

EXPRESSÃO DE FOXP3 E RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CARCINOMAS DE CÉLULAS RENAIS DE CÉLULAS CLARAS

TERCIA JOVINO NEVES SANTOS

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Doutor
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Isabela Werneck da Cunha

**São Paulo
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Santos, Tercia Jovino Neves

Expressão de FOXP3 e resposta inflamatória em carcinomas de células renais de células claras / Tercia Jovino Neves Santos – São Paulo, 2019.

59p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Isabela Werneck da Cunha

Descritores: 1. Carcinoma de Células Renais/Carcinoma, Renal Cell. 2. Neoplasias Renais/Kidney Neoplasms. 3. Adenocarcinoma de Células Claras/Adenocarcinoma, Clear Cell. 4. Inflamação/Inflammation.

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Gilson e Norma, que fizeram da felicidade deles, a minha. E que são os melhores que eu poderia ter.

Às minhas queridas irmãs Viviane, Raisal e Samia, que nunca negaram uma palavra de apoio.

Aos meus avós João e Gerarda, que nunca me esqueceram em suas orações. E Geraldo (in memoriam) e Expedita (in memoriam) que iluminam meus passos.

Ao Bruno, amor da minha vida. Por tornar meus dias mais leves e por conseguir arrancar sorrisos de mim mesmo nos momentos difíceis.

À minha preciosa Isis, luz da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Isabela Werneck, minha orientadora, pelo incentivo. Médica patologista e pesquisadora extraordinária que muito me influencia.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, médico patologista e pesquisador. Com quem tive a sorte de trabalhar e aprender ensinamentos preciosos que guardo comigo. Um exemplo.

Aos colegas, Dra Aline Giongo, Dra Tatiane Neotti e Dr Luiz Herrera, pelo companheirismo na residência e por terem encurtado a distância entre São Paulo e Brasília.

Ao A.C.Camargo Cancer Center e seu programa de pós-graduação pela oportunidade oferecida e maturidade que conquistei lá dentro.

Às senhoras Luciana Pitombeira, da pós-graduação e Júlia, do CIPE, pela compreensão e atenção.

RESUMO

Neves TJ. **Expressão de FOXP3 e resposta inflamatória em carcinomas de células renais de células claras**. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Introdução: Nas últimas décadas, progressos significativos foram feitos no manejo do carcinoma de células renais no cenário de doença avançada ou metastática. O uso de imunoterápicos estão aumentando tendo em vista que as células inatas e adaptativas do sistema imune desempenham um papel importante na regulação do crescimento do câncer. **Objetivos:** Os autores avaliaram as expressões imuno-histoquímicas de FOXP3, CD4 e CD8 e seus impactos prognósticos na sobrevida global e as compararam com fatores clínicos e patológicos. **Metodologia:** As expressões imuno-histoquímicas de FOXP3, CD4 e CD8 foram analisadas em 103 casos de carcinomas renais de células claras dispostos em *tissue microarray*. Para análise de seu impacto na sobrevida e associação com variáveis clínicas, dados epidemiológicos e clínicos foram coletados. **Resultados:** Em uma análise univariada, a razão de linfócitos CD4⁺/CD8⁺ apresentou impacto na sobrevida câncer específica (SCE) ($p=0,045$). **Conclusão:** A relação de linfócitos CD4⁺/CD8⁺ esteve associada a piores taxas de SCE. Nenhuma das variáveis clínicas e anatomopatológicas estudadas mostrou relação significativa com linfócitos positivos para FOXP3, CD4 e CD8.

Descritores: Carcinoma de Células Renais. Neoplasias Renais. Adenocarcinoma de Células Claras. Inflamação

SUMMARY

Neves TJ. **[FOXP3 expression and inflammatory response in clear cell renal cell carcinomas]**. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Significant progress has been made in the management of renal cell carcinoma during the last decades in the advanced or metastatic scenario. The use of immunotherapy is increasing as innate and adaptive cells of the immune system play an important role in regulating cancer growth. **Objectives:** The authors evaluated the immunohistochemical expressions of FOXP3, CD4 and CD8 and their prognostic impacts on overall survival and compared them with clinical and pathological factors. **Methodology:** Epidemiological and clinical data were collected. Immunohistochemical expressions were analyzed in 103 cases arranged in tissue microarray. **Results:** In a univariate analysis, the CD4⁺/CD8⁺ lymphocyte ratio impacted cancer-specific survival (ECS) ($p = 0.045$). **Conclusion:** The ratio of CD4⁺/CD8⁺ lymphocytes was associated with worse ECS rates. None of the clinical and anatomopathological variables studied showed a significant relationship with FOXP3, CD4 and CD8 positive lymphocytes.

Key-words: Carcinoma, Renal Cell. Kidney Neoplasms. Adenocarcinoma, Clear Cell. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Anatomia tumoral mostrando as características do contexto imune incluindo eixo tumoral, margem invasiva, estrutura linfoide terciária e microambiente tumoral. Também é mostrado a distribuição das células imunes	9
Figura 2	Expressão imuno-histoquímica em corte de TMA e a marcação das áreas de interesse.....	22
Figura 3	Expressão imuno-histoquímica de CD4 em linfócitos intra-tumorais (400x) de casos com diferentes intensidades	25
Figura 4	Expressão imuno-histoquímica de CD8 em linfócitos intra-tumorais (400x) de casos com diferentes intensidades	26
Figura 5	Expressão imuno-histoquímica de FOXP3 em linfócitos intra-tumorais (400x) de casos com diferentes intensidades	26
Figura 6	Curva de sobrevida global em 50 meses para os 103 pacientes portadores de CCR estratificados em mediana da relação $CD4/CD8 < 0,474$ e mediana da relação $CD4/CD8 > 0,474$ (LogRank $p=0,201$)	29
Figura 7	Curva de sobrevida câncer-específica em 50 meses para os 103 pacientes portadores de CCR estratificados em mediana da relação $CD4/CD8 < 0,474$ e mediana da relação $CD4/CD8 > 0,474$ (LogRank $p=0,045$)	30

Figura 8	Curva de sobrevida livre de doença em 50 meses para os 103 pacientes portadores de CCR estratificados em mediana da relação CD4/CD8 $<0,474$ e mediana da relação CD4/CD8 $>0,474$ (LogRank $p=0,327$).....	31
Figura 9	Curva de sobrevida global em 50 meses para os 103 pacientes portadores de CCR estratificados em acima e abaixo da mediana de linfócitos FOXP3 ⁺ (LogRank $p=0,671$)	35
Figura 10	Curva de sobrevida câncer-específica em 50 meses para os 103 pacientes portadores de CCR estratificados em acima e abaixo da mediana de linfócitos FOXP3 ⁺ (LogRank $p=0,472$)	36
Figura 11	Curva de sobrevida livre de doença em 50 meses para os 103 pacientes portadores de CCR estratificados em acima e abaixo da mediana de linfócitos FOXP3 ⁺ (LogRank $p=0,762$)	37
Tabela 1	Relação entre os achados da razão CD4+/CD8+ e parâmetros anátomo-clínicos	28
Tabela 2	Relação entre a média de linfócitos FOXP3+ e parâmetros anátomo-clínicos	34

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BCG	Bacille Calmette-Guérin
CAA	Células apresentadoras de antígenos
CCR	Carcinoma de células renais
CCRcc	Carcinoma de células renais do tipo células claras
CDs	Células dendríticas
CPH	Complexo principal de histocompatibilidade
CSDM	Células supressoras derivadas de mieloides
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
DC	Dendritic cell
ELT	Estruturas linfoides terciárias
FCEV	Fator de crescimento endotelial vascular
FDC	Follicular dendritic cell
IHC	Imuno-histoquímica
LTCs	Linfócitos T citotóxicos CD8 ⁺
MDSC	Myeloid dendritic suppressor cell
mTOR	mammalian target of rapamycin
NK	Células natural killer
RCT	Receptor de células T
SCE	Sobrevida câncer específica
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
SLP	Sobrevida livre de progressão
TLS	Tertiary lymphoid structure
Th1	Linfócitos T helper tipo 1
Th2	Linfócitos T helper tipo 2
TMA	Tissue microarray
Treg	Linfócitos T CD4 ⁺ reguladores
UV	Luz ultravioleta
VHL	von Hippel-Lindau

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Carcinoma de Células Renais	2
1.1.1	Classificação	2
1.1.2	Fatores de risco	2
1.1.3	Carcinoma de células renais do tipo células claras (CCRcc)	3
1.2	Terapias na Terapia	4
1.3	Contexto Imune	8
1.3.1	Funções antitumorais de linfócitos T	11
1.3.2	Células T CD8+ na imunidade tumoral	12
1.3.3	Papel auxiliar e efetor das células T CD4+	13
1.3.4	Papel das células T CD4+ na indução e manutenção das respostas de memória das células T CD8+	16
1.3.5	Linfócitos FOXP3+ dentro do ambiente tumoral	16
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral.....	20
2.2	Objetivos Específicos	20
3	METODOLOGIA	21
3.1	Imuno-Histoquímica.....	21
3.2	Análise Estatística	23
4	RESULTADOS	25
4.1	Relação CD4/CD8	26
4.2	Análise De Sobrevida CD4/CD8	29
4.2.1	Sobrevida global	29
4.2.2	Sobrevida câncer específica.....	30
4.2.3	Sobrevida livre de doença	29
4.3	FOXP3.....	30

4.4	Análise De Sobrevida FOXP3	33
4.4.1	Sobrevida global.....	33
4.4.2	Sobrevida câncer específica.....	36
4.4.3	Sobrevida livre de doença	37
5	DISCUSSÃO	38
5.1	Aspectos Gerais	38
5.2	Razão de Linfócitos CD4+/CD8+.....	39
5.3	Linfócitos FOXP3+.....	42
6	CONCLUSÕES	45
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

1 INTRODUÇÃO

O Carcinoma de células renais (CCR) é uma das neoplasias sólidas mais comuns, representando a 3ª neoplasia urológica em frequência, mas a primeira em mortalidade. Cerca de 30% dos pacientes com CCR, mesmo aqueles com fatores prognósticos favoráveis, desenvolverão doença metastática (WILKE et al. 2010; PLITAS e RUDENSKY 2016; DE CASSIO et al. 2019).

