4NxM1"
T4	Nefrectomia radical / rim esquerdo	Tipo II - "T2 N0 M0"
T5	Nefrectomia radical / rim esquerdo	Tipo I – "T1b N0 M0"
T6	Nefrectomia radical / rim esquerdo	Tipo II - "T2 N0 M0"
T7	Nefrectomia radical / rim esquerdo	Tipo III - "T3a N0 M0"
T8	Nefrectomia radical	Tipo IV - "T3 N3 M1"
T9	Nefrectomia parcial / rim direito	Tipo I – "T1a N0 M0"
T10	Nefrectomia radical / rim direito	Tipo III - "T3a N0 M0"
T11	Nefrectomia radical / rim direito	Tipo II – "T2 N0 M0"
T12	Nefrectomia radical / rim direito	Tipo I - "T1b N0 M0"
T13	Nefrectomia radical	Tipo I – "T1 N0 M0"
T14	Nefrectomia radical / rim esquerdo	Tipo I – "T1a N0 M0"

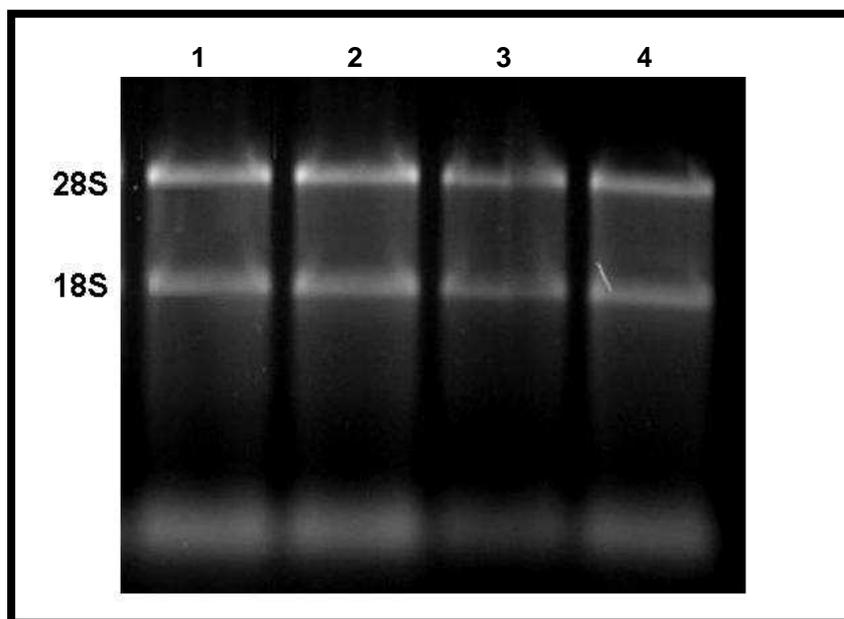
T15	Nefrectomia radical / rim direito	Tipo I – "T1a N0 M0"
T16	Nefrectomia parcial / rim direito	Tipo I - "T1N0 M0"
T17	Nefrectomia radical / rim esquerdo	Tipo II - "T2 N0 M0"
T18	Nefrectomia radical / rim direito	Tipo II - "T2 N0 M0"
T19	Nefrectomia radical / rim esquerdo	Tipo II - "T2 N0 M0"
T20	Nefrectomia parcial / rim esquerdo	Tipo II - "T2N0M0"
T21	Nefrectomia radical / rim direito	Tipo III - "T2N0M0"
T22	Nefrectomia radical / rim direito	Desconhecido
T23	Nefrectomia radical / rim esquerdo	Tipo II - "T2N0M0"
T24	Nefrectomia radical / rim esquerdo	Tipo III - "T3N0M0"
T25	Nefrectomia radical / rim esquerdo	Tipo IV- "T3bN0M1"
T26	Nefrectomia radical / rim esquerdo	Tipo III - "T3aN0M0"
T27	Nefrectomia radical / rim esquerdo	Tipo II - "T2N0M0"
T28	Nefrectomia radical / rim esquerdo	Tipo I - "T1N0M0"
T29	Nefrectomia radical / rim direito	Tipo II - "T2N0M0"
T30	Nefrectomia parcial / rim esquerdo	Tipo IV - "T1N1M1"
T31	Nefrectomia radical / rim esquerdo	Tipo II - "T2N0M0"
T32	Nefrectomia radical / rim esquerdo	Tipo I - "T1aN0M0"
T33	Nefrectomia parcial / rim esquerdo	Tipo I - "T1aN0M0"
T34	Nefrectomia radical / rim esquerdo	Tipo I - "T1N0M0"
T35	Nefrectomia radical / rim esquerdo	Tipo IV - "T3aN2M1"
MT2	Ressecção de massa retroperitoneal	Metástase

**Tabela 5** - critérios para a classificação TNM e estadiamento clínico do Carcinoma Renal de Células Claras.

<b>Classificação T</b>	
<b>T1</b>	Localizado no rim, T1a <4cm , T1b <7cm
<b>T2</b>	Localizado no rim, >7cm
<b>T3</b>	Não ultrapassa a Cápsula da Gerota
<b>T3a</b>	Alcança a adrenal ou gordura perirenal
<b>T3b</b>	Alcança a veia renal, intra-renal ou veia cava inferior infra-diafragmática
<b>T3c</b>	Alcança a veia cava inferior supra-diafragmática
<b>T4</b>	Ultrapassa a Cápsula da Gerota
<b>Classificação N</b>	
<b>N0</b>	Sem acometimento de linfonodos
<b>N1</b>	Um único linfonodo acometido
<b>N2</b>	Mais de um linfonodo acometido
<b>Classificação M</b>	
<b>M1</b>	Metástase à distância
<b>Estadiamento Clínico</b>	
<b>Tipo I</b>	T1N0M0
<b>Tipo II</b>	T2N0M0
<b>Tipo III</b>	T1-2N1M0; T3a-c N0-1 M0
<b>Tipo IV</b>	T4 N0-1 M0; T1-4 N1 M0; T1-4 N0-2 M1

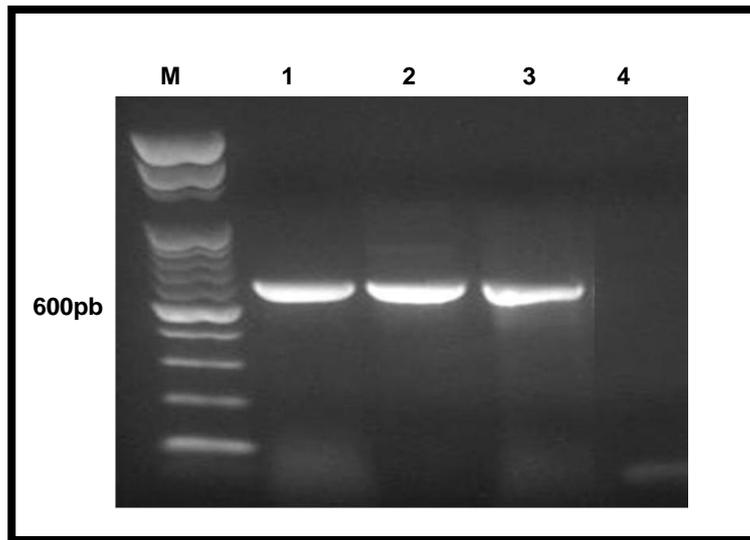
#### 4.2 Preparo das amostras

Todas as amostras pareadas de CRcc e córtex renal normal foram submetidas à extração de RNA e quantificação em espectrofotômetro (ND 1000 Spectrophotometer – Nanodrop). O teste de qualidade da extração do RNA foi realizado por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 3), onde se observa as bandas correspondentes às duas subunidades ribossômicas 28S e 18S demonstrando o sucesso das extrações.



**Figura 3** - Avaliação da qualidade dos RNAs em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, mostrando as duas subunidade 28s e 18S. Nas canaletas temos: **1 e 2** – RNA da amostra tumoral; **3 e 4** – RNA da amostra normal.

A partir do RNA extraído foram sintetizados cDNAs para cada amostra, e, para avaliar a qualidade de reação da síntese, foi realizada uma reação de PCR com oligonucleotídeos iniciadores para o gene da  $\beta$ -ACTINA cujo produto apresenta 613 pb e está apresentado na Figura 4.

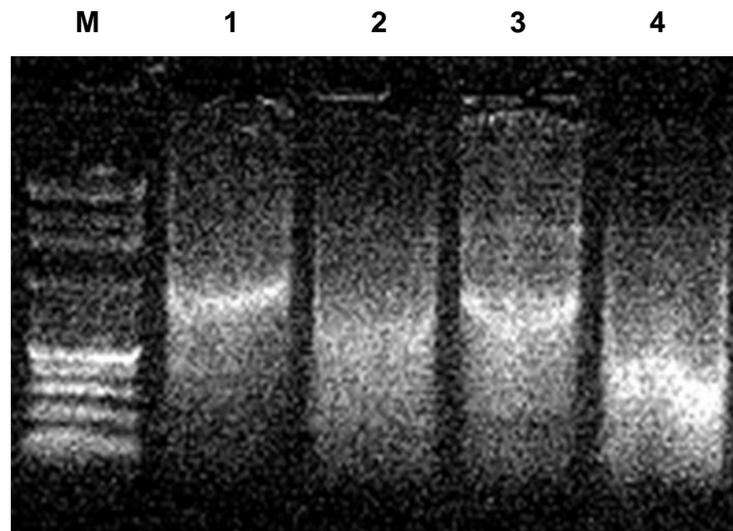


**Figura 4** – Foto do gel de agarose a 1% da reação de PCR com  $\beta$ -ACTINA para avaliar a qualidade da síntese de cDNA. Nas canaletas temos: M – Padrão de peso molecular 100pb DNA Ladder (Amresco); **1** – Produto de PCR do CRcc; **2** - Produto de PCR do córtex renal normal; **3** – Controle positivo da reação de PCR e **4** – Controle negativo da reação de PCR, sem qualquer amplificação inespecífica.

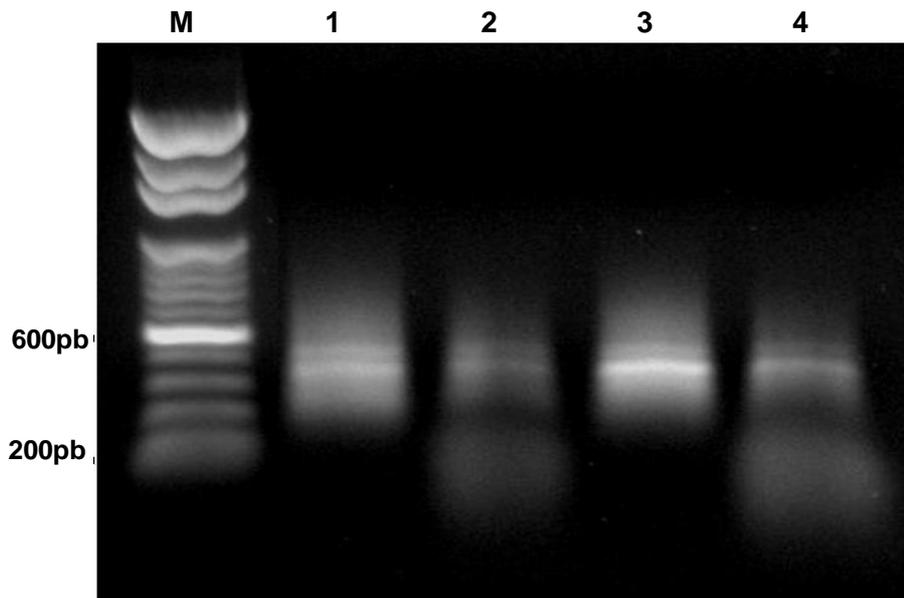
#### 4.3 Elaboração da biblioteca subtrativa RaSH

Para construção das bibliotecas, os cDNAs do par de amostras (07.07709) foram utilizados como molde para a síntese da segunda fita de DNA. Os cDNAs dupla fita das duas amostras foram digeridos com a enzima de restrição *Mbol* (Invitrogen), para criar sítios de ancoragem para os adaptadores XDPN12 e XDPN14 e o resultado da digestão foi checado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (Figura 5). Em seguida, os adaptadores XDPN12 e XDPN14 foram ligados aos cDNAs das duas amostras em uma reação de ligação por 16 horas a 14°C com a enzima T4 ligase.

Para avaliar a eficiência da reação de ligação com os adaptadores e também para aumentar a quantidade de produto, foram feitas reações de PCR utilizando como iniciador o oligonucleotídeo XDPN18. Este produto, então, foi purificado utilizando-se o QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) e o resultado foi visualizado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (Figura 6). As amostras purificadas foram quantificadas no aparelho ND 1000 Spectrophotometer (Nanodrop).



**Figura 5** – Foto do gel de agarose da digestão dos cDNAs dos tecidos tumoral e normal com *Mbol*. Nas canaletas temos: M – Padrão de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Amresco); **1** – Produto não digerido do CRcc; **2** - Produto de digestão com *Mbol* do CRcc; **3** - Produto não digerido do córtex renal normal; **4** - Produto de digestão com *Mbol* do córtex renal normal;

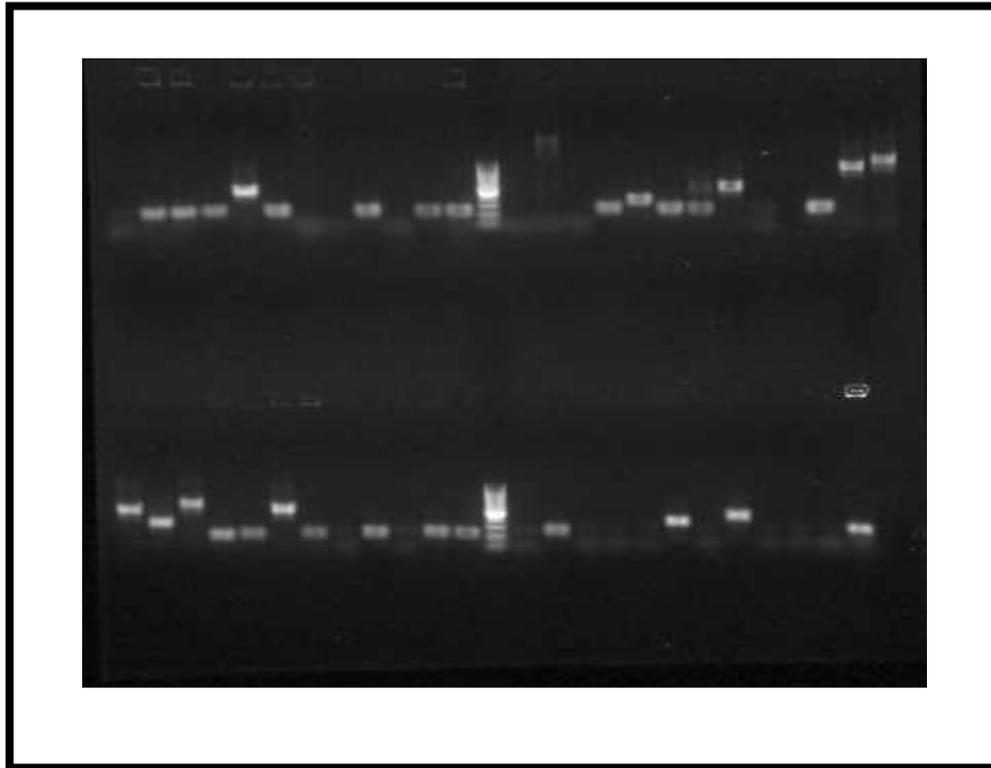


**Figura 6** – Foto do gel de agarose 1% da purificação da reação de PCR com o oligonucleotídeo XDPN18 para avaliar a eficiência da reação de ligação com os adaptadores. Nas canaletas temos: **M** – Padrão de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Amresco); **1** – Produto de PCR do CR-cc purificado; **2** - Produtos de PCR do CRcc não-purificado; **3** - Produtos de PCR do córtex renal normal purificado; **4** - Produtos de PCR do córtex renal normal não-purificado.