O desenvolvimento de imunoterapias contra o CCR tem tido grande importância no tratamento, com altas taxas de resposta, mesmo em tumores não responsivos a tratamentos prévios com terapia alvo (ZHANG et al. 2015).

O entendimento da inflamação relacionada ao tumor em diferentes tipos de câncer é pertinente, pois pode fornecer informações sobre a função das células imunes no desenvolvimento e progressão da neoplasia. Tal determinação pode ter valor prognóstico e relevância na modulação imune como adjuvante terapêutico para pacientes com parâmetros clínico-patológicos desfavoráveis (VASSALLO et al. 2015).

Evidências recentes sugerem que a imunidade inata e adaptativa do sistema imune desempenham um papel importante na regulação do crescimento do câncer. Além disso, alguns pacientes com câncer podem apresentar uma resposta imune antitumoral com o potencial de controlar ou eliminar o câncer (DISIS 2010).

No cenário clínico, vários achados sugerem que a imunidade mediada por células T fornece uma proteção contra o desenvolvimento e a progressão do CCR, e pode efetivamente mediar a regressão de lesões já estabelecidas (TATSUMI et al. 2003).

1.1 CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS

1.1.1 Classificação

A classificação histológica dos CCRs é de extrema importância, uma vez que a determinação dos subtipos histológicos tem significativas implicações prognósticas e terapêuticas. Atualmente, segundo a organização mundial de saúde (MOCH et al. 2016), podemos identificar cerca de 20 subtipos sendo os mais frequentes os carcinomas de células renais do tipo células claras (65-70%), os carcinoma de células renais do tipo papilífero (10-15%) e os carcinoma de células renais do tipo cromóforo (5-10%). Para os dois primeiros, existe um sistema de graduação tumoral criado pela *International Society of Urological Pathology* (ISUP) baseado na presença e proeminência de nucléolos e pleomorfismo nuclear. Esta graduação vai de 1 a 4 e está relacionada a prognóstico, sendo quanto maior o grau, pior o prognóstico (MOCH et al. 2016).

1.1.2 Fatores de risco

A incidência de CCR aumenta com a idade e é maior para homens do que para mulheres. Os principais fatores de risco estabelecidos para o CCR

incluem obesidade, hipertensão e tabagismo. Outras condições clínicas que têm sido associadas ao CCR incluem doença renal crônica, hemodiálise, transplante renal, doença cística renal adquirida, diagnóstico prévio de CCR e, possivelmente, diabetes mellitus (VAN DEN BERG 2013). Muitos fatores relacionados a estilo de vida, dietéticos, ocupacionais e ambientais também são associados ao CCR com diferentes níveis de evidência (SCELO e LAROSE 2018). Fatores genéticos também contribuem para o risco de CCR. Indivíduos com história familiar de câncer renal apresentam um risco aumentado em aproximadamente duas vezes de desenvolver a doença (KARAMI et al. 2010). Inúmeras síndromes genéticas também cursam com o desenvolvimento de CCR, dentre elas, as mutações mais frequentes ocorrem nos genes *SETD2*, *PBRM2*, *BAP1*, *FLCN*, *FH*, *MET*, *PTEN*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *TSC1*, *TSC2* e *VHL*, alguns dos quais também são implicados no desenvolvimento de CCR esporádicos (HAAS e NATHANSON 2014; BIHR et al. 2019).

1.1.3 Carcinoma de células renais do tipo células claras (CCRcc)

Os CCR de células claras constituem cerca de 65 -70% de todos os carcinomas renais. Cerca de 60-80% são encontrados incidentalmente aos exames de imagem. Geralmente são tumores corticais e únicos, que ocorrem com igual frequência em ambos rins (VAN DEN BERG 2013; PETEJOVA e MARTINEK 2016). Histologicamente, são definidos por citoplasma claro, com aglomerados de células agrupadas e rodeados por uma densa rede endotelial. A característica genética mais intimamente associada a esse câncer é a perda

ou mutação do gene supressor de tumor von Hippel-Lindau (*VHL*) (VAN DEN BERG 2013). A mutação ou perda do *VHL* é identificada em 60-90% dos casos esporádicos. A perda desta proteína resulta na estabilização da família de fatores indutores de hipóxia - ativadores transcricionais de proteínas de genes que estão envolvidos na mediação da resposta à hipóxia. Isso, por sua vez, ativa genes envolvidos na angiogênese, migração celular e metabolismo. Além desse evento genético comum, outros eventos intimamente associados ao CCRcc incluem mutações com perda de heterozigose em um grande grupo de genes remodeladores da cromatina. Os genes mais comumente inativados incluem *PBRM1*, *BAP1* e *SETD2*, embora mutações em uma variedade de modificadores de histonas adicionais (*KDM5a*, *ARID1a* e *UTX*) também sejam vistas (DALGLIESH et al. 2010; GIACCIA et al. 2013). O impacto dessas mutações nos resultados e nas propriedades biológicas desses cânceres só agora está sendo identificado com evidências recentes que apontam para uma associação entre as mutações no gene *SETD2* e as alterações na composição da cromatina. Finalmente, mutações em genes associados à sinalização da via mTOR (*PIK3CA*, *PTEN* e *MTOR*) também foram identificadas em uma proporção substancial de tumores. (KIM et al. 2008; HAKIMI et al. 2013; KAPUR et al. 2013; COSTA et al. 2017).

1.2 ATUALIZAÇÕES NA TERAPIA

O tratamento do carcinoma de células renais mudou muito nos últimos 15 anos. O progresso no tratamento cirúrgico do tumor primário e o aumento da

compreensão da biologia molecular e genômica da doença levaram ao desenvolvimento de novos agentes imunoterápicos. A imunoterapia começou no final do século XIX quando William B. Coley tentou aproveitar o sistema imunológico para tratar o câncer injetando misturas de *Streptococcus pyogenes* vivos e inativados e *Serratia marcescens* nos tumores dos pacientes em 1891 após ter notado vários casos em que pacientes com câncer entraram em remissão espontânea após desenvolver erisipela. Coley obteve respostas como remissão completa durável em vários tipos de neoplasias, incluindo sarcoma, linfoma e carcinoma testicular. A falta de um mecanismo de ação conhecido para as 'toxinas de Coley' e os riscos de infectar deliberadamente pacientes com câncer com bactérias patogênicas fizeram com que os oncologistas adotassem a cirurgia e a radioterapia como tratamentos padrão no início do século XX (DECKER e SAFDAR 2009).

A estratégia de usar bactérias atenuadas para tratar doenças malignas ressurgiu em 1976, quando foi realizado um estudo para testar o uso da vacina contra tuberculose Bacille Calmette-Guérin (BCG) como um meio de prevenir a recorrência de câncer de bexiga invasor não muscular. A terapia com BCG foi muito eficaz e continua a ser usado hoje (MORALES et al. 2017).

A idéia de usar a imunoterapia no câncer, em geral, voltou a ter destaque quando Thomas e Burnet propuseram a teoria da vigilância imunológica do câncer em 1957. Eles sugeriram que os linfócitos agiam como sentinelas para identificar e eliminar células somáticas transformadas por mutações espontâneas. A ausência de dados que apoiam a existência de antígenos específicos de tumores e a incapacidade técnica de cultivar e

manipular linfócitos *in vitro* na época adiaram mais progressos nessa área por algum tempo (DUNN et al. 2002).

O fator de crescimento de células T interleucina 2 (IL-2) foi identificado em 1976 MORGAN et al. permitindo aos pesquisadores cultivar células T *in vitro* pela primeira vez. Demonstrou-se que grandes doses de IL-2 são eficazes quando administradas a pacientes com cânceres metastáticos estabelecidos, aumentando a produção de células T. O uso da IL-2 como agente imunoterápico acabou por obter aprovação da US Food and Drug Administration (FDA) em câncer renal metastático em 1991 e melanoma metastático em 1998 ROSENBERG et al.

Na década de 1970, Milstein e Köhler foram pioneiros na produção de anticorpos monoclonais em laboratório usando hibridomas, linhas celulares secretoras de anticorpos formadas pela fusão de linfócitos com linhas celulares de mieloma (MILSTEIN 1999).

A pesquisa sobre terapias baseadas em anticorpos acabou levando ao desenvolvimento de rituximab, que se liga ao CD20 na superfície das células B imaturas e as torna alvo para eliminação pelas células T natura killer. O primeiro anticorpo monoclonal aprovado pelo FDA para o tratamento de um câncer, o linfoma não-Hodgkin, foi lançado em 1997 por RUDNICKA et al.).

Quanto às vacinas, em 1991, os pesquisadores clonaram um antígeno derivado do melanoma que poderia induzir uma resposta das células T citotóxicas (VAN DER BRUGGEN et al. 2007).

As vacinas clinicamente eficazes permaneceram ilusórias, no entanto, até 2010, quando o FDA aprovou a primeira vacina contra o câncer, o

sipuleucel-T, para câncer de próstata resistente à castração. Essa vacina de células dendríticas foi capaz de prolongar a sobrevida global dos pacientes em ensaios clínicos, embora não tenha tido nenhum efeito no tempo de progressão da doença (FINN 2007).

Na última década, avanços marcantes no tratamento do CCR metastático foram feitos através da aprovação de terapias alvo incluindo sorafenib, sunitinib, bevacizumab, pazopanib e axitinib que inibem o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seu receptor (VEGFR) e everolimus e temsirolimus, que inibem o complexo mTOR. Desde 2015, agentes com alvos adicionais além do VEGFR foram autorizados, como cabozantinibe e lenvatinibe. Mais recentemente, imunoterapias como o nivolumab também foram adicionadas ao arsenal de drogas a serem utilizadas no tratamento de CCR metastático (HSIEH et al. 2017b).

O CCR localizado pode ser tratado com nefrectomia parcial ou radical (LJUNGBERG et al. 2015), ablação (EL DIB et al. 2012) ou vigilância ativa (PIERORAZIO et al. 2015), porém, apesar da nefrectomia com intenção curativa, cerca de 30% dos pacientes que apresentam CCRcc com doença localizada eventualmente desenvolvem metástases e necessitarão de terapias sistêmicas (PATARD et al. 2004; MESKAWI et al. 2012; WOLFF et al. 2016). O CCR avançado possui altas taxas de mortalidade sendo altamente resistente à radiação e quimioterapia (FIGLIN et al. 2012). As abordagens terapêuticas que visam a sinalização de VEGF e mTOR continuam a desempenhar um papel significativo no tratamento do CCR avançado (FIGLIN et al. 2012).

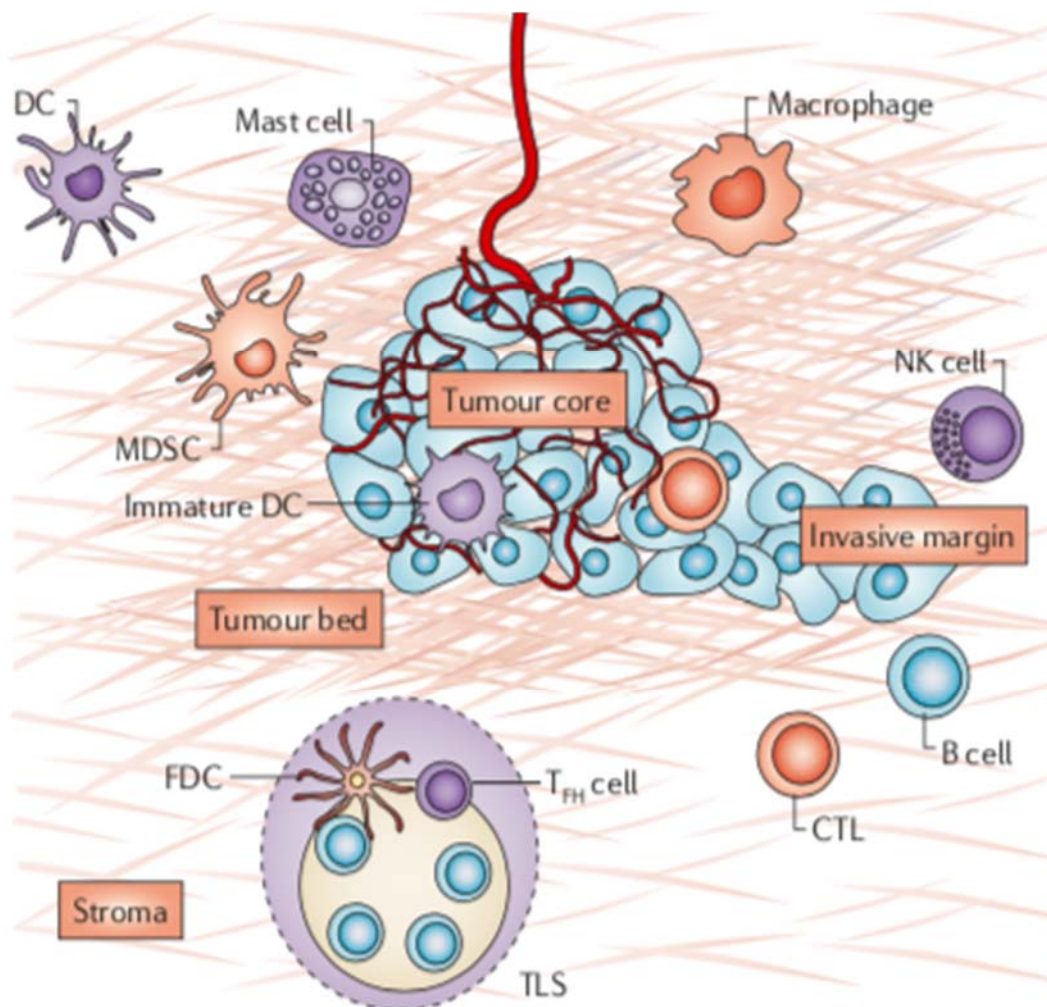
Devido algumas alterações genéticas, os CCRcc são ricos em lipídios e glicogênios, e são altamente vascularizados (REUTER e TICKOO 2010; HAKIMI et al. 2016), este fato explica por que os agentes que inibem, principalmente o VEGF e seu receptor VEGFR, são tratamentos eficazes para o CCRcc metastático (ESCUДИER et al. 2016; LEE et al. 2016). Além disso, as mutações de mTOR no CCRcc geralmente são do tipo missense e funcionalmente ativadoras (GRABINER et al. 2014; XU et al. 2016), o que poderia explicar a razão pela qual os inibidores da via mTOR, incluindo o everolimus e o temsirolimus, são eficazes (VOSS et al. 2014; KWIATKOWSKI et al. 2016).

Outra abordagem terapêutica tem sido a associação entre 2 ou mais drogas que parecem ter melhores resultados que um único agente isolado (HANAHAH e WEINBERG 2011; BOZIC et al. 2013; HSIEH et al. 2017a).

1.3 CONTEXTO IMUNE

Análises histopatológicas de tumores mostram que um número variado de células imunes é encontrado tanto dentro quanto ao redor do tumor (Figura 1). Os macrófagos, mastócitos, granulócitos e células supressoras derivadas de mieloides (CSDMs) são encontrados na maioria dos casos infiltrando ou circundando leitos tumorais. Está bem estabelecido que a inflamação crônica e a presença de macrófagos favorecem o crescimento e disseminação tumoral. Os linfócitos não são distribuídos aleatoriamente, mas estão localizados em áreas específicas. As células natural killer (NK), por exemplo,

são encontradas no estroma e não estão em contato com as células tumorais. As células B são encontradas principalmente na margem invasiva de tumores em crescimento e em estruturas linfoides terciárias (ELT) adjacentes a leitos de tumores (FRIDMAN et al. 2012).



Fonte: FRIDMAN et al. (2012).

Figura 1 - Anatomia tumoral mostrando as características do contexto imune incluindo eixo tumoral, margem invasiva, estrutura linfóide terciária e microambiente tumoral. Também é mostrado a distribuição das células imunes

As células T, particularmente as células T CD8⁺, podem estar localizadas na margem invasiva, mas também podem estar no centro do tumor. Poucas células T CD8⁺ são observadas nas ELT. Células dendríticas imaturas estão distribuídas no centro do tumor, em contato com células tumorais ou no estroma circundante. Células dendríticas maduras concentram-se em ELT, em íntimo contato com células T virgens (FRIDMAN et al. 2012).

Os linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (LTCs) são diretamente capazes de matar células tumorais. Os linfócitos T helper CD4⁺ (Th) são uma classe de linfócitos T, secretora de citocinas. Os linfócitos T helper tipo 1 (Th1) desempenham um papel crucial na ativação dos LTCs. Os linfócitos T helper tipo 2 (Th2) estimulam a imunidade humoral e ativam os eosinófilos. Em termos de imunidade antitumoral, a ativação de Th2 é menos efetiva que a ativação de Th1 (YU e FU 2006). Além dos subgrupos Th1 e Th2, um subconjunto de linfócitos T CD4⁺ reguladores (Treg) suprime os linfócitos T efetores (CURIEL et al. 2004). Nos últimos anos, a hipótese de que as proporções entre diferentes subconjuntos são mais preditivas do prognóstico ganhou muita atenção. As razões frequentemente utilizadas são a razão CD8⁺/FoxP3⁺ (efetor/regulatória) e a razão CD8⁺/CD4⁺ (efetor/ajudante). Essas medidas podem fornecer uma visão mais abrangente dos eventos no local da doença, já que o sistema imunológico não é uma coleção de agentes solitários, mas sim um complexo sistema de freios e contrapesos onde cada subconjunto depende de colaboração e autorização de outros subconjuntos (GOODEN et al. 2011).