Após a confirmação das amplificações dos cDNAs foram elaboradas duas bibliotecas, denominadas Subtração R e Subtração RC conforme a Tabela 1. Em ambas as bibliotecas, a amostra teste (TESTER) foi digerida com a enzima de restrição *Xho*I (Invitrogen) que retira a seqüência dos adaptadores e cria os sítios para clonagem no vetor *p-ZERO* (Invitrogen) também digerido com a enzima *Xho*I. Já a amostra controle (DRIVER) não foi submetida à digestão enzimática, conservando assim as seqüências adaptadoras. Desta maneira, foi realizada a subtração das seqüências diferencialmente expressas entre as amostras, por meio da hibridização de 100ng da amostra TESTER e 3µg da amostra DRIVER a 42°C durante 48 horas em tampão de subtração. Após extração com fenol/clorofórmio e precipitação com etanol, o produto da subtração foi eluído em 20µl de solução de Tris/EDTA.

As amostras de ambas as bibliotecas foram ligadas ao vetor de clonagem *p-ZERO* (Invitrogen), já digerido previamente pela enzima de restrição *XhoI*, pela enzima *T4 ligase* (1U/ $\mu$ l - USB). Decorrida a ligação, os vetores foram transformados em bactérias quimicamente competentes Top10 (Invitrogen) por meio de choque térmico a 42°C e incubadas sob agitação de 180rpm a 37°C durante uma hora para crescimento em meio S.O.C líquido (Invitrogen). Finalmente, as bactérias foram semeadas em placa contendo meio sólido suplementado com o antibiótico zeocina (100mg/ml) e incubadas na estufa a 37°C por 16 horas para o crescimento dos clones portadores de insertos correspondentes aos genes diferencialmente expressos nas duas amostras. Foram obtidos 26 clones na biblioteca tumoral e 262 clones na biblioteca controle.

Todos os clones foram transferidos para o meio líquido e submetidos à triagem para seleção daqueles que apresentaram insertos por meio da amplificação com os iniciadores M13. A Figura 7 mostra a foto de gel de agarose 1% com os produtos amplificados evidenciando a eficiência da clonagem, com os vários insertos com tamanhos diferentes. Após a seleção dos clones com os insertos de interesse, 54 clones foram descartados por não apresentarem insertos clonados, portanto a biblioteca de Córtex Renal Normal apresentou 209 clones e a biblioteca de CRcc apresentou 25 clones que continham os fragmentos de interesse. Todos esses fragmentos foram seqüenciados e analisados pela ferramenta de bioinformática ([www.gdm.fmrp.usp.br](http://www.gdm.fmrp.usp.br)).



**Figura 7** – Foto do gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo evidenciando a amplificação dos diferentes insertos clonados no vetor pZERO.

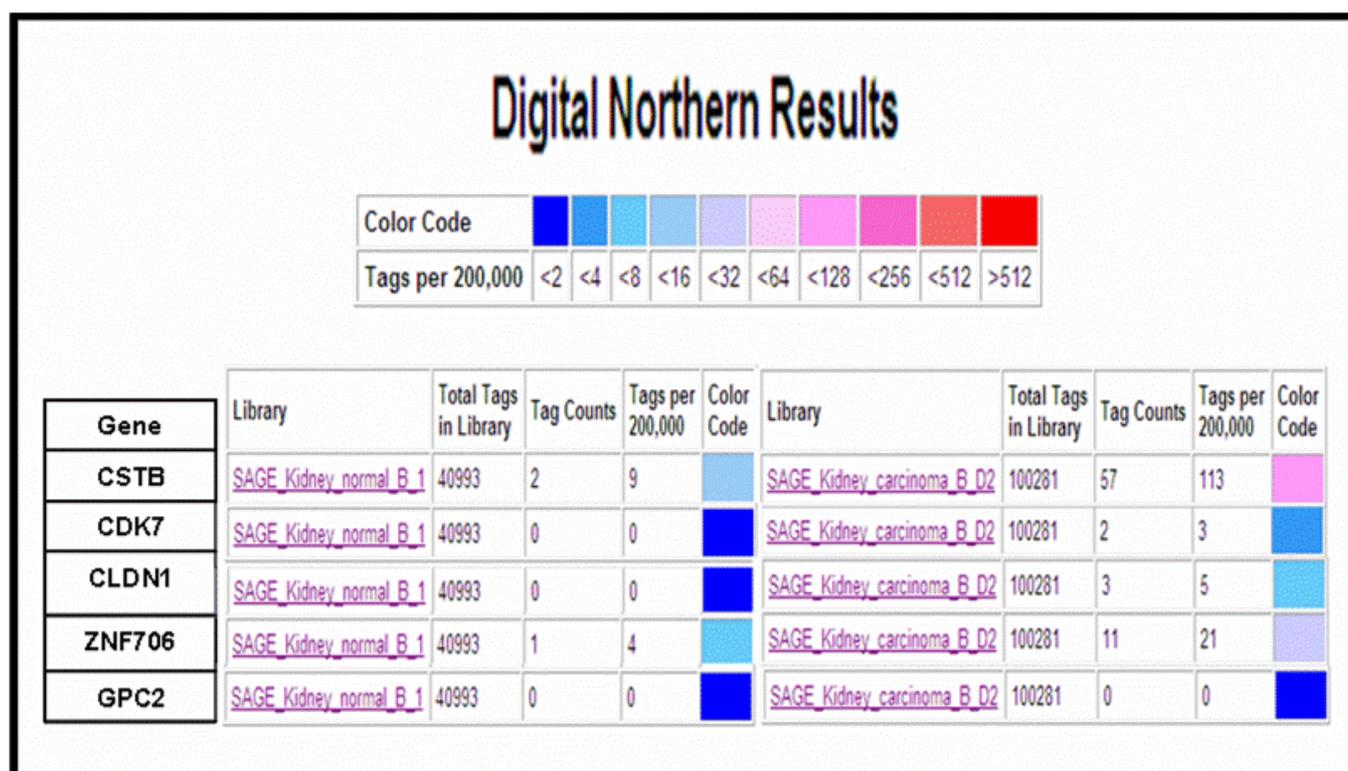
Após o sequenciamento automático, 86 seqüências foram descartadas por apresentarem baixa qualidade e 35 por representarem seqüências de vetor. Embora a eficiência das bibliotecas não tenha sido a esperada, as análises dos genes nos apresentaram dois potenciais candidatos à validação de expressão em outras amostras. Os genes *MATR3* e *PITPNB* apresentaram-se com a expressão gênica diminuída no córtex renal normal, uma vez que foram encontrados na biblioteca do tecido tumoral.

#### 4.4 Seleção de genes candidatos por meio de Sage *in silico*

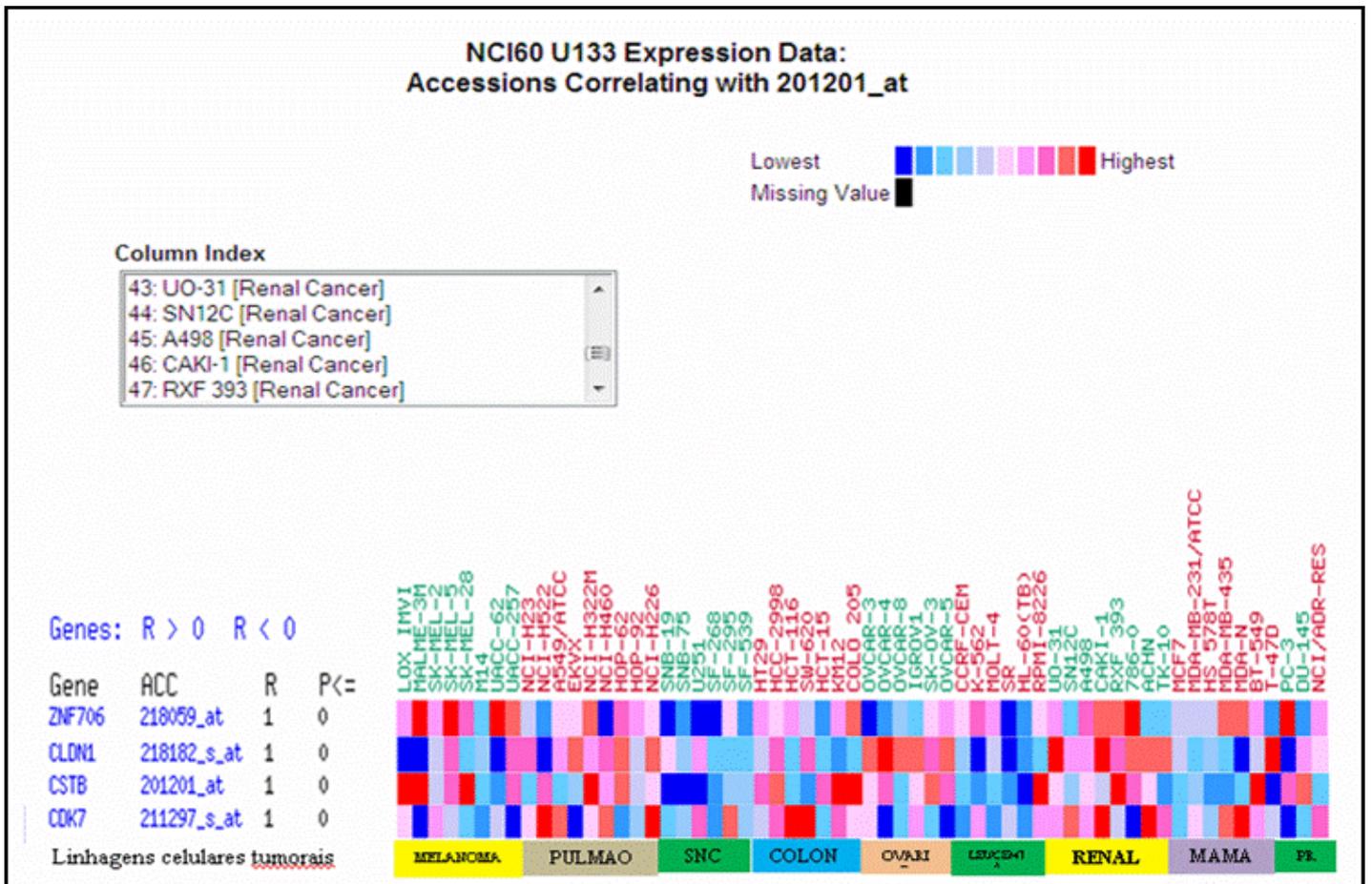
As análises de SAGE *in silico* foram realizadas em bancos de dados públicos depositadas no CGAP (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE/AnatomicViewer>) e no GDM (<http://www.gdm.fmrp.usp.br/cgi-bin/h2g>). Foram utilizados os dados obtidos de duas bibliotecas de SAGE – a biblioteca de tumor SAGE\_Kidney\_carcinoma\_B\_D2, originária de um carcinoma em transição com grau de diferenciação III-IV de uma mulher de 73 anos. E a biblioteca controle, SAGE\_Kidney\_normal\_B\_1, obtida de um rim normal de uma mulher de 53 anos (Figura 8). Após a análise com o auxílio do programa Babelomics (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>), os genes de ambas as bibliotecas foram clusterizados conforme a sua função biológica e selecionados de acordo com a relevância no processo oncológico. Baseando-se nessas análises, os genes *CDK7*, *CLDN1*, *CSTB*, *EPC2* e *ZNF706* foram selecionados para a avaliação da expressão gênica *in silico*.

O comportamento da expressão dos genes selecionados também foi avaliado *in silico* conforme dados de *microarrays* obtidos em experimentos realizados com diferentes linhagens celulares tumorais (Figura 9). Os resultados obtidos confirmam a superexpressão dos genes observada nas análises de SAGE *in silico*. Podemos observar que o gene *CLDN1* apresenta super expressão em todas as oito linhagens de tumores renais analisadas e o gene *CDK7* em seis das linhagens. O gene *CSTB* assim como o *ZNF706* demonstraram uma super expressão em cinco linhagens, sendo que as culturas SN12C e TK-10 apresentaram uma regulação negativa da expressão desses dois genes. Esses resultados ratificam a seleção desses genes para a validação experimental por PCR em tempo real em tecidos tumorais de CRcc. Outro dado interessante, também apresentado na Figura 8, é o comportamento desses genes em outras linhagens tumorais humanas. Pode-se observar que, de maneira geral, esse grupo de genes também se apresentam induzidos na maioria das linhagens tumorais de pulmão e suprimidos na maioria das linhagens de sistema nervoso central (SNC), mama e nas leucemias. O gene *CLDN1*, por exemplo, apresenta um comportamento bastante semelhante de indução nas células de rim, ovário e pulmão e suprimidos em melanomas, SNC, leucemias e mama. Essas observações além de sustentar

a seleção desses genes como alvos em nosso estudo, sugerem que esses também possam apresentar importantes funções no estabelecimento e desenvolvimento de outras neoplasias.