1.3.1 Funções antitumorais de linfócitos T

A população de células T maduras é composta por células T $\alpha\beta$ expressando CD4 ou CD8 e células que expressam o receptor de células T (RCT) $\gamma\delta$ CD4⁻/CD8⁻. A função das células T CD4⁺ e CD8⁺ é ditada pela expressão desses co-receptores, CD4 ou CD8, para os quais o ligante é o domínio $\beta 2$ da molécula do complexo principal de histocompatibilidade (CPH) classe II (KRESGE et al. 1992) e o domínio $\alpha 3$ de moléculas CPH classe I, respectivamente. Devido a estas especificidades, o receptor $\alpha\beta$ de células T CD8⁺ é restringido ao reconhecimento de antígenos apresentados por moléculas CPH classe I e o receptor de células T CD4⁺ para antígenos apresentados por moléculas CPH classe II. No entanto, relativamente pouco se sabe sobre a função de T $\gamma\delta$ na imunidade antitumoral até o momento. (POTTER et al. 1989).

O papel importante das células T como efetores na imunidade antitumoral foi mostrado pela primeira vez em camundongos. Por exemplo, os tumores induzidos pela luz ultravioleta (UV) são combatidos regularmente por camundongos normais, mas crescem progressivamente na ausência de células T (SPELLMAN e DAYNES 1981; WARD et al. 1990). Além disso, foi demonstrado de forma convincente que a imunidade mediada por células T é essencial para o combate de tumores induzidos por vírus e por químicos (CHEEVER et al. 1986).

A importância das células T na imunidade tumoral também tem sido mostrada em estudos com humanos, embora com limitações já que a maioria dos modelos tumorais em camundongos tem a vantagem de utilizar células T

específicas para antígenos gerados a partir de camundongos isentos de tumor. Assim, em estudos com humanos, os linfócitos T são isolados do sangue periférico (KNUTH et al. 1984; MUKHERJI et al. 1989) ou do tumor de pacientes com câncer. Utilizando transferência do ILT expandido *in vitro* em combinação com quimioterapia, testes clínicos recentes mostraram taxas de resposta positivas de até 50% em pacientes selecionados com cânceres agressivos em estágio avançado (ROSENBERG 2001; DUDLEY 2002; DUDLEY e ROSENBERG 2003; ROSENBERG et al. 2004).

1.3.2 Células T CD8⁺ na imunidade tumoral

Embora o significado dos linfócitos na imunidade tumoral seja raramente discutido, a importância relativa de vários subgrupos de células T na rejeição de tumores é objeto de grandes controvérsias (YU e FU 2006). De um modo geral, uma vez que o câncer é uma doença causada por uma série de mutações em vários tipos de células, as diferenças nos subconjuntos de células T necessárias para mediar a rejeição do tumor não são de todo surpreendentes. Um desses subconjuntos são os LTCs. A maioria dos tumores é positiva para CPH classe I, mas negativa para MHC classe II, e os LTCs são capazes de induzir a morte de tumores mediante o reconhecimento direto de antígenos peptídicos, apresentados pelas moléculas CPH classe I do tumor. Assim, a atenção inicial à resposta imune antitumoral foi preferencialmente dada às células T CD8⁺, fato apoiado por numerosos estudos em camundongos. Por exemplo, em tumores induzidos por luz UV, o subconjunto de células T CD8⁺ citotóxicas parece ser necessário para rejeição

da lesão (WARD et al. 1990). Consistente com os experimentos em camundongos, dados clínicos de pacientes com câncer sustentam a importância das células T CD8⁺ em trazer uma resposta antitumoral. Estudos de transferência adotiva de linhagens de células T CD8⁺ estimuladas *in vitro* e clones CD8⁺ específicos para antígenos tumorais medeiam a imunidade antitumoral quando transferidos de volta para hospedeiros portadores de tumor. Tomados em conjunto, as células T CD8⁺ na imunidade tumoral podem ser inquestionavelmente anunciadas como um dos principais subconjuntos de células T que medeiam construtivamente uma resposta imune antitumoral eficaz (ROSENBERG 2001).

1.3.3 Papel auxiliar e efector das células T CD4⁺

É indiscutível que as células T CD4⁺ são parte integrante da imunidade adaptativa, mas o papel específico que desempenham na montagem de uma resposta imune antitumoral permanece um tema de debate. Mais importante, semelhante às células T CD8⁺, células T CD4⁺ específicas do tumor que podem reconhecer antígenos tumorais existem e os dados mostram que essas células T migram para o local do tumor tanto em cânceres humanos quanto em camundongos (BECK-ENGESER et al. 2002).

O fenótipo da célula T CD4⁺ que impede a resposta antitumoral parece ser atribuído a uma função reguladora. Esse dualismo paradoxal das células T CD4⁺ obriga a diferenciação adicional deste subtipo em células T CD4⁺ auxiliares e reguladoras (CURIEL et al. 2004).

Embora as células T CD4⁺ tenham se mostrado suficientes para eliminar as células tumorais na ausência de células T CD8⁺ em alguns modelos tumorais, é mais frequente o caso em que tanto CD4⁺ como CD8⁺ são necessários para a rejeição efetiva do tumor. Em parte, isso se deve a uma porção substancial das células tumorais que expressam apenas moléculas CPH classe I, não moléculas de classe II, limitando assim o reconhecimento direto pelas células T CD4⁺. Além disso, o mecanismo efetivo predominante na imunidade do tumor é a lise direta de células tumorais pela classe I do CPH, reconhecendo LTC CD8⁺. (MUMBERG et al. 2002).

O papel das células T CD4⁺ nas respostas antitumorais é, muitas vezes, ajudar na ativação das células T CD8⁺, levando à destruição do tumor por LTC. A ajuda de células T CD4⁺ para LTCs na imunidade do tumor é dividida em três fases: indução precoce, manutenção efetora e memória. Foi debatido durante décadas se as células T CD4⁺ são necessárias para a preparação do LTC. Evidências acumuladas indicaram que, para a indução de respostas de células T CD8⁺ tumorais específicas, a apresentação cruzada de antígenos que foram capturados por células apresentadoras de antígenos (CAAs) profissionais, tais como células dendríticas (CDs), desempenha um papel dominante. A ajuda das células T CD4⁺ tem sido sugerida como essencial para esse cruzamento na indução da imunidade de LTC. Acredita-se que eles agem ativando APCs que, por sua vez, expressam co-estimulatórios essenciais para uma melhor ativação das células T CD8⁺. Em resumo, os dados disponíveis sugerem que as células T CD4⁺ são geralmente necessárias para a ativação de LTCs quando as CDs não são ativadas através

de outro mecanismo. No entanto, outras condições, como o nível de antígeno fornecido ou a integridade da drenagem dos tecidos linfoides, também podem afetar a necessidade de ajuda com linfócitos T CD4⁺. Além disso, a ajuda de células T CD4⁺ tem sido considerada essencial para a indução de respostas de LTC contra tumores na maioria dos casos (YU et al. 2003).

Embora a necessidade de células T auxiliares CD4⁺ na indução de LTC continue a ser uma controvérsia, é geralmente aceito que as células T CD4⁺ são essenciais para a manutenção de LTC na resposta imune específica do tumor. Para o hospedeiro sustentar perpetuamente uma função LTC efetora e evitar uma persistente infecção por vírus, a ajuda de células T CD4⁺ pode ser necessária através da secreção ou estimulação de citocinas que é independente da ajuda da CDs. Há alguns dados corroborantes da vacinação terapêutica e estudos de transferência adotiva que implicam a ajuda do CD4⁺ na manutenção da função de LTC viável (BATTEGAY et al. 1994).

Em alguns modelos de camundongos, enquanto o crescimento do tumor foi evitado pela vacinação com indução de LTC mediado por CD pulsada com peptídeo, a mesma imunização terapêutica contra um tumor estabelecido (um cenário que imita a persistência crônica do antígeno) exigiu a ajuda de células T CD4⁺ (WICK et al. 2002). Assim, à medida que o tumor amadurece, o CD4⁺ ajuda a tornar-se vital para a persistência da resposta efetora. Relatos publicados sobre ensaios clínicos de imunoterapia adotiva (isolamento de células específicas de antígenos, sua expansão e ativação e subsequente administração autóloga) apoiam ainda mais esse conceito (DUDLEY e ROSENBERG 2003). A co-transferência de células T CD4⁺ com

células T CD8⁺ expandidas de células T autólogas que se infiltram no tumor prolongou a sobrevivência das células T transferidas adotivamente. Em conjunto, é evidente que a longevidade de uma resposta de LTC específica do tumor é aumentada pela presença de células T CD4⁺ (DUDLEY e ROSENBERG 2003).

1.3.4 Papel das células T CD4⁺ na indução e manutenção das respostas de memória das células T CD8⁺

Após o clearance do antígeno, a maioria dos LTCs efetores sofre apoptose, enquanto uma porção menor se converte em linfócitos com um fenótipo de memória. Assim, em um segundo encontro de antígeno, a resposta de LTC se propaga com velocidade e potência muito maiores. É geralmente aceito que as células de memória persistem na circulação após uma resposta efetora. E o papel das células T CD4⁺ na indução e manutenção de LTCs de memória tem sido controverso. Em conjunto, os dados disponíveis sugerem um requisito geral para o CD4 ajudar a gerar uma memória CD8 saudável. No entanto, o estágio em que as respostas das células T CD8⁺ requerem ajuda de linfócitos CD4⁺ e a natureza de tal ajuda permanecem não conhecidos (FRIDMAN et al. 2012).

1.3.5 Linfócitos FOXP3⁺ dentro do ambiente tumoral

O fator de transcrição *forkhead box protein P3* (FOXP3) exibe um papel de regulador da expressão gênica que é fundamental para a identidade e função do subgrupo mais amplamente reconhecido e bem estudado de

células T imunorregulatórias: as células T regulatórias CD4⁺ (Treg) (LU et al. 2017). Os linfócitos T regulatórios (Tregs) representam uma subpopulação de linfócitos T caracterizados pela expressão da molécula CD25⁺ e do fator nuclear FOXP3. Sob condições normais, linfócitos FOXP3⁺ agem na supressão da resposta imune antitumoral, mantendo assim, a tolerância imunológica do tecido hospedeiro e facilitando a progressão tumoral. Assim, linfócitos T regulatórios FoxP3⁺ são investigados como um potencial fator prognóstico e podem também representar um novo alvo terapêutico (WILKE et al. 2010; PLITAS e RUDENSKY 2016).

De forma sucinta, o sistema imunológico está constantemente trabalhando para encontrar um equilíbrio entre Th1 e Th2, ativação e apoptose, e condições pró e anti-inflamatórias. Sabe-se que durante a progressão do tumor o microambiente tumoral torna-se anfitrião de tal balanceamento, especificamente o equilíbrio entre o efector e a resposta regulatória. Embora não seja muito conhecido, algumas evidências sugerem que o subtipo de células T regulatórias dentro do tumor tem função semelhante às células T regulatórias CD4⁺ envolvidas na autoimunidade (DIECKMANN et al. 2002; WANG et al. 2004; YU et al. 2005).

Os cânceres geralmente se desenvolvem por um longo período de tempo. As principais características fisiopatológicas da neoplasia maligna, a invasão através das barreiras teciduais naturais e metástases estão frequentemente associadas à ruptura da arquitetura tecidual normal, levando ao início de respostas inflamatórias. Nesse aspecto, os cânceres podem se assemelhar a uma resposta inflamatória crônica. Diante disso, especula-se

que os mecanismos anti-inflamatórios que são acionados no início da invasão e acoplados aos mecanismos internos controlados por células malignas para produzir citocinas como o TGF- β desencadeiam uma reação regulatória que pode inibir a imunidade antitumoral. Dados tais eventos, a perda da função reguladora pela depleção de linfócitos Treg CD4⁺ induzido por tumor pode aumentar a resposta efetora, resultando na rejeição do tumor (FRIDMAN et al. 2012).

Experimentos *in vivo* em camundongos demonstram que a depleção de células T CD4⁺ CD25⁺ através do tratamento com anticorpo anti-CD25 antes do desafio tumoral aumenta significativamente a eficácia da imunidade antitumoral induzida por vacina (SUTMULLER et al. 2002; TAWARA et al. 2002; DANIEL et al. 2003). Além disso, foi demonstrado que o equivalente de linfócitos Treg identificado em camundongos também existe em humanos. Essas células T CD4⁺ CD25⁺ CD45RO⁺, representam cerca de 6% das células T CD4⁺ e estão presentes no sangue de adultos humanos saudáveis (DIECKMANN et al. 2002). As células T CD4⁺ CD25⁺ que possuem propriedades regulatórias também foram relatadas como estando entre as células T do ILT em diferentes tipos de câncer como pulmão, ovário, pâncreas, mama e gastrointestinal, além de linfoma (SASADA et al. 2003; WOO et al. 2014). Um grupo de pesquisadores que estudou o infiltrado inflamatório em carcinoma de células escamosas do pênis viu que a expressão de FOXP3 é um preditor independente de recorrência (VASSALLO et al. 2015). Por outro lado, outros estudos mostraram que altos níveis de infiltrado inflamatório rico em linfócitos FOXP3 positivos não tiveram impacto na sobrevida de mulheres

com carcinoma endometrial (RASHID et al. 2017). Em carcinoma pulmonar não-pequenas células, a presença das células Treg FOXP3⁺ está relacionada a pior prognóstico (GIATROMANOLAKI et al. 2019). Em carcinomas mamários triplo negativos, os resultados apontam para melhor sobrevida quando correlacionado a Treg FOXP3⁺/CD25⁺ (ZHANG et al. 2019). Em tumores colorretais, foi usado uma abordagem diferente e foi mostrado que linfócitos Treg FOXP3⁺ estão mais relacionados a tumores colorretais do lado esquerdo (SADAHIRO et al. 2019). A presença de células Treg nos locais dos tumores sugere que eles podem ter um efeito profundo na inibição das respostas efectoras das células T contra alguns cânceres humanos (SIEGEL et al. 2000; CURIEL et al. 2004; YU et al. 2005).

O fato de que populações funcionais de células imunes estão localizadas em diferentes áreas de um tumor e que isso varia entre os tipos de câncer sugere que diferentes populações de células imunes podem ter diferentes funções no controle do tumor. Além disso, a densidade variável e a localização dessas células imunes entre tumores em diferentes indivíduos com o mesmo tipo de câncer levam à pergunta se o contexto imunológico pode afetar o aparecimento tumoral, sua agressividade e consequentemente o prognóstico e desfecho do paciente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de FOXP3 e a relação CD4/CD8 em uma série de casos de CCR do tipo células claras (CCRcc).

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Analisar o impacto da expressão de FOXP3 e a relação CD4/CD8 nas taxas de sobrevida global (SG), sobrevida câncer específica (SCE) e sobrevida livre de doença (SLD) e tentar correlaciona-la a estágio clínico, grau e demais parâmetros clínico-patológicos.

3 METODOLOGIA

Foram selecionados 103 casos de CCRcc. As amostras parafinadas foram dispostas em um *tissue microarray* (TMA) de 1mm, em duplicata e submetidas a estudo imuno-histoquímico para a detecção de FOXP3 (clone 236A/E7), CD4 (clone SP35; ventana) e CD8 (clone SP57; ventana). Em todos os casos as expressões de FOXP3, CD4 e CD8 intratumorais foram analisadas e quantificadas de forma semi-automatizada usando-se o equipamento Aperio em uma área tumoral de 1 mm. Os dados anátomo-clínicos foram colhidos dos prontuários dos pacientes e das lâminas revisadas. Para a análise e estatísticas dos resultados utilizamos o programa SPSS versão 17.0.

3.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Cortes sequenciais obtidos do bloco de parafina do TMA foram desparafinizados em xilol, hidratados em álcool em sequência decrescente de graduação e coradas com um anticorpo primário comercialmente disponível direcionado contra CD4 (Clone SP34, Ventana; tempo de recuperação antigênica de 36 min, pH 9 e incubação do anticorpo por 32 minutos), CD8 (Clone SP57, Ventana; tempo de recuperação antigênica de 36 min, pH 9 e incubação do anticorpo por 32 minutos) e Fox-P3 (Clone 236A/E7, Abcam;

tempo de recuperação antigênica de 64 min, pH 9 e incubação do anticorpo por 32 minutos). A reação imuno-histoquímica (IHC) foi realizada utilizando um método automatizado em um Ventana Autostainer baseado no protocolo Bench-Mark XT (catálogo 390M-16).

Após realização do estudo imuno-histoquímico, as lâminas de TMA foram escaneadas utilizando o escaneador de lâminas Aperio (Aperio AT Turbo, Leica Biosystems). As áreas de interesse das imagens digitalizadas foram marcadas por patologista experiente (TN) e analisadas usando o software ImageScope (Aperio - Leica Biosystems). A marcação das áreas de interesse consistiu em selecionar digitalmente toda a área representativa tumoral de cada caso no TMA e a análise consistiu no uso do algoritmo nuclear v9 (Aperio - Leica Biosystems). Este algoritmo aplica critérios como tamanho, intensidade de cor, formato, para contar como positiva a célula estudada. O resultado apresentado é quantitativo com a identificação do número de células positivas para cada marcador utilizado, e o valor final anotado como número de células por mm².

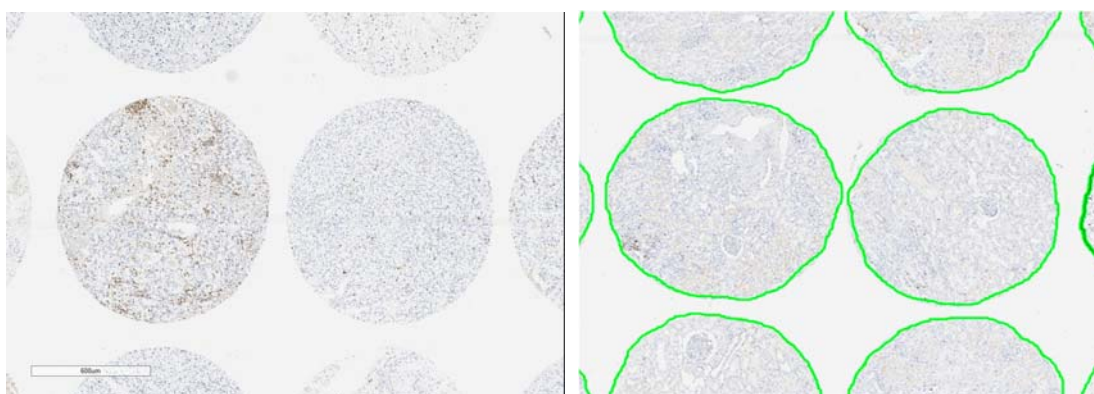


Figura 2 - Expressão imuno-histoquímica em corte de TMA e a marcação das áreas de interesse.