**Figura 8:** Expressão gênica diferencial dos genes *CSTB*, *CDK7*, *CLDN1* e *ZNF706* em carcinomas renais e tecidos normais obtidos nas análise de SAGE *in silico*.

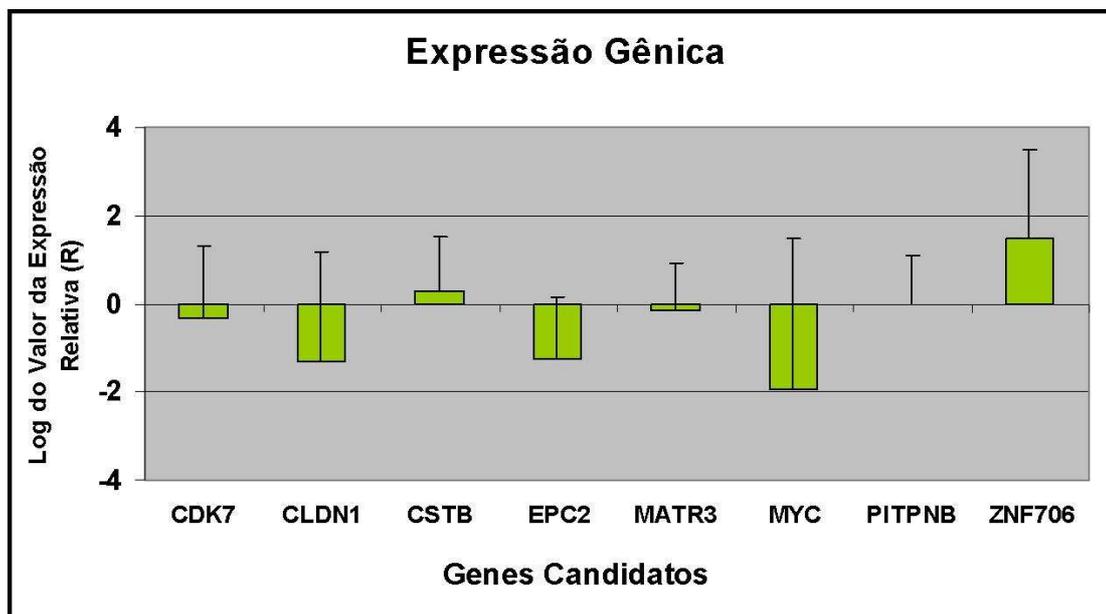


**Figura 9:** Avaliação *in silico* da expressão dos genes *ZNF706*, *CLDN1*, *CSTB* e *CDK7* por *microarrays* em diversas linhagens tumorais.

#### 4.5 Análise da Expressão gênica

Os genes *CDK7*, *CLDN1*, *CSTB*, *EPC2* e *ZNF706* foram selecionados baseados na análise de Sage *in silico* e tiveram seu padrão de expressão gênica validado pela técnica de PCR em Tempo Real. Para a validação dos candidatos a marcadores foram utilizadas 35 amostras de Carcinoma Renal de células claras, uma amostra metastática de CRcc em retroperitônio e um pool de amostras de tecido renal normal (grupo controle).

Os resultados obtidos para a expressão total demonstram o aumento na indução dos genes *CSTB* e *ZNF706* em CRcc em comparação ao tecido renal normal (valor 0 no eixo x), confirmando assim, os dados obtidos virtualmente. O gene *ZNF706* apresentou os maiores níveis de expressão, mais de quatro vezes o valor apresentado pelo controle, e o *CSTB* o dobro da expressão. Esse comportamento não foi observado para os genes *CDK7*, *CLDN1*, *EPC2*, *MATR3*, *C-MYC* e *PITPNB* que apresentaram expressão negativa nos tumores (Figura



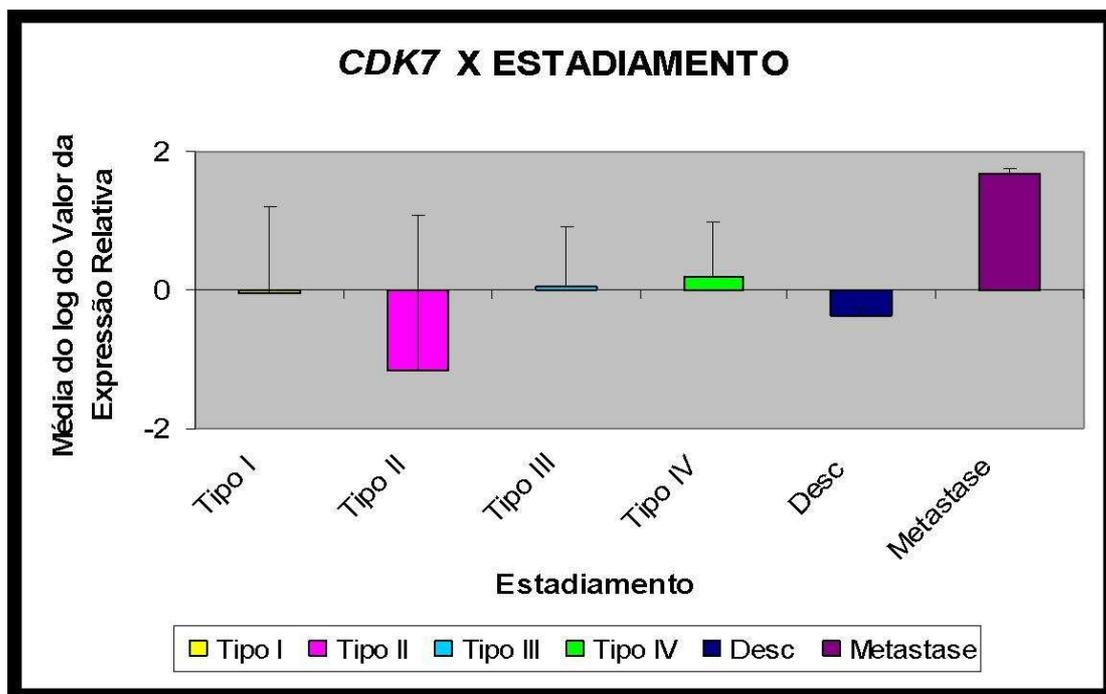
10).

**Figura 10:** Expressão total dos genes *CDK7*, *CLDN1*, *CSTB*, *EPC2*, *MATR3*, *C-MYC*, *PITPNB* e *ZNF706* quantificadas por PCR em Tempo Real em 36 amostras de CRcc. Os dados apresentados estão normalizados pelo gene endógeno *GAPDH* e subtraídos do valor da expressão do controle normal (valor 0 no eixo X).

O *CDK7* é membro da família de quinases dependentes de ciclina (*CDK*) que são conhecidas como importantes reguladores da progressão do ciclo celular. A proteína codificada por este gene forma um complexo trimérico com a ciclina H e *MAT1* que funciona como uma quinase ativadora de *CDK* (*CAK*). Além disso, é um componente essencial do fator de transcrição *TFIIF* que está envolvido na iniciação da transcrição e reparo de DNA realizando dessa maneira a ligação entre a regulação da transcrição e o ciclo celular (FISHER, 2006). Localizada no núcleo, apresenta as funções moleculares de ligação de nucleotídeos, atividade de coativador de transcrição, atividade de quinase dependente de ciclina, ligação de ATP, atividade de transferase e ligante de receptor de andrógeno. E está envolvida nos processos biológicos de reparo de DNA, transcrição, iniciação da transcrição a partir do promotor da RNA polimerase II, fosforilação de aminoácidos, ciclo celular, proliferação celular, sinalização na via de receptores de andrógenos, regulação positiva da transcrição a partir do promotor da RNA polimerase II e divisão celular (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Esta proteína é a subunidade catalítica do complexo *CAK* que foi relacionado ao controle do ciclo celular devido à sua capacidade de fosforilar e ativar outras ciclinas regulatórias. De maneira específica, este complexo regula positivamente a *CDK1*, quinase responsável pela regulação da progressão na fase G2 e pela transição G2/M do ciclo celular em todas as células eucarióticas, por meio da fosforilação do resíduo Thr161 (NIGG, 1996).

O gene da quinase dependente de ciclina 7 (*CDK7*), de maneira geral, apresentou aumento de expressão em 41,6% (15/36) das amostras. Embora esse gene tenha apresentado níveis de expressão total inferiores aos observados para o *ZNF706*, pode-se inferir que exista também uma relação entre a expressão desse gene e o grau de evolução tumoral. Podemos observar na Figura 11 que, nos estágios iniciais I e II, o *CDK7* apresenta-se hipoexpresso, no estágio III a expressão positiva aproxima-se dos níveis de expressão do controle tornando-se positiva no estágio IV e superexpresso na metástase retroperitoneal.

KAYASELCUK e colaboradores (2006) demonstraram a relação entre a expressão de algumas ciclinas com a *CDK7* e sugerem que essa associação pode estar relacionada com a progressão de adenocarcinomas. Os autores ainda relataram que a *CDK7* representa um potencial marcador molecular para determinar a atividade proliferativa da hiperplasia e de adenocarcinoma de endométrio. O comportamento da expressão desse gene observado em nossas amostras indicam que a superexpressão da *CDK7* pode apresentar um efeito semelhante em CRcc, uma vez que, o aumento da expressão deste gene no estágio IV e principalmente na amostra metastática pode estar relacionado com a agressividade deste tipo tumoral e abre caminho para estudos futuros sobre a expressão desse gene com o processo de metastatização.



**Figura 11:** Média da expressão relativa do gene *CDK7* de acordo com o estadiamento TNM dos CRcc quantificada por PCR em Tempo Real.

No presente estudo o gene *CLDN1* apresentou diminuição de expressão em 75% (27/36) das amostras tumorais testadas.

O gene *CLDN1* codifica a proteína integral de membrana Claudina 1 que é componente das junções intercelulares responsáveis pela adesão célula – célula, formando uma barreira física para prevenir que solutos e água passem livremente através do espaço paracelular.

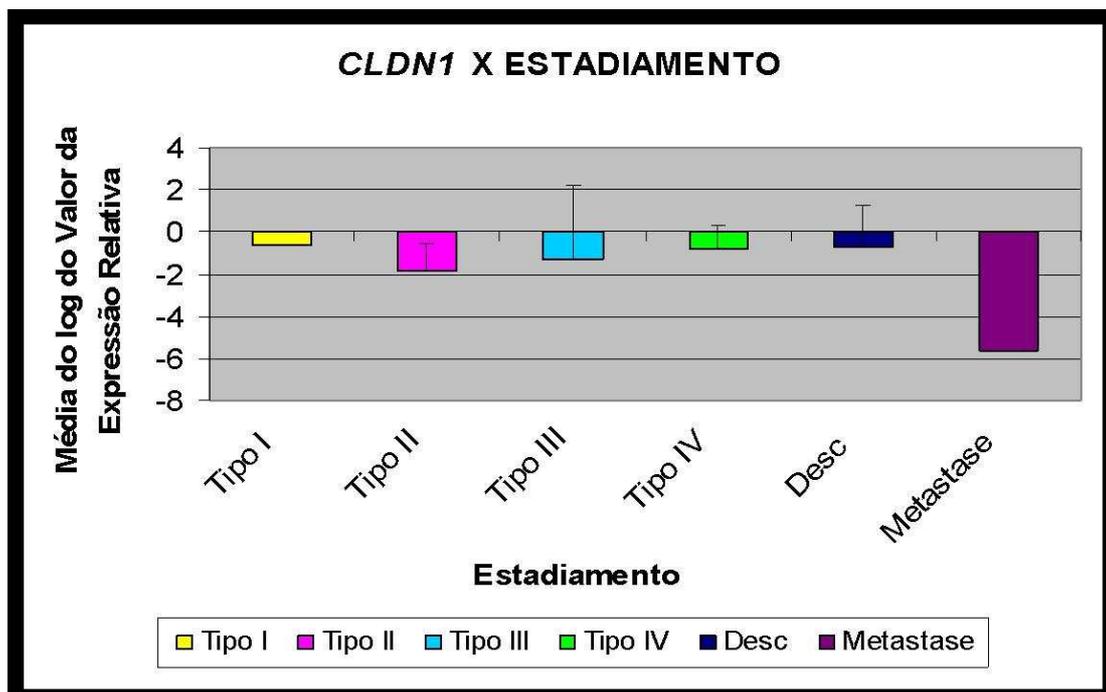
O tecido renal por possuir funções de permeabilidade especializadas apresenta uma intensa regulação da expressão das claudinas. As células endoteliais das veias renais expressam especificamente a *CLDN5*, a *CLDN1* nos dutos coletores distais e a *CLDN2* na maioria dos segmentos proximais. Poucos trabalhos têm se preocupado em analisar as funções e a expressão destas proteínas na evolução do carcinoma renal. Entretanto, pode-se notar que, de maneira interessante, a maioria dos carcinomas renais têm origem no epitélio tubular proximal, onde as junções são menos estáveis, o que é mediado por uma claudina (REYES et al., 2002; SWISSHELM et al., 2005).

Em relação ao câncer, vários trabalhos têm demonstrado que o padrão de expressão do *CLDN1* varia de acordo com o tipo de tumor, apresentando-se diminuído em câncer de mama, glioblastoma multiforme e melanoma. (KOMINSKY, 2006). Estes dados parecem confirmar a idéia geral de que, na tumorigênese, ocorre uma ruptura das junções adesivas processo esse que deve exercer papel importante na perda de coesão, capacidade de invasão e a falta de diferenciação observados nas células tumorais (MORIN, 2005).

Diversos trabalhos reportam a evidência de diminuição da formação de junções adesivas em tumores humanos, tais como, carcinoma hepatocelular, tumores de tireóide e carcinoma de cólon. (HOEVEL et al., 2004) Em amostras de tumor de mama, o gene *CLDN1* apresentou expressão diminuída em 12 vezes em relação ao tecido normal. TOKÉS et al (2005) Demonstraram que a diminuição da expressão deste gene está relacionada com a recorrência e o aumento do potencial maligno dos tumores de mama (TOKÉS et al., 2005; MOROHASHI et al., 2007). Da mesma forma, Miyamoto e colaboradores (2008), demonstraram que o decréscimo na expressão da claudina 1 está correlacionado com a

permeabilidade dos vasos linfáticos e desempenha um papel importante na recorrência de carcinomas esofágicos.