3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística utilizamos o software *Windows Statistical Package for Social Science* (SPSS), versão 17.0.

A distribuição das variáveis clínicas e anatomopatológicas está apresentada na forma de tabelas de contingência. A mensuração das variáveis quantitativas foi expressa pelas médias e seus respectivos desvios-padrão.

Com o intuito de se verificar a existência de associação da expressão de FOXP3 e a relação CD4/CD8 às demais variáveis, foi realizado o teste Qui Quadrado de Pearson (MORETTIN e BUSSAB 2010). Para os casos em que as frequências esperadas foram inferiores a 5 foi utilizado o teste exato de Fisher. O nível de significância adotado foi o de 5%.

Ao estudar as curvas de sobrevida, levou-se em consideração que a sobrevida global (SG) se refere aos óbitos por todas as causas; sobrevida câncer-específica (SCE), óbitos por câncer ou complicações peri-operatórias e sobrevida livre de doença (SLD), óbitos por câncer ou complicações peri-operatórias associado a recidivas tumorais. Para estudar as análises de SG, SCE e SLD utilizou-se o estimador de KAPLAN e MEIER (1958) como ferramenta para estimar a probabilidade de um paciente com CCR estar vivo ou não apresentar recidiva até o instante de tempo considerado. Através da representação gráfica desse estimador, conseguimos visualizar, para uma determinada variável, qual categoria de pacientes apresenta maior probabilidade de não morrer por CCR ou não apresentar recidiva de CCR ao

longo do tempo. Quanto mais superior for a curva referente a uma determinada categoria, maior será a probabilidade de os pacientes dessa categoria estarem vivos ou sem recidiva do CCR até o instante de tempo considerado. Para a comparação das curvas estimadas para cada categoria dentro de uma determinada variável utilizou-se o teste não-paramétrico de LogRank. Os valores p correspondentes aos testes estão apresentados na legenda de cada gráfico. O nível de significância adotado foi de 5%.

Os valores referentes a dados de frequência e taxas de sobrevida foram simplificados com técnicas de arredondamento padronizadas com eliminação de casas decimais. A significância estatística foi determinada para um valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Dos 103 pacientes avaliados, 42 eram femininos e 61 masculinos. 49, 42 e 12 tumores apresentaram Grau 2, 3 e 4 de ISUP respectivamente. A quantidade média de linfócitos CD4 positivo nos casos avaliados foi de 89,3 variando de 0 a 518 (Figura 3) e a quantidade média de linfócitos CD8 positivo, 236,3 variando de 9 a 1664. (Figura 4). A relação CD4/CD8 variou de 0 a 5,6. Quanto ao FOXP3, a quantidade média de linfócitos FOXP3⁺ foi de 15,08 variando de 0 a 264. (Figura 5)

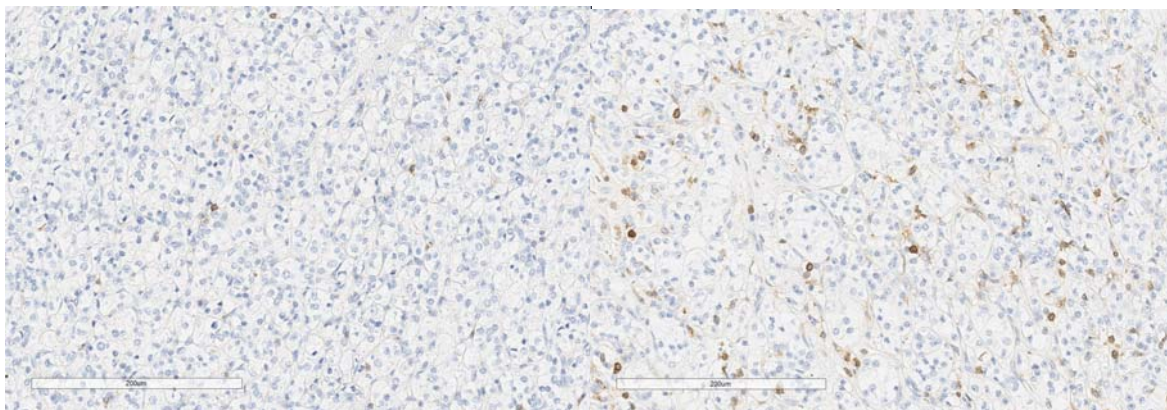


Figura 3 - Expressão imuno-histoquímica de CD4 em linfócitos intra-tumorais de casos com diferentes intensidades.

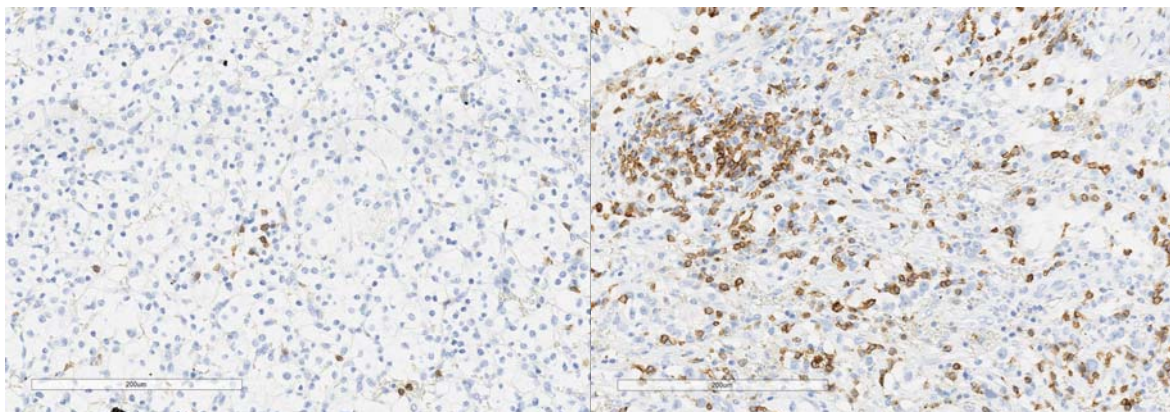


Figura 4 - Expressão imuno-histoquímica de CD8 em linfócitos intra-tumorais de casos com diferentes intensidades.

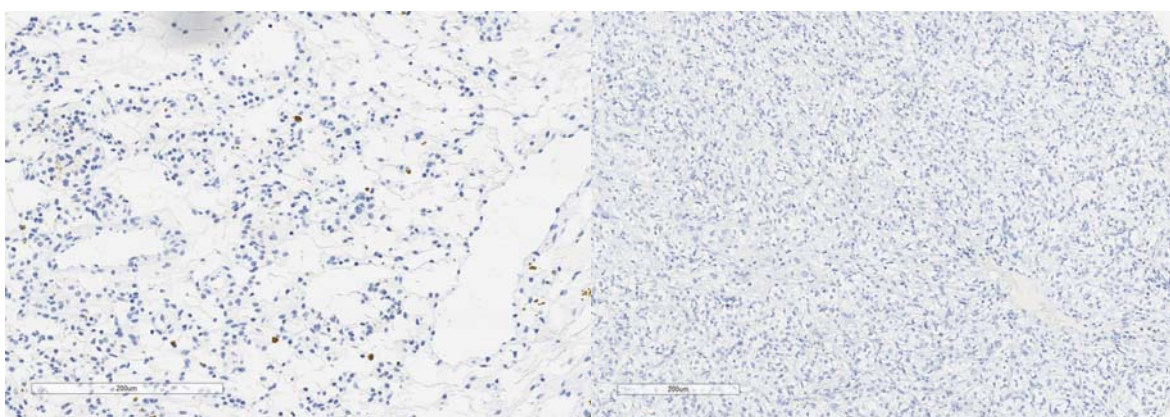


Figura 5 - Expressão imuno-histoquímica de FOXP3 em linfócitos intra-tumorais de casos com diferentes intensidades.

4.1 RELAÇÃO CD4/CD8

A relação entre os achados da razão $CD4^+/CD8^+$ e os parâmetros clínicos, podem ser vistos na Tabela 1. Quando analisamos a razão CD4/CD8 com os parâmetros clínicos, como estadiamento, grau histológico, metástase e tamanho tumoral, não observamos diferença estatística. Na análise das curvas de SG, SCE e SLD, pacientes com menor relação CD4/CD8 apresentaram menor taxa de SCE.

Não foi observado diferença estatística significativa entre sexo e razão $CD4^+/CD8^+$ ($p=0,108$).

Em relação ao tamanho, a diferença observada foi naqueles que variavam de 7-10 cm, onde do total de 16 casos, 11 deles apresentaram a razão maior que 0,474. Porém, quando visto em conjunto, também não apresentaram diferença estatística ($p=0,215$).

Os casos metastáticos e não-metastáticos também não mostraram diferença quando comparados com a quantidade de células $CD4^+$ e $CD8^+$ ($p=0,750$).

A análise da presença ou não de invasão microvascular manteve o padrão e também não mostrou diferença estatística com relação à razão $CD4^+/CD8^+$ ($p=0,695$).

A presença ou não de necrose tumoral também não influenciou no padrão do infiltrado imune nos CCR ($p=0,482$).

O grau de ISUP (International Society of Urological Pathology) continua sendo importante para predizer prognóstico do paciente, mas também não influenciou o padrão do infiltrado imune intratumoral nos CCR ($p=0,843$).

Apesar da pequena quantidade de casos com metástase linfonodal, quando comparados com aqueles pN0, não foi observado diferença entre eles e a razão $CD4^+/CD8^+$ ($p=0,811$).

Quanto ao estadiamento patológico, a maioria dos casos estudados eram estadio I. Assim como os outros parâmetros, exibiram o mesmo padrão de distribuição de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ ($p=0,569$).

Tabela 1 - Relação entre os achados da razão CD4⁺/CD8⁺ e parâmetros anátomo-clínicos.

Variável	Quantificação linfocitária	Razão CD4 ⁺ /CD8 ⁺ - Mediana		Total	p
		<0,474	>0,474		
Sexo					0,108
Masculino	N	34	26	60	
	%	66,7%	51,0%	58,8%	
Feminino	N	17	25	42	
	%	33,3%	49,0%	41,2%	
Metástase sincrônica					0,750
Não Metastático	N	46	45	91	
	%	90,2%	88,2%	89,2%	
Metastático	N	5	6	11	
	%	9,8%	11,8%	10,8%	
Tamanho					0,215
0 - 4	N	22	22	44	
	%	43,1%	44,0%	43,6%	
4 - 7	N	19	11	30	
	%	37,3%	22,0%	29,7%	
7 - 10	N	5	11	16	
	%	9,8%	22,0%	15,8%	
> 10	N	5	6	11	
	%	9,8%	12,0%	10,9%	
Invasão microvascular					0,695
Não	N	47	48	95	
	%	92,2%	94,1%	93,1%	
Sim	N	4	3	7	
	%	7,8%	5,9%	6,0%	
Necrose					0,482
Não	N	22	26	48	
	%	44,0%	51,0%	47,5%	
Sim	N	28	25	53	
	%	56,0%	49,0%	52,5%	
ISUP					0,843
Baixo grau	N	25	24	49	
	%	49,0%	47,1%	48,0%	
Alto grau	N	26	27	53	
	%	51,0%	52,9%	52,0%	
Estadiamento Patológico					0,569
I	N	36	30	66	
	%	72,0%	61,2%	66,7%	
II	N	2	5	7	
	%	4,0%	10,2%	7,1%	
III	N	9	10	19	
	%	18,0%	20,4%	19,2%	
IV	N	3	4	7	
	%	6,0%	8,2%	7,1%	
Estadiamento linfonodal					0,811
pN0	N	7	10	17	
	%	87,5%	90,9%	89,5%	
pN+	N	1	1	2	
	%	2,5%	9,1%	10,5%	

N: contagem; %: porcentagem dentro da razão CD4⁺/CD8⁺ - Mediana.

4.2 ANÁLISE DE SOBREVIDA CD4/CD8

4.2.1 Sobrevida global

Durante o seguimento, ocorreram 12 óbitos (4 dentre os casos com mediana da relação CD4/CD8 menor que 0,474 e 8 dentre aqueles com mediana da relação maior que 0,474). A SG em 50 meses foi de 92% nos casos com mediana da relação CD4/CD8 menor que 0,474 e 84% dentre aqueles com mediana da relação maior que 0,474 conforme ilustrado na Figura 2.

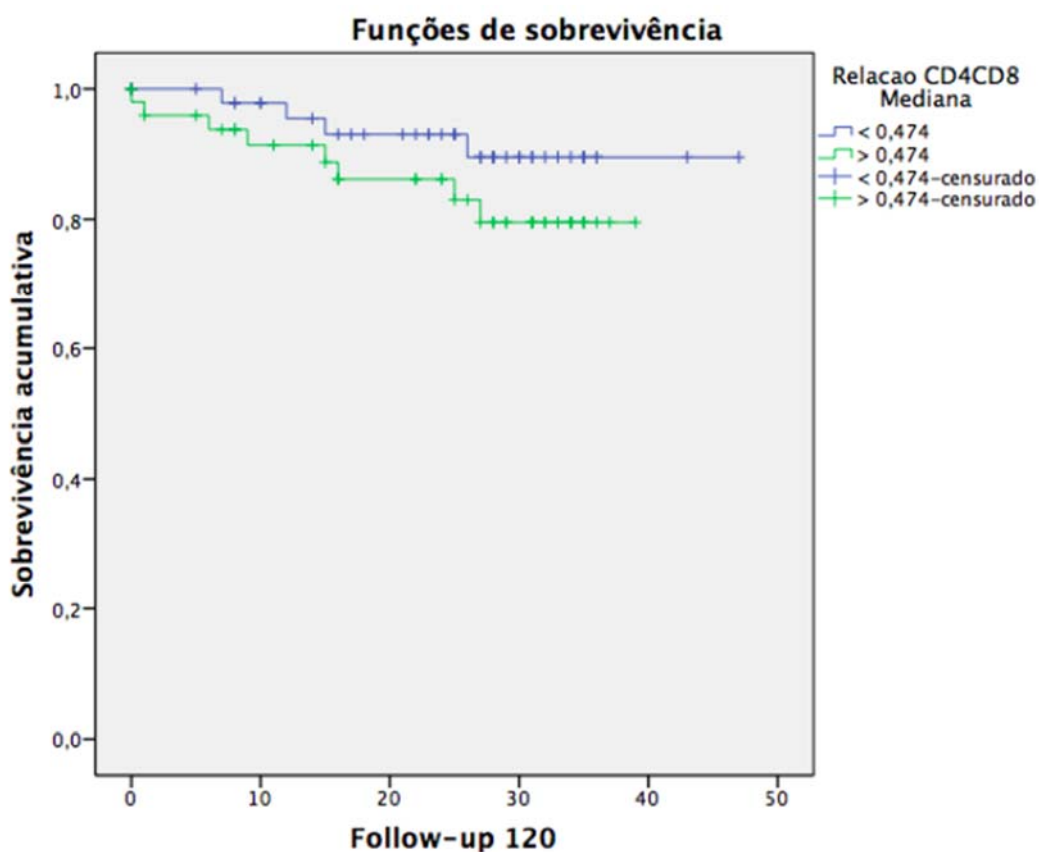


Figura 6 - Curva de sobrevida global em 50 meses para os 103 pacientes portadores de CCR estratificados em mediana da relação CD4/CD8 < 0,474 e mediana da relação CD4/CD8 > 0,474 (LogRank p=0,201).

4.2.2 Sobrevida câncer específica

Durante o seguimento, ocorreram 10 óbitos (2 dentre os casos com mediana da relação CD4/CD8 menor que 0,474 e 8 dentre aqueles com mediana da relação maior que 0,474). A SCE em 50 meses foi de 96% nos casos com mediana da relação CD4/CD8 menor que 0,474 e 84% dentre aqueles com mediana da relação maior que 0,474 conforme ilustrado na Figura 3.

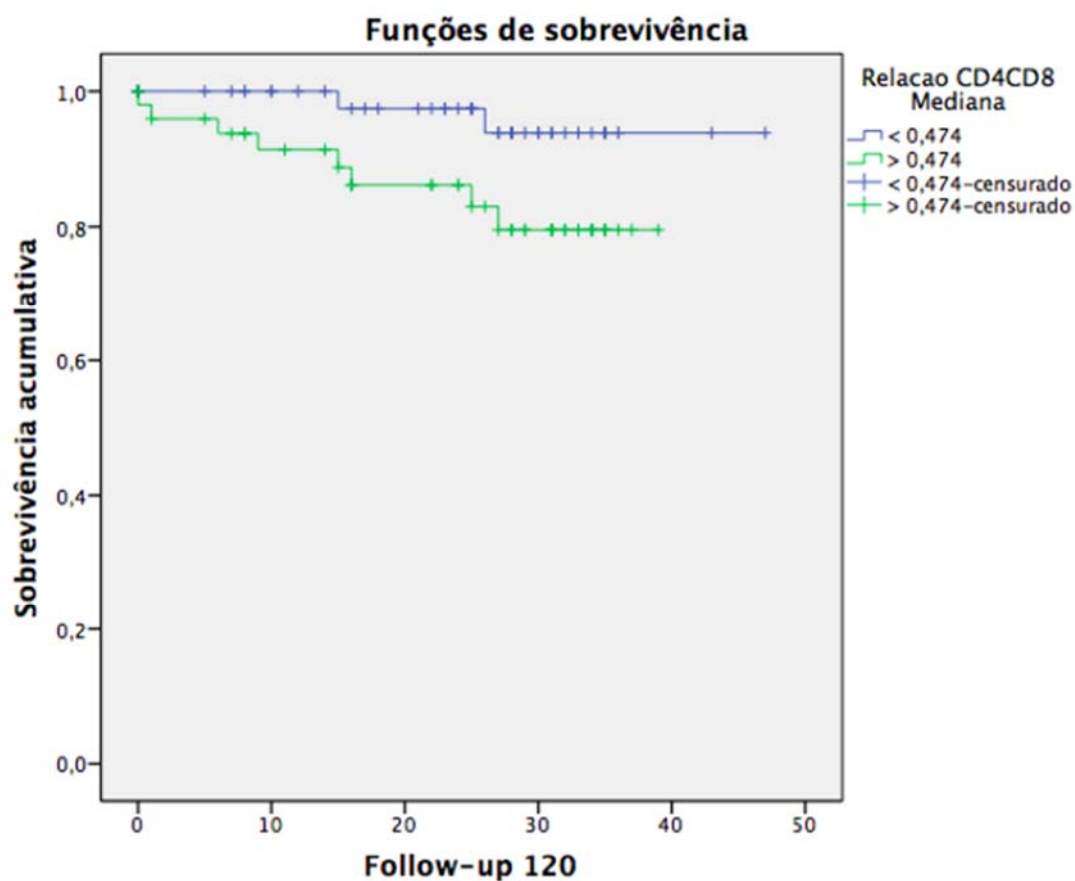


Figura 7 - Curva de sobrevida câncer-específica em 50 meses para os 103 pacientes portadores de CCR estratificados em mediana da relação CD4/CD8 < 0,474 e mediana da relação CD4/CD8 > 0,474 (LogRank $p=0,045$).