A ausência de expressão de claudinas e outras proteínas de junções adesivas no câncer pode ser interpretada como um evento da perda de adesão celular e um passo importante na progressão tumoral para metástases. Os resultados obtidos em nosso trabalho demonstram que a maior perda de expressão da claudina 1 foi observada nos estágios mais agressivos de progressão, tipos IV e metastático, do CRcc (Figura 12), confirmando o observado em outros tipos tumorais. Esse efeito também foi relatado recentemente por Lechpammer e colaboradores (2008) em tumores de células renais. Os autores concluem que as claudinas podem servir como marcadores de prognóstico e representam potenciais alvos terapêuticos para o tratamento de pacientes portadores de CRcc.



**Figura 12:** Média da expressão relativa do gene *CLDN1* de acordo com o estadiamento TNM dos CRcc quantificada por PCR em Tempo Real.

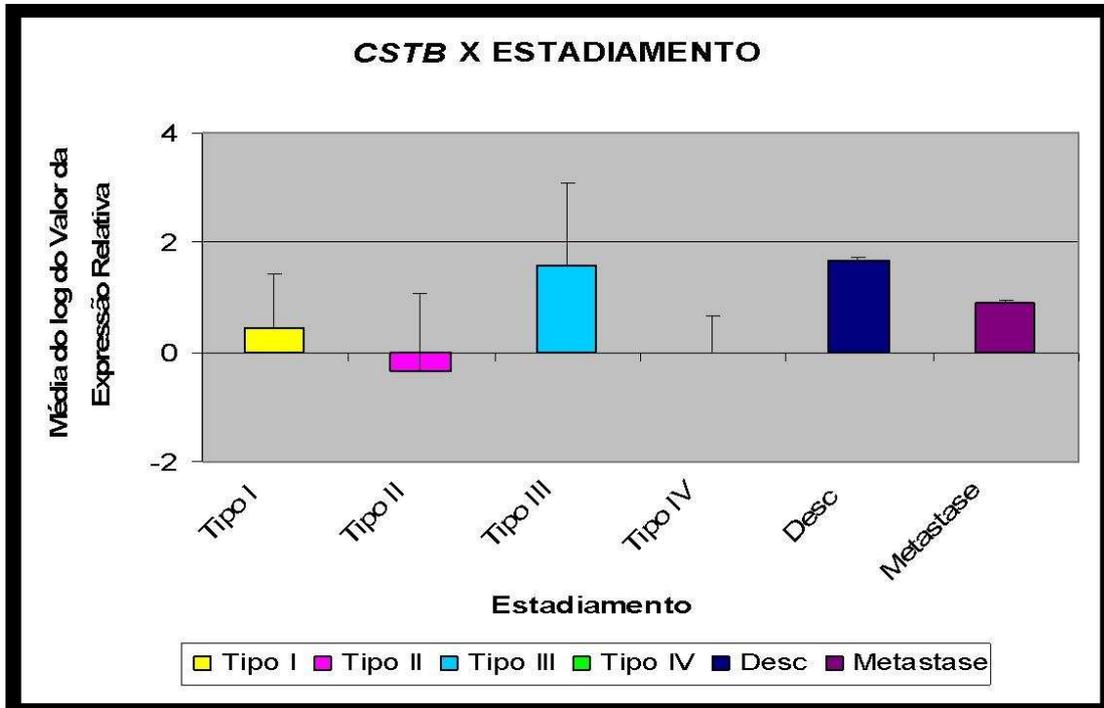
O gene Cistatina B (*CSTB*) pertence à superfamília das cistatinas que contém proteínas que possuem múltiplas seqüências *cystatin-like*. Existem três famílias inibitórias dentro desta superfamília, incluindo as cistatinas do tipo 1 (estefinas), as cistatinas de tipo 2 e os quinogênios. O gene *CSTB* codifica a proteína estefina que funciona como um inibidor intracelular de proteases tiol. Esta proteína é capaz de formar dímeros estabilizados por forças não-covalentes, inibindo a atividade das papaínas e catepsinas 1, h e b. Esta proteína parece exercer um papel importante na proteção contra as proteases liberadas por lisossomos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).

Uma vez que inibe a atividade das catepsinas responsáveis pela degradação de proteínas da matriz extracelular e participam da dissolução e remodelamento de tecido conjuntivo e membrana basal nos processos de crescimento tumoral, invasão e metástase, espera-se encontrar uma expressão diminuída do *CSTB* no tecido tumoral. Entretanto, estudos comparando o padrão de expressão da cistatina entre tecidos normal e tumoral têm demonstrado que esta relação, em alguns tipos tumorais, não é consistente com este princípio geral, pois apresentam a associação de altos níveis de inibidores de cisteíno-proteases com a progressão tumoral e um prognóstico ruim. A indução da expressão deste gene tem sido relatada em vários tumores humanos, como por exemplo, carcinoma coloretal, carcinoma gástrico e carcinoma hepatocelular. Por outro lado, nos tumores de mama, pulmão e cabeça e pescoço, altos níveis de estefinas A e B estão relacionados com um prognóstico favorável da doença. Dessa forma, os resultados relacionados à regulação das cisteíno-proteases pelos seus inibidores, assim como, sua relevância para o prognóstico da doença, tem se mostrado contraditório (KOS et al., 2000; LEE et al., 2008).

No presente trabalho, de maneira geral, o gene *CSTB* apresentou o dobro da expressão total observada para os tecidos normais, demonstrando indução em 69,4% (25/36) das amostras tumorais.

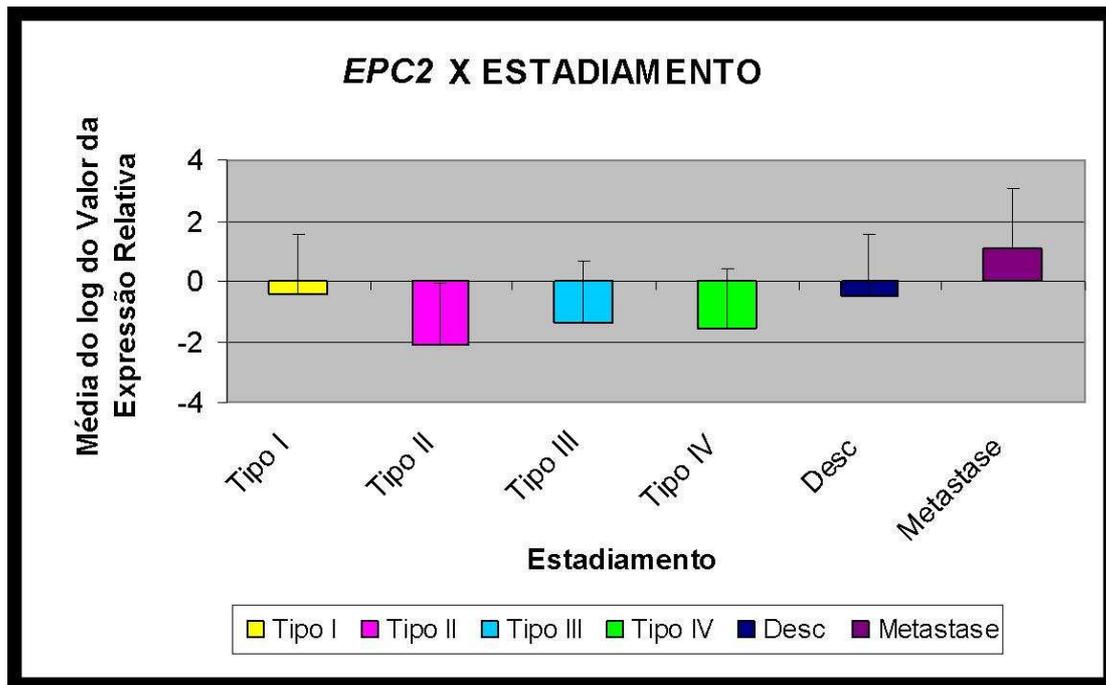
Recentemente, Lee e colaboradores (2008) relataram que pacientes portadores de carcinoma hepatocelular apresentam uma superexpressão de *CSTB* no soro e sugerem que este gene possa ser um importante marcador para o diagnóstico desses pacientes. Assim, embora os resultados a respeito da expressão do *CSTB* em tumores humanos sejam

contraditórios, os nossos resultados mostram que este gene também está induzido no CRcc (Figura 13).



**Figura 13:** Média da expressão relativa do gene *CSTB* de acordo com o estadiamento TNM dos CRcc quantificada por PCR em Tempo Real.

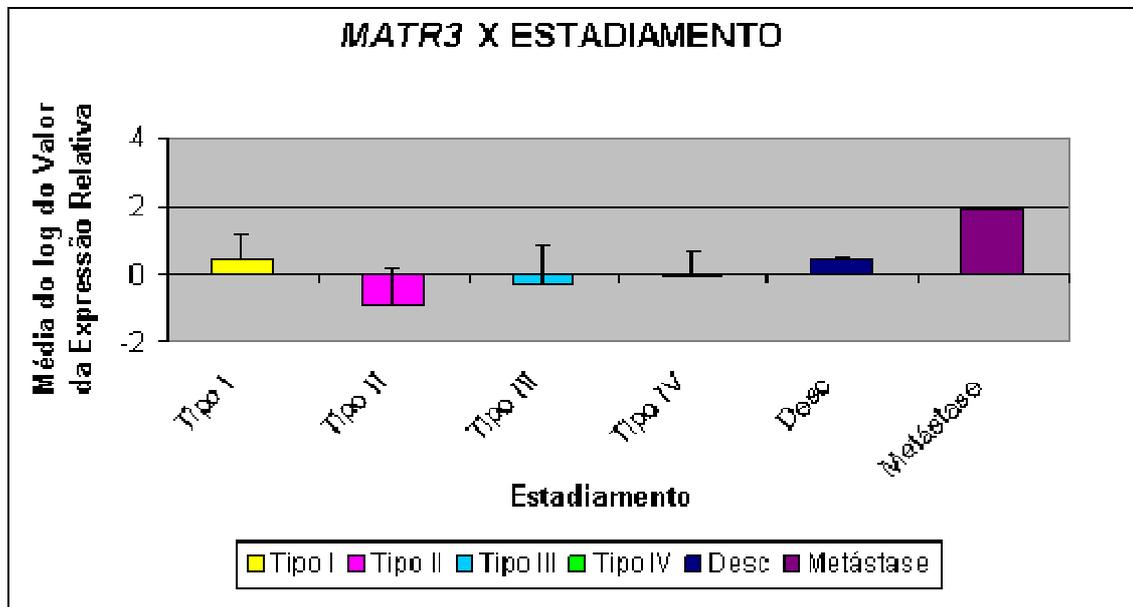
O gene *EPC2* apresentou diminuição da expressão em 83,3% (30/36) das amostras analisadas neste estudo (Figura 14). Baseado no grau de estadiamento das amostras testadas, este gene apresentou diminuição de expressão independente do estágio, somente apresentando aumento de expressão na amostra metastática. Embora as informações literárias a respeito deste gene sejam relativamente escassas as análises realizadas no presente trabalho indicam que o *EPC2* associado ao gene *RUVBL1* influenciam a expressão dos genes *HNF4 $\alpha$*  e *c-MYC* que por sua vez estão estritamente relacionados com o processo tumorigênico. A regulação negativa do gene *EPC2* observada nas amostras avaliadas no nosso trabalho sugere que essa molécula pode apresentar funções cruciais na regulação de importantes vias metabólicas no CRcc, merecendo ser melhor exploradas.



**Figura 14:** Média da expressão relativa do gene *EPC2* de acordo com o estadiamento TNM dos CRcc quantificada por PCR em Tempo Real.

O gene *MATR3* codifica uma proteína de matriz nuclear altamente conservada que possui uma região N-terminal carregada positivamente e um domínio C-terminal carregado negativamente. Esta proteína parece desempenhar papel na transcrição ou interagir com outras proteínas nucleares para formar uma rede fibrogranular interna (VALENCIA et al, 2007). Apesar de não existirem dados na literatura que associem esta proteína a processos neoplásicos, no presente estudo este gene apresentou expressão aumentada em 58,3% (21/36) das amostras tumorais analisadas. De acordo com o estadiamento das amostras, o *MATR3* apresentou aumento de expressão em relação à amostra normal apenas no estágio I da evolução tumoral e na amostra metastática, enquanto que nos estágios II, III e IV houve uma diminuição na expressão (Figura15). A análise estatística dos dados gerados demonstrou uma diferença significativa ( $p=0,0036$ ) entre os estágios I e II da evolução tumoral. Com base nesses resultados pode-se inferir que este gene pode ser

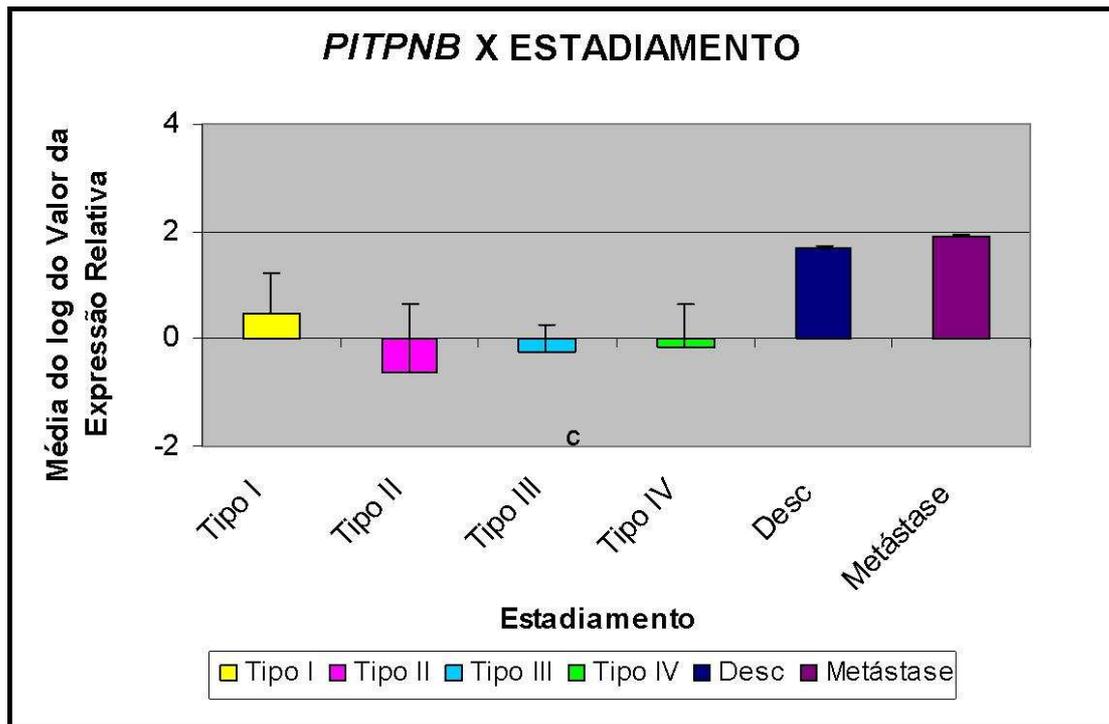
considerado como um potencial marcador de diagnóstico ou de presença de metástase para o Carcinoma Renal de Células Claras.



**Figura 15:** Média da expressão relativa do gene *MATR3* de acordo com o estadiamento TNM dos CRcc quantificada por PCR em Tempo Real.

A proteína codificada pelo gene *PITPNB* localiza-se no citoplasma onde catalisa a transferência de fosfatidilinositol e fosfatidilcolina entre as membranas. Essa proteína apresenta as funções moleculares de ligação de lipídios e de transporte de fosfatidilinositol, e está presente nos processos biológicos de desenvolvimento embrionário, processo metabólico de lipídios, transporte, transdução de sinal e tráfego entre membranas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>; LARIJANI et al, 2003).

No presente estudo, o *PITPNB* apresentou aumento de expressão em 50% (18/36) das amostras tumorais analisadas, sendo que este aumento se deu principalmente nos pacientes cujos tumores encontravam-se no estágio I da evolução tumoral e na amostra metastática (Figura 16), assim, da mesma forma que o gene *MATR3*, pode-se inferir que este gene pode, igualmente, ser um candidato potencial a marcador de diagnóstico ou de presença de metástase para este tipo tumoral.



**Figura 16:** Média da expressão relativa do gene *PITPNB* de acordo com o estadiamento TNM dos CRcc quantificada por PCR em Tempo Real.

As análises das funções e vias metabólicas dos genes selecionados neste estudo demonstraram que a maioria destes está relacionada com o gene *c-MYC*, dessa forma a expressão deste gene também foi avaliada nas amostras de CRcc com o intuito de esclarecer o papel deste gene sob a regulação dos alvos selecionados.

O gene *c-MYC* codifica uma fosfoproteína nuclear multifuncional, que desempenha importantes funções em diversos processos celulares como na progressão do ciclo celular, apoptose e transformação celular. Ele atua como um fator que regula a transcrição de genes específicos. Alterações neste gene como mutações, superexpressão, rearranjos e translocações, têm sido associadas a uma variedade de tumores hematopoiéticos, leucemias e linfomas, incluindo o Linfoma de Burkitt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Nas células normais as proteínas parecem integrar os sinais do ambiente com o objetivo de modular a expressão diversos grupos de

processos celulares, incluindo proliferação, crescimento, apoptose, energia, metabolismo e diferenciação (EILERS; EISENMAN, 2008).

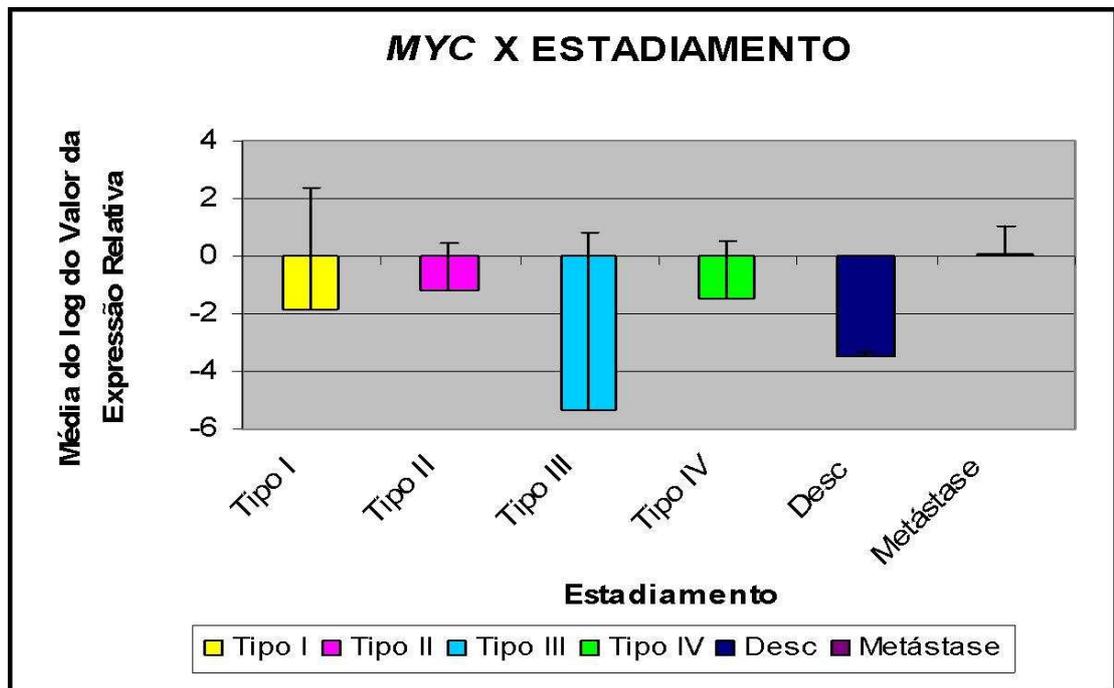
Em células normais em divisão a expressão do *c-MYC* é mantida sob um nível intermediário relativamente constante durante o ciclo celular, enquanto que a forma oncogênica é constitutivamente expressa em níveis moderados a muito altos, e não responde a sinais externos. O fato de o gene *c-MYC* apresentar altos níveis de expressão em uma grande variedade de tumores humanos e, frequentemente estar associado com um prognóstico ruim, pode indicar que a análise da desregulação da expressão deste gene em certos tipos de tumores pode ser utilizada como um marcador de diagnóstico (PELENGARIS, et al, 2002).

De acordo com a literatura em geral, o gene *c-MYC* apresenta expressão aumentada em vários tipos de tumor, entretanto no nosso estudo, este gene apresentou diminuição de expressão em 69,4% (25/36) das amostras analisadas (Figura17).

Na maioria dos CRcc ocorre a mutação ou o silenciamento do gene *VHL* que codifica uma proteína que regula os ativadores transcricionais do *HIF*, que media a adaptação celular a falta de oxigênio por meio da ativação da transcrição de genes-alvos envolvidos no metabolismo, angiogênese e remodelamento da matriz extracelular. A atividade constitutiva deste gene é claramente associada a tumorigênese do CRcc, uma vez que se encontra ativado na ausência de expressão do gene *VHL*. O gene *HIF* apresenta-se sob duas formas, sendo que o *HIF1 $\alpha$*  inibe a oncoproteína *c-MYC* por meio de inibição pós-traducional, opondo-se a progressão no ciclo celular, enquanto que o gene *HIF2 $\alpha$*  potencializa a atividade transcricional e de proliferação celular desenvolvidas pelo *c-MYC* (GORDAN et al, 2008)

Uma vez que o gene *c-MYC* desempenha papel durante a proliferação celular, ele pode levar ao início da tumorigênese quando seu padrão de expressão se encontra alterado. Entretanto, tem-se postulado que a habilidade deste gene de induzir morte celular pode ser um mecanismo de prevenção do desenvolvimento de neoplasias quando a célula encontra-se em ambiente inóspito a sua sobrevivência, como, por exemplo, em condições de deficiência de fatores de crescimento ou oxigênio (CORN et al, 2005).

A diminuição da expressão do *c-MYC* encontrada nas amostras de CRcc utilizadas neste trabalho pode ser interpretada como uma consequência da perda da expressão do gene *VHL* nestes pacientes o que leva ao aumento de atividade do gene *HIF1 $\alpha$*  que por sua vez inibe a atividade transcricional do *c-MYC* por meio de dois mecanismos, a ativação do gene *MXI1*, um antagonista do *c-MYC* e o aumento da degradação via ubiquitina-proteassoma (SUTPHIN et al., 2007). Zhang e colaboradores (2007) utilizando linhagens celulares de Carcinoma Renal de Células Claras demonstraram que o gene *HIF1 $\alpha$*  reprime predominantemente a atividade do *c-MYC* que apresenta aumento de expressão em outros tipos de câncer. Os autores sugerem que, essa reprogramação metabólica pode ser um passo crítico durante a carcinogênese do CRcc. Os nossos resultados confirmam essa hipótese de regulação e demonstram que esta também ocorre em amostras teciduais tumorais de pacientes.

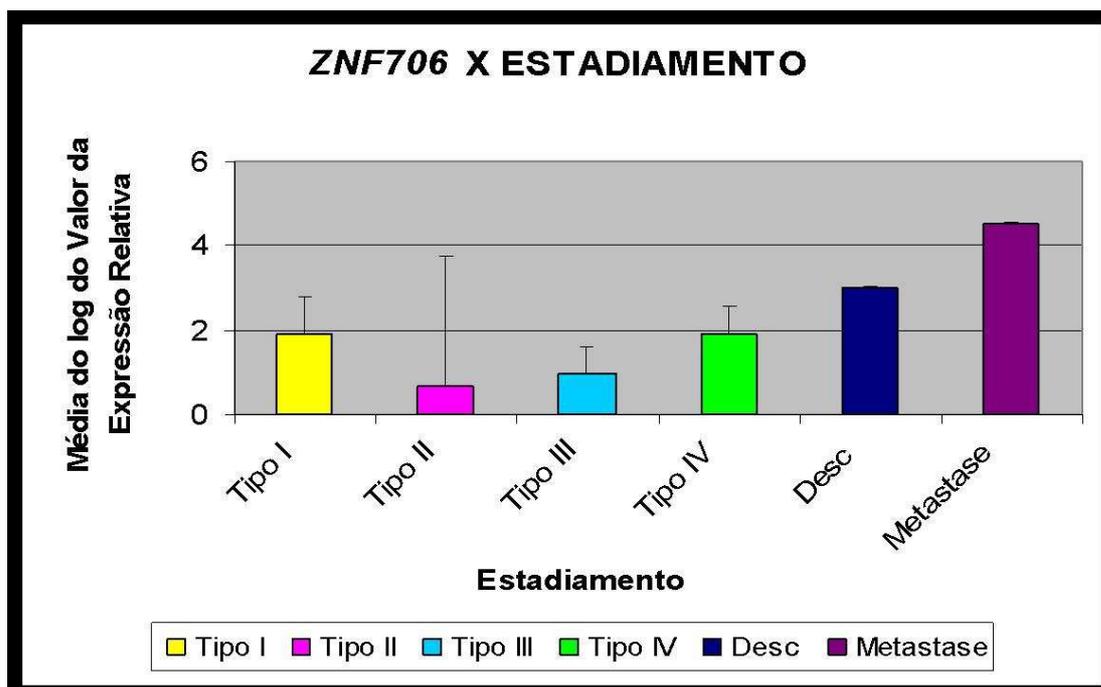


**Figura 17:** Média da expressão relativa do gene *C-MYC* de acordo com o estadiamento TNM dos CRcc quantificada por PCR em Tempo Real.

A proteína codificada pelo gene *ZNF706* é uma proteína *zinc finger* clássica do tipo C2H2. Essas proteínas são comumente associadas a fatores de transcrição de eucariotos. Os fatores de transcrição geralmente possuem várias *ZNFs* capazes de fazer múltiplos contatos ao longo da cadeia de DNA. As proteínas *C2H2 ZNFs* podem, também, reconhecer e ligar-se a RNAs, outras proteínas e substratos lipídicos. Por essa característica, essas proteínas desempenham importantes funções celulares como; transcrição, tradução, transporte de mRNA, organização do citoesqueleto, desenvolvimento do epitélio, adesão celular, enovelamento de proteínas e remodelamento da cromatina. Atualmente, dados estruturais e funcionais mais detalhados relatam muitas interações *ZNF*-proteínas, demonstrando que esta classe protéica atua como sítios de reconhecimento de proteínas sendo a segunda maior classe de domínios ligantes de ubiquitina (GAMSJAEGER et al., 2006; HURLEY et al., 2006).

Os resultados obtidos em nosso estudo demonstram que o gene *ZNF706* apresentou aumento de expressão em 97,2% (35/36) de todas as amostras analisadas independente do grau de progressão tumoral. Correlacionando os dados histopatológicos, isto é, o estadiamento e o grau de evolução tumoral, observou-se um aumento crescente nos níveis de expressão do *ZNF706* de acordo com o estágio de desenvolvimento do tumor (Figura 18). Esses dados sugerem que este gene pode desempenhar importante função durante a evolução dos CRcc, representando um sério candidato a marcador de progressão tumoral, principalmente pelo fato da proteína codificada por este gene estar envolvida em processos celulares que atuam na manutenção do fenótipo neoplásico.

O estudo da família das *ZNFs* tem despertado muito o interesse científico e vários estudos estruturais dessas proteínas têm sido conduzidos no sentido de se determinar os sítios ativos da molécula, uma vez que, devido às suas funções podem agir como fatores de transcrição sintéticos atuando sobre a regulação funcional de qualquer gene em qualquer tipo celular (Zinc Finger Consortium). Essa promissora estratégia associada aos dados de expressão do *ZNF706* encontrados no presente estudo que indicam que este gene encontra-se superexpresso em pacientes com CRcc, nos motivaram a iniciar experimentos de clonagem e expressão dessa proteína.



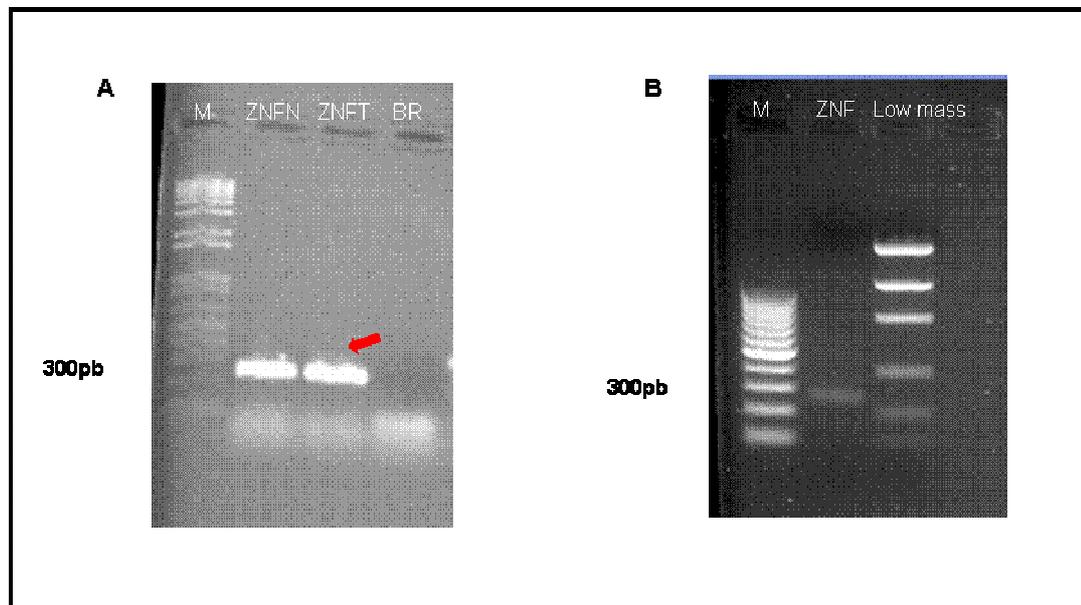
**Figura 18:** Média da expressão relativa do gene *ZNF706* de acordo com o estadiamento TNM dos CRcc quantificada por PCR em Tempo Real.

Fundamentado nesses dados, realizamos estudos em nível protéico com a clonagem e expressão da proteína *ZNF706* com o intuito de avaliar estruturalmente a proteína codificada por este gene.

#### 4.6 Clonagem e Indução da proteína *ZNF706*

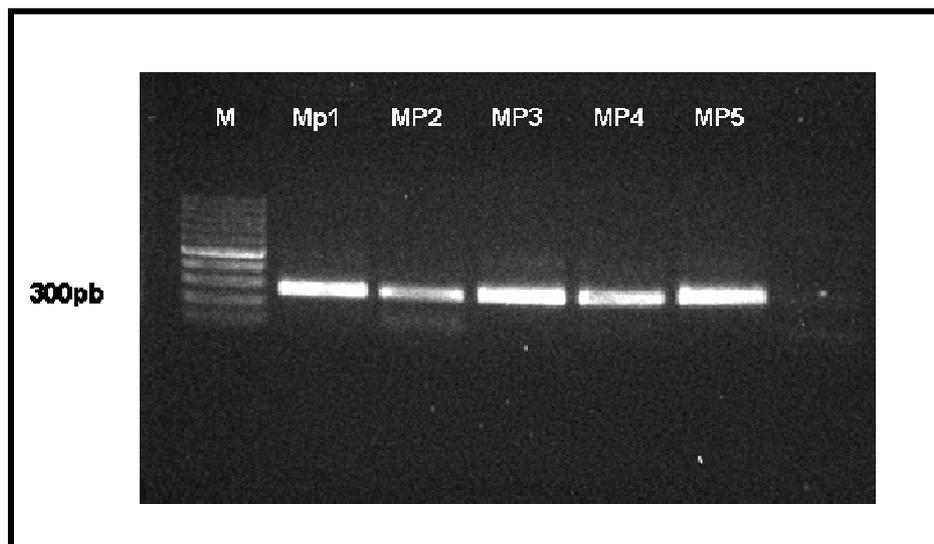
Os produtos da amplificação com os adaptadores desenhados foram checados em gel de agarose e apresentaram uma banda específica de aproximadamente 300pb correspondente ao tamanho esperado do gene *ZNF706* (231pb) mais 31pb do adaptador (Figura 19A). Após a confirmação da amplificação, as reações foram repetidas em duas reações de 50µL para a obtenção de maiores concentrações do produto que foram então fracionadas eletroforéticamente em gel de agarose corado com cristal violeta. O fragmento foi então isolado, purificado com a utilização do kit Quiaquick PCR purification kit (Quiagen)

e observado em gel de agarose com migração simultânea de marcador de massa molecular para a estimativa da concentração (Figura 19B).



**Figura19:** **A** – foto do gel de agarose da reação de amplificação do gene *ZNF706* em amostras normais (ZNFN) e de CRcc (ZNFT). **B** - Foto de gel de agarose do produto de PCR após a excisão e purificação da banda correspondente ao gene *ZNF706*.

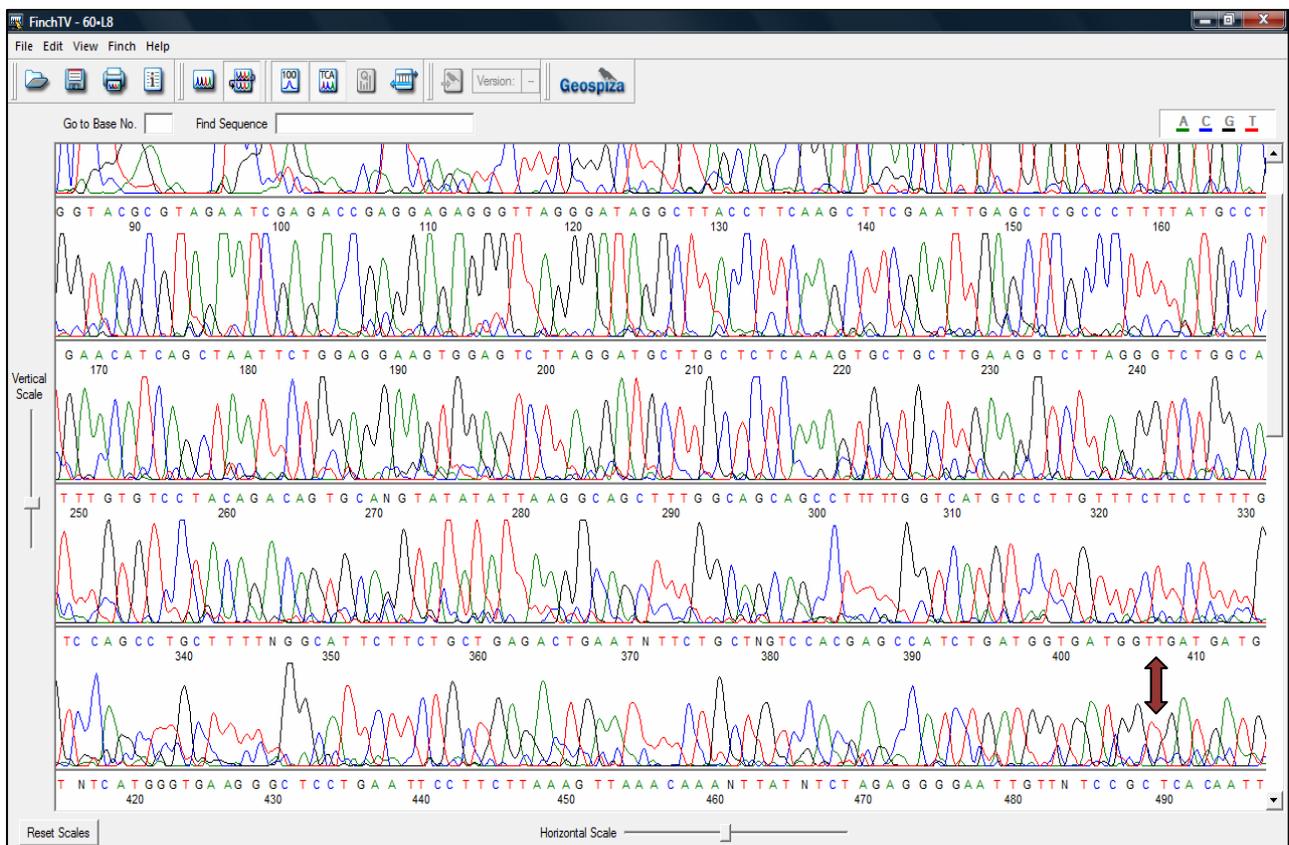
Após a ligação dos fragmentos purificados ao vetor de expressão PeT101D e transformação bacteriana, dez colônias transformantes foram selecionadas e após crescimento *overnight* a 37°C em meio líquido com antibiótico foram submetidas à extração plasmidial com o kit PureLink kit plasmid mini prep (Invitrogen). A eficiência da clonagem foi avaliada por PCR direto do vetor utilizando os oligonucleotídeos para o gene *ZNF706* com a mesma ciclagem utilizada na amplificação do gene. Cinco clones apresentaram o inserto clonado (Figura 20) e foram submetidos ao seqüenciamento automático para a confirmação da clonagem e para a verificação da direção do inserto.



**Figura 20:** Foto do gel de agarose apresentando a amplificação do gene *ZNF706* clonado no vetor de expressão pET101D nas 5 preparações plasmidiais (MP1-MP5)

Os clones MP2 e MP4 não apresentaram similaridade quando comparadas a seqüência do gene *ZNF706* depositada no geneBank e o clone MP5 apresentou uma pequena região de homologia. Entretanto, o clone MP1 apresentou similaridade de 96% com a seqüência do gene (Figura 21) sendo que a análise do cromatograma do seqüenciamento revelou a presença de um artefato na base 407, uma duplicação de uma base T (Figura 22). Com a exclusão desse artefato obtivemos a seqüência completa do gene e a orientação correta de leitura. Da mesma forma, após a retirada de um artefato e desconsiderando a presença de seis espaços, o alinhamento da seqüência do clone MP3, também apresentou o gene completo clonado e orientado.



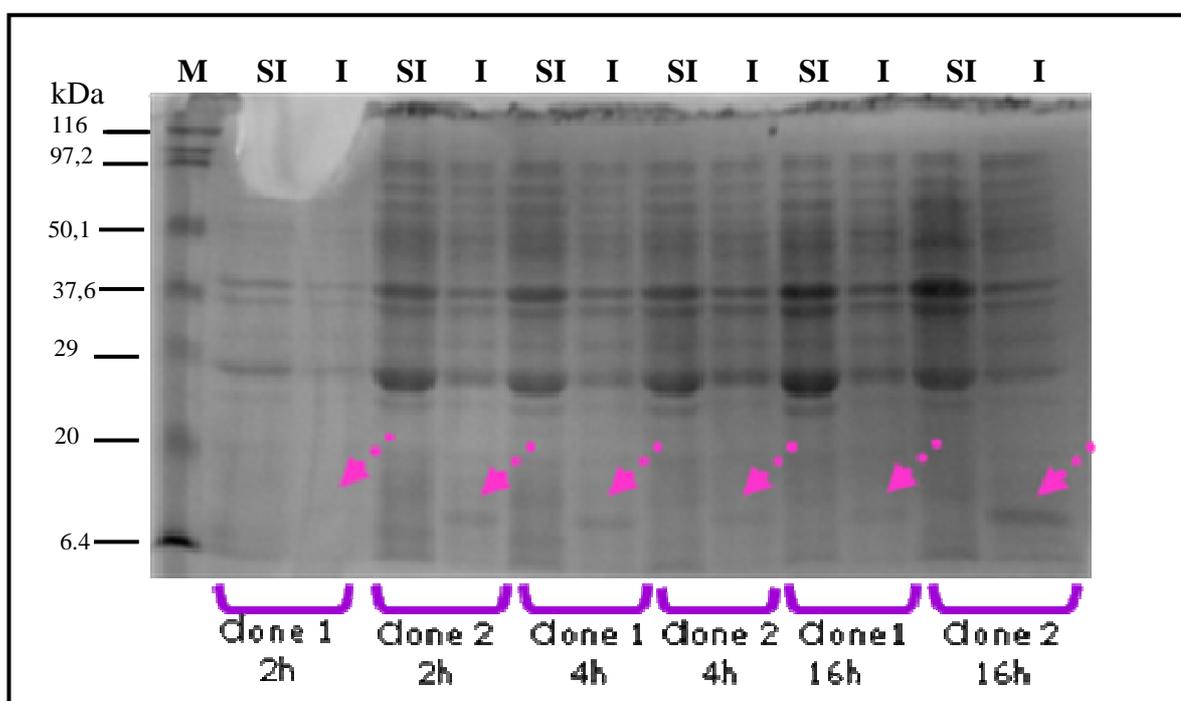


**Figura 22** – Cromatograma do sequenciamento do clone MP1 evidenciando um artefato de técnica, uma duplicação de uma base T na posição 407.

Com os vetores de expressão contendo os insertos desejados, foi iniciada a padronização dos processos de expressão e purificação protéica. Para isso, foram utilizados os dois clones (MP1 e MP2) que apresentaram o inserto na posição de leitura correta para transformação em células competentes BL21 e posterior teste de indução com IPTG.

A Figura 23 apresenta os resultados da indução da proteína ZNF em SDS-PAGE. Pode se observar uma evidente expressão de uma proteína de aproximadamente 10 KDa em todos os tempos de indução com IPTG (I) para os dois clones testados, quando comparados com o extrato total das culturas não induzidas (SI). De acordo com os dados depositados no banco UniProtKB (<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=ZNF706>) do

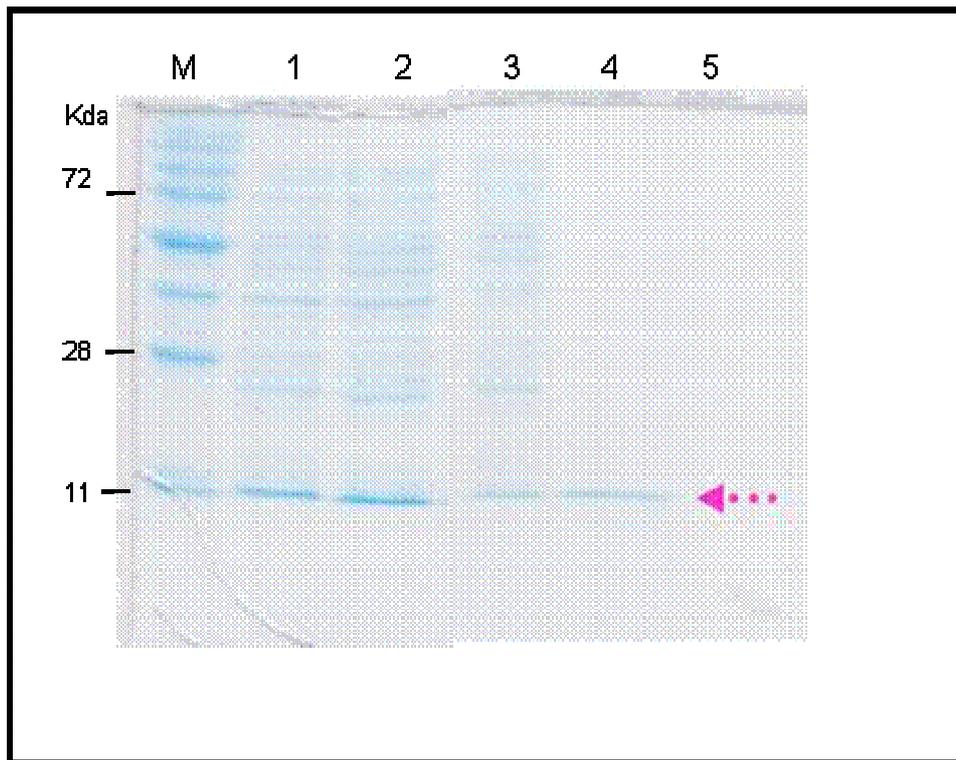
Expasy proteomics tools (<http://ca.expasy.org/tools/#proteome>) a proteína ZNF706 apresenta 76 aminoácidos e 8,49 KDa. Considerando que a proteína heteróloga sintetizada apresenta a cauda de seis histidinas e mais um códon de iniciação utilizados no desenho dos iniciadores, a banda correspondente a proteína a ser codificada, segundo os cálculos do *Science gateway protein molecular weight calculator* ([www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.html](http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.html)) seria de 9,71 KDa; exatamente a observada em nossos experimentos.



**Figura 23** – Teste de indução da expressão da proteína ZNF706 (Setas rosa) nos tempos de 2, 4 e 16 horas após a indução das culturas bacterianas transformadas com os clones MP1 e MP2 com 0,5mM de IPTG. **M** – Marcador de proteínas Prestained SDS-PAGE Broad Range – BioRad; **SI** – sem induzir; **I** – induzido.

Uma vez confirmada a expressão da proteína ZNF706 heteróloga foram conduzidos os experimentos de indução em larga escala da proteína e posterior purificação. Como apresentado na Figura 24 a purificação magnética foi satisfatória apresentando um bom

grau de pureza (canaleta 5) da proteína ZNF706. A proteína purificada foi quantificada por espectrometria e apresentou uma concentração de 0,7 mg/mL, quantidade suficiente para os estudos estruturais futuros bem como para a avaliação da expressão da proteína em outras amostras de tecido em parafina.



**Figura 24** – Avaliação da eficiência da purificação da proteína ZNF706 em SDS-PAGE (Seta rosa). **M** - Marcador PageRuler Plus prestained Protein ladder, **1**: Extrato protéico total sem lise; **1** - Extrato protéico total sem lise; **2** – Pellet lisado; **3** – Primeiro lavado da purificação com *beads* magnéticos; **4** – Proteína purificada com *beads* magnéticos.

#### 4.7 Análise das vias metabólicas dos genes validados

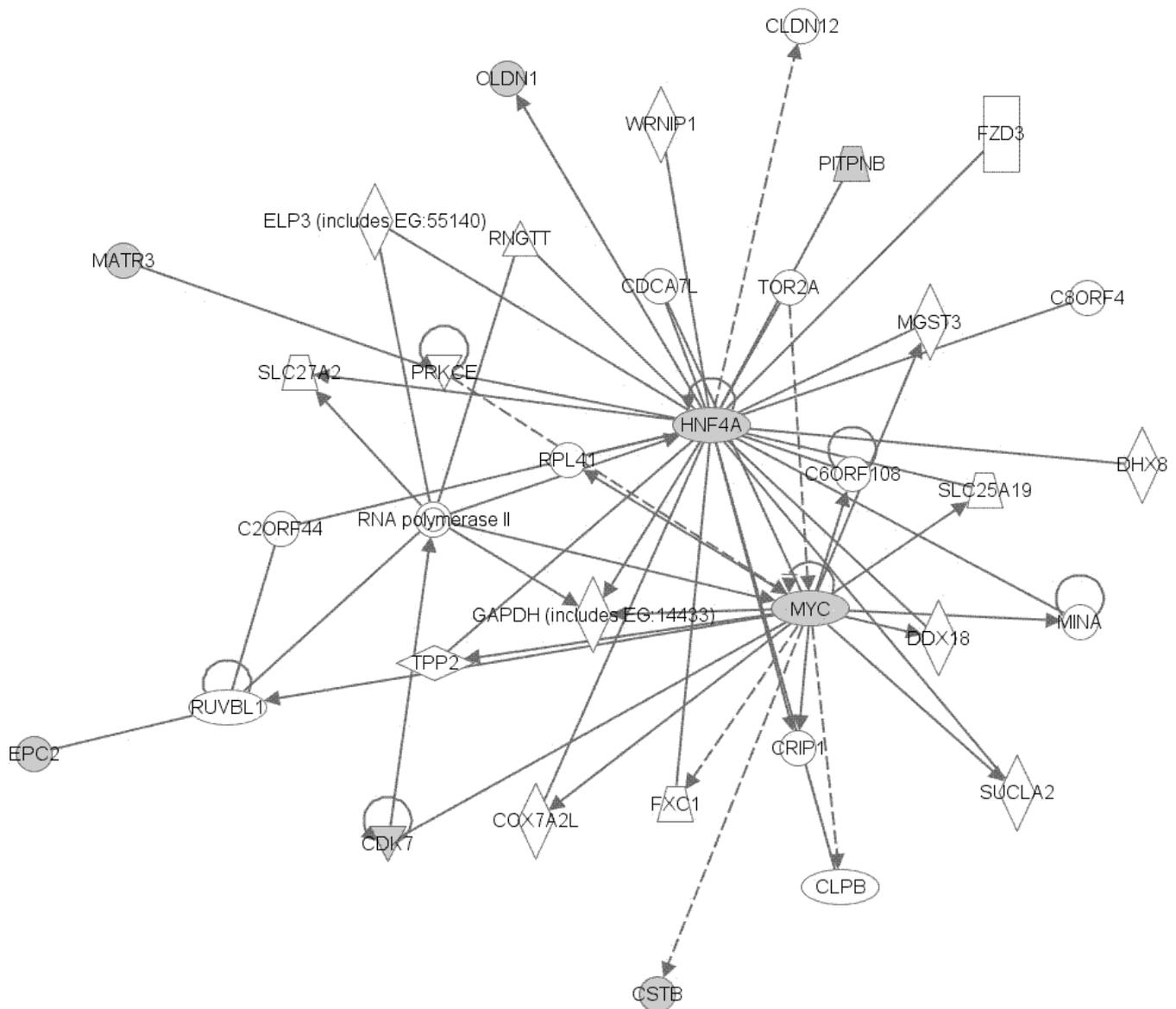
As análises das vias metabólicas e das interações entre os genes selecionados realizadas pelo software *Ingenuity pathways analyses* (IPA), revelaram que os genes *CDK7*, *CLDN1*, *CSTB*, *EPC2*, *MATR3*, *c-MYC* e *PITPNB*, avaliados no presente estudo, participam

da mesma via metabólica apresentando importantes funções celulares como controle da expressão gênica, desenvolvimento de tecidos conectivos, desenvolvimento, câncer e ciclo celular (Figura 25).

Esses genes apresentam interações entre si e possivelmente participam da mesma cascata de sinalização mediada por outros genes de extrema relevância para diferentes tipos de tumores. Os genes *CLDN1* e *PITPNB* estão associados e regulados pelo fator de transcrição nuclear *HNF4α* que participa dos processos de proliferação, diferenciação e a regulação da transcrição do promotor da RNA polimerase II. Os genes *CDK7* e *CSTB* relacionam-se com o gene multifuncional *c-MYC*, que participa de importantes processos celulares, como apoptose, proliferação celular, progressão no ciclo celular e diferenciação. A desregulação da expressão do gene *c-MYC* está estritamente envolvida com o desenvolvimento e a progressão de diversas neoplasias, desempenhando um papel fundamental na tumorigênese. O gene Matrin 3 (*MATR3*) também participa dessa mesma via de interação sendo mediado pelos genes *NFKB1* e *PRKCE*. Esses resultados tornam-se extremamente relevantes ao observarmos que os genes *HNF4α* e *c-MYC* também encontram-se conectados e possivelmente modulados pela expressão de 5 genes selecionados no presente estudo. As análises realizadas incluindo os genes, *VHL*, *GPC3* e *MXI1*, que também são alvos de nossos estudos, demonstraram que 22 moléculas presentes nessa via estão associadas com processos tumorigênicos e seis delas envolvidas em desordens renais como hiperplasia, inflamação e degeneração renal (Figura 26). Outro fato interessante revelado nessa via é a presença de duas moléculas da família Zinc Finger (*ZNF197* e *ZNF71*) que interagem diretamente com os genes *VHL* e *HNF4α* e apresentam possivelmente relações sobre a modulação da expressão do gene *c-MYC*. Os resultados obtidos sobre a expressão do gene *ZNF706* apresentados no presente estudo sugerem que essa molécula também pode estar influenciando a expressão de genes presentes nessa via, contribuindo dessa forma para o estabelecimento e manutenção dos CRcc que merecem ser avaliados. Além disso, uma avaliação mais profunda sobre as relações entre esses genes pode revelar novos alvos terapêuticos para bloquear ou interferir nessa via metabólica.

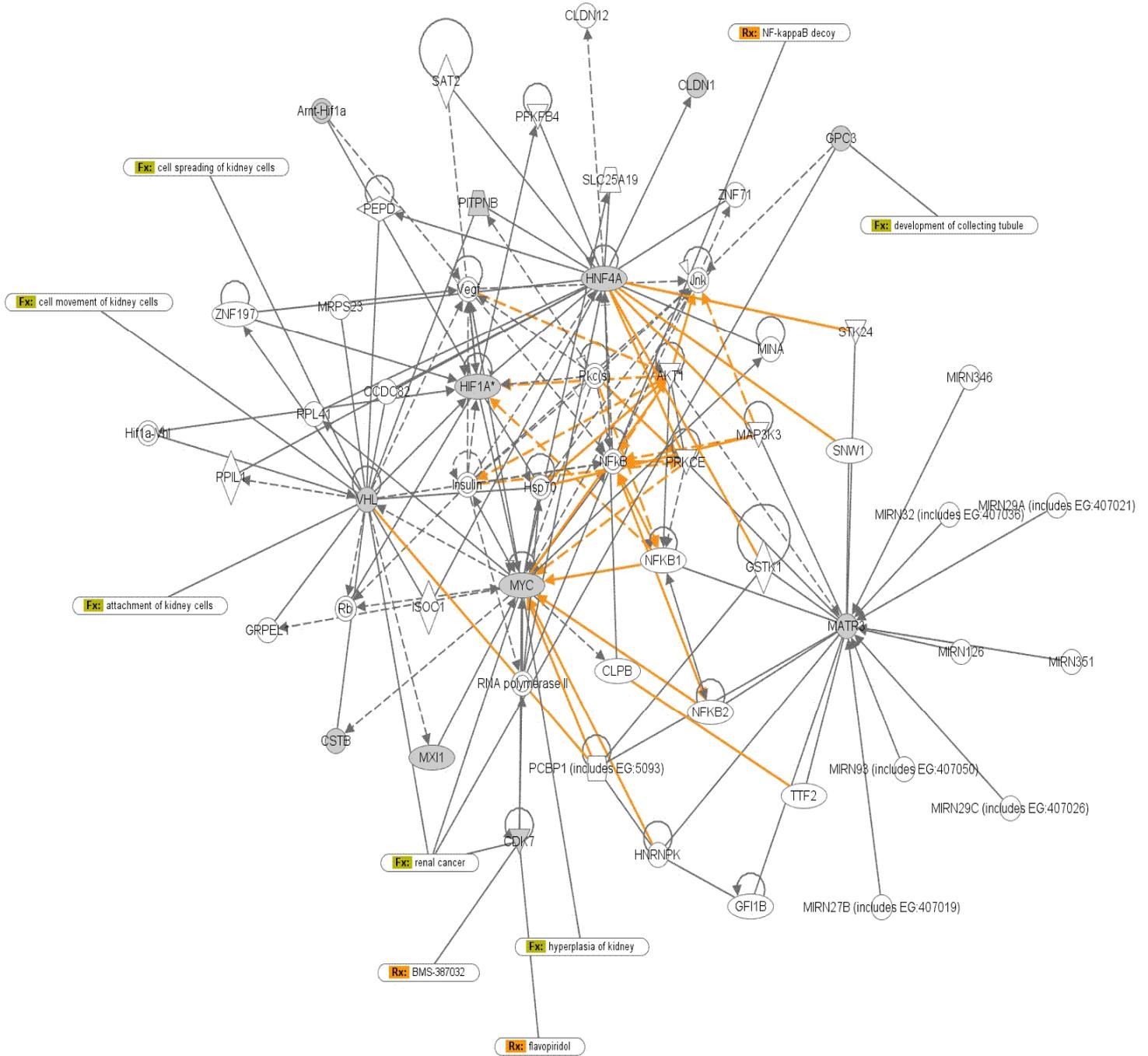
Dessa forma os dados obtidos até o momento sugerem que os padrões de expressão dos genes selecionados neste estudo podem contribuir de forma decisiva para o estabelecimento e progressão dos CRcc.

Network 1 : RenalLI - 2009-01-30 08:32 AM : RenalLI.xls : RenalLI - 2009-01-30 08:32 AM



© 2000-2009 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

**Figura 25:** Resultado da avaliação das vias metabólicas e das interações entre os genes selecionados realizadas pelo software *Ingenuity pathways analyses*.



**Figura 26** - Resultado da avaliação das vias metabólicas e das interações entre os genes selecionados e sua relação com processos patológicos renais realizadas pelo software *Ingenuity pathways analyses*.

## 5- CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que:

- A elaboração de bibliotecas subtrativas e a análise *in silico* de bibliotecas de SAGE são estratégias eficazes para a seleção de genes candidatos a marcadores moleculares e, associadas à validação experimental por PCR em Tempo Real são capazes de revelar diferenças nos padrões de expressão gênica entre tecidos tumorais e normais;
- Os genes *ZNF706*, *CSTB* e *CDK7* de maneira geral, apresentam-se superexpressos no carcinoma renal de células claras, sendo que, o *ZNF706* apresentou um aumento de expressão de acordo com o grau de evolução do desenvolvimento tumoral. O gene *CDK7* pode ser considerado um bom candidato a marcador de progressão tumoral para o CRcc;
- Os genes *CLDN1*, *EPC2* e *c-MYC* estão regulados negativamente em CRcc e essa hipoeexpressão está diretamente relacionada com o potencial de agressividade do tumor;
- Os genes *CDK7*, *CLDN1*, *CSTB*, *EPC2*, *PITPNB* e *MATR3* estão envolvidos na mesma cascata metabólica mediada principalmente pelos genes *HNF4 $\alpha$*  e *c-MYC*, demonstrando que estudos posteriores são necessários para caracterizar melhor esta via e relacioná-la à tumorigênese do Carcinoma renal de Células Claras.

## 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLORY, Y. et al. The L1 adhesion molecule is induced in renal cancer cells and correlates with metastasis in clear cell carcinomas. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 1190-1197, 2005.

BABELOMICS. Functional Analysis of Genome-Scale Experiments. Disponível em: <<http://babelomics.bioinfo.cipf.es>>. Acesso em abril 2008.

BODMER, D. et al. Understanding familial and non-familial renal cell cancer. **Human Molecular Genetics**, v. 11(20), p. 2489-2498, 2002.

BOURKERCHE, H. et al. Identification and cloning of genes displaying elevated expression as a consequence of metastatic progression in human melanoma cells by rapid subtraction hybridization. **Gene**, v. 343(1), p. 191-201, 2004.

CHEN, Y. T. et al. Messenger RNA expression ratios among four genes predict subtypes of renal cell carcinoma and distinguish oncocytoma from carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 11(18), p. 6558-6566, 2005.

CORGNA, E. et al. Renal cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 64(3), p. 247-262, 2007.

CORN, P. G. et al. Mxi1 is induced by hypoxia in a HIF-1-dependent manner and protects cells from c-MYC induced apoptosis. **Cancer Biology and Therapy**, v. 4(11), p. 1285-1294, 2005.

DE WEVER, O. et al. Soluble cadherins as cancer biomarkers. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 24, p. 685-697, 2007.

DIATCHENKO, L. et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceeding of the National Academy of Science of the USA**, v. 93(12), p. 6025-6030, 1996.

DRUCKER, B. J. Renal cell carcinoma: Current status and future prospects. **Cancer Treatment Reviews**, v. 31, p. 536-545, 2005.

EILERS, M.; EISENMAN, R. N. MYC's broad reach. **Genes and Development**, v. 22, p. 2755-2766, 2008.

EL-RIFAI, W. et al. Gastric cancers overexpress S100A calcium-binding proteins. **Cancer Research**, v. 62, p. 6823-6826, 2002.

ELSAMMAN, E. M. et al. The expression of prostate stem cell antigen in human clear cell renal cell carcinoma: a quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. **BJU International**, v. 98(3), p. 668-673, 2006.

FISHER, R. P. Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. **Journal of Cell Science**, v. 118, p. 5171-5180, 2006.

FUJII, S.; AMREIN, H. Genes expressed in the Drosophila head reveal a role for fat cells in sex-specific physiology. **EMBO Journal**, v. 21, p. 5353-5363, 2002.

GAMSJAEGER, R. et al. Sticky fingers: zinc-fingers as protein –recognition motifs. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v.32(2), p.63-70, 2006.

GARNERO, P.; VOORZANGER-ROUSSELOT, N. Biochemical markers in oncology. Part I: Molecular basis. Part II: Clinical uses. **Cancer Treatment Reviews**, v. 33, p. 230-283, 2007.

GNARRA, J.R. et al. Mutations of the VHL tumor suppressor gene in renal carcinoma. **Nature Genetics**, v. 7, p. 85-90, 1994.

GORDAN, J. D. et al. HIF- $\alpha$  effects on c-MYC distinguish two subtypes of sporadic VHL-deficient clear cell renal carcinoma. **Cancer Cell**, v. 14, p. 435-446, 2008.

HEDRICK, S. M. et al. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. **Nature**, v. 308(5955), p. 149-153, 1984.

HERMAN, J. G. et al. Silencing of the VHL tumor suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. **Proceeding of the Nacional Academy of Science of the USA**, v. 91, p. 9700-9704, 1994.

HIROTA, E. et al. Genome-wide gene expression profiles of clear cell renal cell carcinoma: identification of molecular targets for treatment of renal cell carcinoma. **International Journal of Oncology**, v. 4, p. 799-827, 2006.

HOEVEL, T. et al. Reexpression of the TJ protein CLDN1 induces apoptosis in breast tumor spheroids. **International Journal of Cancer**, v.108, p.374-383, 2004.

HUBANK, M.; SCHATZ, D. G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. **Nucleic acids research**, v. 22(25), p. 5640-5648, 1994.

HURLEY, J. H. et al. Ubiquitin-binding domains. **Biochem. J.**, v. 399, p. 361-372, 2006.

ILIOPOULOS, O. Molecular biology of renal cell cancer and the identification of therapeutics targets. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, p. 5593-5600, 2006.

INGENUITY. **Ingenuity Pathway Analysis Software**. Disponível em : <http://www.ingenuity.com>. Acesso em junho 2008.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics, 2008. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 58, p. 71-96, 2008.

JIANG, H. et al. RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes. **Proceeding of the Nacional Academy of Science of the USA**, v. 97(23), p. 12684-12689, 2000.

JIANG, Z. Prognostic biomarkers in renal cell carcinoma. **Expert. Rev. Mol. Diagn.**, v. 7 (3), 2007.

JIN, H. et al. Differential screening of a subtracted cDNA library: a method to search for genes preferentially expressed in multiple tissues. **Biotechniques**, v. 23(6), p. 1084-1086, 1997.

KAYASELCUK, F. et al. Expression of cyclin H in normal and cancerous endometrium, its correlation with other cyclins and association with clinicopathologic parameters. **International Journal of Gynecological Cancer**, v.16, p. 402-408, 2006.

KOLCH, W.; MISCHAK, H.; PITT, A. R. The molecular make-up of a tumor: proteomics in cancer research. **Clinical Science**, v. 108, p. 369-383, 2005.

KOMINSKY, S.L. Claudins: emerging targets for cancer therapy. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 8(18), 2006.

KOS, J. et al. Cystein proteinase inhibitors Stefin A, Stefin B, and Cystatin C in sera from patients with colorectal cancer: relations to prognosis. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 505-511, 2000.

LABER, D. A. Risk factors, classification, and staging of renal cell cancer. **Medical Oncology**, v. 23(4), p. 443-454, 2006.

LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR E BIOINFORMÁTICA. **Genome Data Mining**. Disponível em: <[www.gdm.fmrp.usp.br](http://www.gdm.fmrp.usp.br)>. Acesso março 2008.

LARIJANI, B. et al. EGF regulation of PITP dynamics is blocked by inhibitors of phospholipase C and of the Ras-MAP kinase pathway. **Current Biology**, v. 13, p. 78-84, 2003.

LECHPAMMER, M. et al. The diagnostic and prognostic utility of claudin expression in renal cell neoplasms. **Modern Pathology**, article in press, 2008.

LEE, M. J. et al. Identification of Cystatin B as a potential serum marker in hepatocellular carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 14(4), p. 1080-1089, 2008.

LIANG, P.; PARDEE, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, v. 257(5072), p. 967-971, 1992.

LIM, D. L. et al. Current understanding of the molecular mechanisms of kidney cancer: a primer for urologists. **Can. Urol. Assoc. J.**, v. 1 (2), p. S13-S20, 2007.

LIPWORTH, L. et al. The Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. **The Journal of Urology**, v. 176, p. 2353-2358, 2006.

LISITSYN, N.; LISITSYN, N.; WIGLER M. Cloning the differences between two complex genomes. **Science**, v. 259(5097), p. 946-951, 1993.

MARTINEZ, A. et al. Role of chromosome 3p12-p21 tumor suppressor genes in clear cell renal cell carcinoma: analysis of VHL dependent and VHL independent pathways of tumorigenesis. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v. 53, p. 137-144, 2000.

MIGNOGNA, C. et al. Prognostic significance of multidrug-resistance protein (MDR-1) in renal clear cell carcinomas: a five year follow-up analysis. **BMC Cancer**, v. 6(293), 2006.

MIYAMOTO, K. et al. Decreased expression of claudin-1 is correlated with recurrence status in esophageal squamous cell carcinoma. **Biomedical Research**, v. 29(2), p. 71-76, 2008.

MORIN, P. J. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. **Cancer Research**, v. 65 (21), p. 9603-9606, 2005.

MOROHASHI, S. et al. Decreased expression of claudin-1 correlates with recurrence status in breast cancer. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 20, p. 139-143, 2007.

MYEROWITZ, R. et al. Molecular pathophysiology in Tay-Sachs and Sandhoff diseases as revealed by gene expression profiling. **Human Molecular Genetics**, v.11, p. 1343-50, 2002.

National Center for Biotechnology Information. **Entrez Gene**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>>. Acesso 30 de junho 2008.

National Center for Biotechnology Information. **SAGEmap**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/SAGE>>. Acesso março 2008.

NEGM, R. S. et al. The promise of biomarkers in cancer screening and detection. **TRENDS in Molecular Medicine**, v. 8 (6) , p. 288 – 293, 2002.

NELSON, E. C. et al. Renal cell carcinoma: current status and emerging therapies. **Cancer Treatment Reviews**, v. 33(3), p. 299-313, 2007.

NELSON, P. S. et al. Molecular cloning and characterization of Prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate-restricted expression. **Proceeding of the National Academy of Science of the USA**, v. 96(6), p. 3114-3119, 1999.

NIGG, E.A. Ciclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control ? **Current Opinion in Cell Biology**, v. 8, p. 312-317, 1996.

NUPPONNEN, N. N. et al. Genetic alterations in prostate cancer cell lines detected by comparative genomic hybridization. **Cancer genetics cytogenetics**, v. 101(1), p. 53-57, 1998.

OSHIRO, G. et al. Parallel identification of new genes in *Saccharoc-MYces cerevisiae*. **Genome Research**, v. 12, p. 1210-1220, 2002.

PEITL, P.; SILVA-JUNIOR, W. A.; ZAGO, M. A. The differential gene expression of metastatic and non-metastatic human melanoma cell lines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** (a), 2009. Submitted for publication.

PEITL, P.; SILVA-JUNIOR, W. A.; ZAGO, M. A. Effects of cisplatin in gene expression on metastatic human melanoma cell (b), 2009. Submitted for publication.

PELENGARIS, S. et al. cMYC: more than just a matter of life and death. **Nature Cancer Reviews**, v. 2, p. 764-776, 2002.

PETRELLA, B. L.; BRINCKERHOFF, C. E. Tumor cell invasion of von Hippel Lindau renal cell carcinoma cells is mediated by membrane type-I matrix metalloproteinase. **Molecular Cancer**, v. 5 (66), 2006.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29(9), p. 2002-2007, 2001.

PIQUEMAL, D. et al. Transcriptome analysis of monocytic leukemia cell differentiation. **Genomics**, v. 80, p. 361-371, 2002

PRIMER3. **Pick primers from a DNA sequence**. Disponível em: <<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>>. Acesso em maio 2008.

REYES, J. L. et al. The renal segmental distribution of claudins changes with development. **Kidney Int.**, v. 62, p. 476-487, 2002.

RINI, B. I. Current status and future directions of molecular markers in renal cell carcinoma. **Current Opinion in Urology**, v. 16, p. 332-336, 2006.

RODRIGUES-LISONI, F. C. et al. In vitro and in vivo studies on CCR10 regulation by Annexin A1. **FEBS Letters**, v. 580(5), p. 1431-1438, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. **Editora Cold Spring Harbor Laboratory Press**, USA, 3th edition, 2001.

SCHENA, M. et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v. 270(5235), p. 467-470, 1995.

SHIOI, K. et al. Vascular cell adhesion molecule 1 predicts cancer-free survival in clear cell renal carcinoma patients. **Clinical Cancer Research**, v.12(24), p.7339-7346, 2006.

SHOME, D. et al. Metastasis to the eye and orbit from renal cell carcinoma – a report of three cases and review of literature. **Survey of Ophthalmology**, v. 52(2), p. 214-223, 2007.

SIMM, M. et al. Cloning of differentially expressed genes in an HIV-1 resistant T cell clone by rapid subtraction hybridization. **Gene**, v. 269(1-2), p. 93-101, 2001.

SUFAN, R. I. et al. The role of *von* Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia in renal clear cell carcinoma. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.**, v. 287, p. F1-F6, 2004.

SULLIVAN P. S. et al. Classical pathology versus molecular pathology in renal cell carcinoma. **Current Urology Reports**, v. 8, p. 5-11, 2007.

SUTPHIN, P. D.; GIACCIA, A. J.; CHAN, D. A. Energy regulation: HIF MXles it up with c-MYC powerhouse. *Developmental Cell*, v. 12, p. 845-846, 2007.

SRINIVAS, P. R. et al. Trends in biomarker research for cancer detection. **Lancet Oncology**, v. 2, p. 698-704, 2001.

SRINIVAS, P. R. et al. Proteomics for Cancer Biomarker Discovery. **Clinical Chemistry**, v. 48(8), p. 1160–1169, 2002.

SWISSHELM, K. et al. Role of claudins in tumorigenesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 919-928, 2005.

TAKAHASHI, et al. Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: Gene identification and prognostic classification. **Proceeding of the Nacional Academy of Science of the USA**, v. 98(17), p. 9754-9759, 2001.

THE CANCER GENOME ANATOMY PROJECT. **SAGE Genie**. Disponível em: <<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>>. Acesso em março 2008.

TOKÉS, A. M. et al. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. **Breast Cancer Research**, v. 7, p. R296-R305, 2005.

UNTERGASSER, G. et al. Characterization of epithelial senescence by serial analysis of gene expression: identification of genes potentially involved in prostate cancer. **Cancer Research**, v. 62, p. 6255-6262, 2002.

VALENCIA, C. A. et al. Matrin 3 is a  $Ca^{2+}$  calmodulin-binding protein cleaved by caspases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 361, p. 281-286, 2007.

VELCULESCU, V. E.; VOLGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Analyzing Uncharted Transcriptomes with SAGE. **Trends in Genetics**, v. 16, p. 423-425, 2000.

VELCULESCU, V. E. et al. Serial analysis of gene expression. **Science**, v. 270(5235), p. 484-487, 1995.

VITO-MANCINI, M. D. et al. Current insights in renal cell cancer pathology. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 26, p. 225-238, 2008.

VON KNEBEL – DOEBERITZ, M.; SYRJÄEN, K. J. Molecular markers: How to apply in practice. **Gynecologic Oncology**, v. 42 (15), p. 2639 – 2646, 2006.

YANG, G. P. et al. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. **Nucleic Acids Research**, v. 27(6), p. 1517-1523, 1999.

YEATMAN, T. J. et al. On the eve of personalized medicine in oncology. **Cancer Research**, v. 68(18), p. 7250-7252, 2008.

YOUNG, A. N. et al. Current trends in molecular classification of adult renal tumors. **Urology**, v. 67, p. 873 – 880, 2006.

ZHANG, H. et al. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient Renal cell carcinoma by repression of c-MYC activity. **Cancer Cell**, v. 11, p. 407-420, 2007.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.