4.2.3 Sobrevida livre de doença

Durante o seguimento, ocorreram 15 óbitos e/ou recidivas (6 dentre os casos com mediana da relação CD4/CD8 menor que 0,474 e 9 dentre aqueles com mediana da relação maior que 0,474). A SLD em 50 meses foi de 88% nos casos com mediana da relação CD4/CD8 menor que 0,474 e 82% dentre aqueles com mediana da relação maior que 0,474 conforme ilustrado na Figura 4.

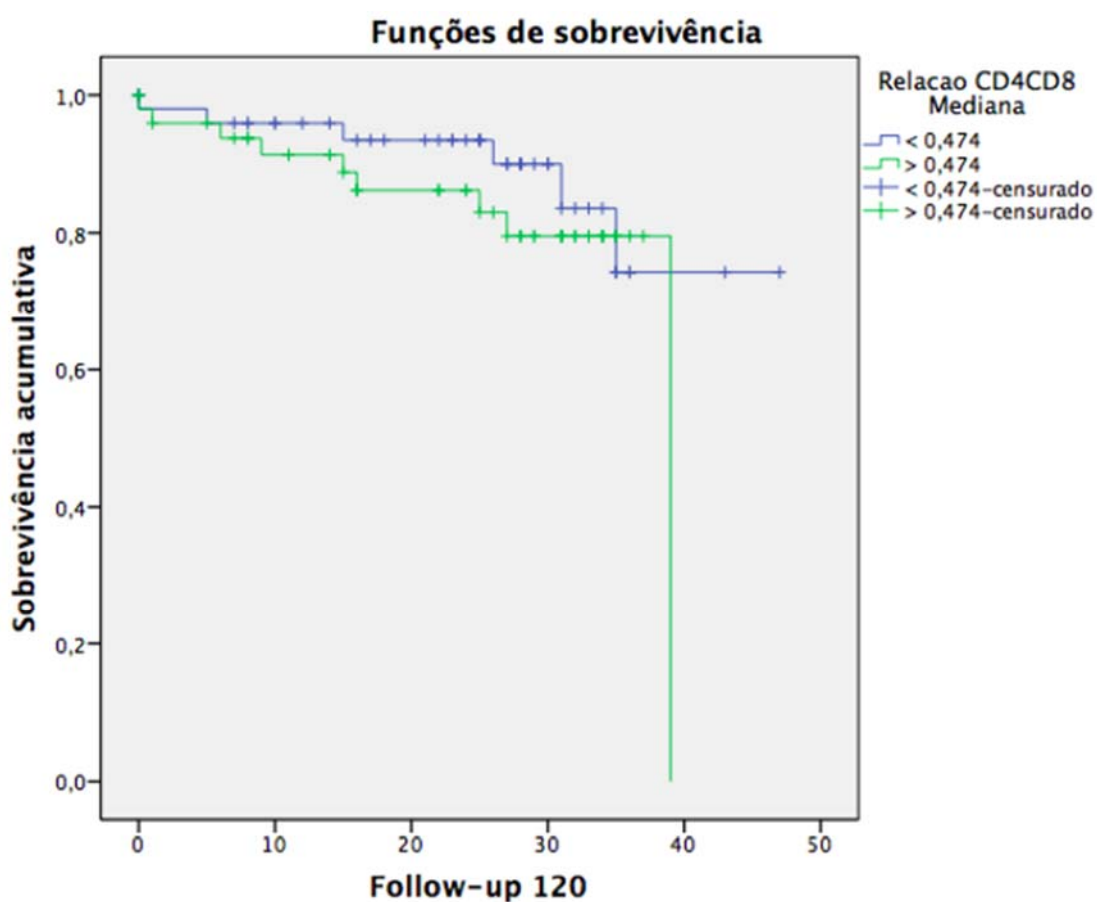


Figura 8 - Curva de sobrevida livre de doença em 50 meses para os 103 pacientes portadores de CCR estratificados em mediana da relação CD4/CD8 <0,474 e mediana da relação CD4/CD8 >0,474 (LogRank $p=0,327$).

4.3 FOXP3

A relação entre a mediana de linfócitos FOXP3⁺ e os parâmetros clínicos podem ser vistos na Tabela 2.

Ao relacionar a mediana de linfócitos positivos para FOXP3 com o sexo, não se observou diferença estatística ($p=0,432$).

Quanto a presença de metástases, apesar da diferença na quantidade de casos acima e abaixo da mediana, a porcentagem destes não demonstrou diferença estatística ($p=0,557$).

Ao estudar a relação do tamanho com a mediana de linfócitos positivos para FOXP3, semelhante aos outros parâmetros, não observamos diferença estatística ($p=0,657$).

Ao analisar a presença de invasão microvascular, obtivemos resultados semelhantes à presença de metástases, uma diferença significativa na quantidade de casos, mas sem diferença estatística ($p=0,891$).

Quanto a presença ou ausência de necrose, a mediana de linfócitos positivos para FOXP3 foi semelhante nas duas situações ($p=0,944$).

Nos casos com alto grau de ISUP (3 e 4), o percentual de linfócitos FOXP3⁺ foi levemente maior naqueles casos acima da mediana ($p=0,431$).

Ao estudar a relação do estadiamento com a mediana de linfócitos positivos para FOXP3, semelhante aos outros parâmetros, não observamos diferença estatística ($p=0,664$).

Ao relacionar a mediana de linfócitos positivos para FOXP3 com a presença ou ausência de metástase linfonodal, não se observou diferença estatística ($p=0,517$).

Tabela 2 - Relação entre a média de linfócitos FOXP3⁺ e parâmetros anátomo-clínicos.

Variável	Quantificação linfocitária	FOXP3		Total	p
		< Mediana	> Mediana		
Sexo					0,432
Masculino	N	52	9	61	
	%	57,8%	69,2%	59,2%	
Feminino	N	38	4	42	
	%	42,2%	30,8%	40,8%	
Metástase sincrônica					0,557
Não Metastático	N	81	11	92	
	%	90,0%	84,6%	89,3%	
Metastático	N	9	2	11	
	%	10,0%	15,4%	10,7%	
Tamanho					0,657
0 - 4	N	37	7	44	
	%	41,6%	53,8%	43,1%	
4 - 7	N	27	3	30	
	%	30,3	23,1%	29,4%	
7 - 10	N	16	1	17	
	%	18,0%	7,7%	16,7%	
> 10	N	9	2	11	
	%	10,1%	15,4%	10,8%	
Invasão microvascular					0,891
Não	N	84	12	96	
	%	93,3%	92,3%	93,2%	
Sim	N	6	1	7	
	%	6,7%	7,7%	6,8%	
Necrose					0,944
Não	N	42	6	48	
	%	47,2%	46,2%	47,1%	
Sim	N	47	7	54	
	%	52,8%	53,8%	52,9%	
ISUP					0,431
Baixo grau	N	45	4	49	
	%	50,0%	30,8%	47,6%	
Alto grau	N	45	9	54	
	%	50,0%	69,2%	52,4%	
Estadiamento Patológico					0,664
I	N	56	10	66	
	%	64,4%	76,9%	66,0%	
II	N	8	0	8	
	%	9,2%	0,0%	8,0%	
III	N	17	2	19	
	%	19,5%	15,4%	19,0%	
IV	N	6	1	7	
	%	6,9%	7,7%	7,0%	
Estadiamento linfonodal					0,517
pN0	N	14	3	17	
	%	87,5%	100,0%	89,5%	
pN+	N	2	0	2	
	%	12,5%	0,0%	10,5%	

N: contagem; %: porcentagem dentro da razão CD4⁺/CD8⁺ - Mediana.

4.4 ANÁLISE DE SOBREVIDA FOXP3

4.4.1 Sobrevida global

Durante o seguimento, ocorreram 12 óbitos (10 dentre os casos com quantidade de linfócitos FOXP3⁺ abaixo da mediana e 2 dentre aqueles com quantidade de linfócitos FOXP3⁺ acima da mediana). A SG em 50 meses foi de 88% nos casos com quantidade de linfócitos FOXP3⁺ abaixo da mediana e 84% dentre aqueles com quantidade de linfócitos FOXP3⁺ acima da mediana conforme ilustrado na Figura 5.

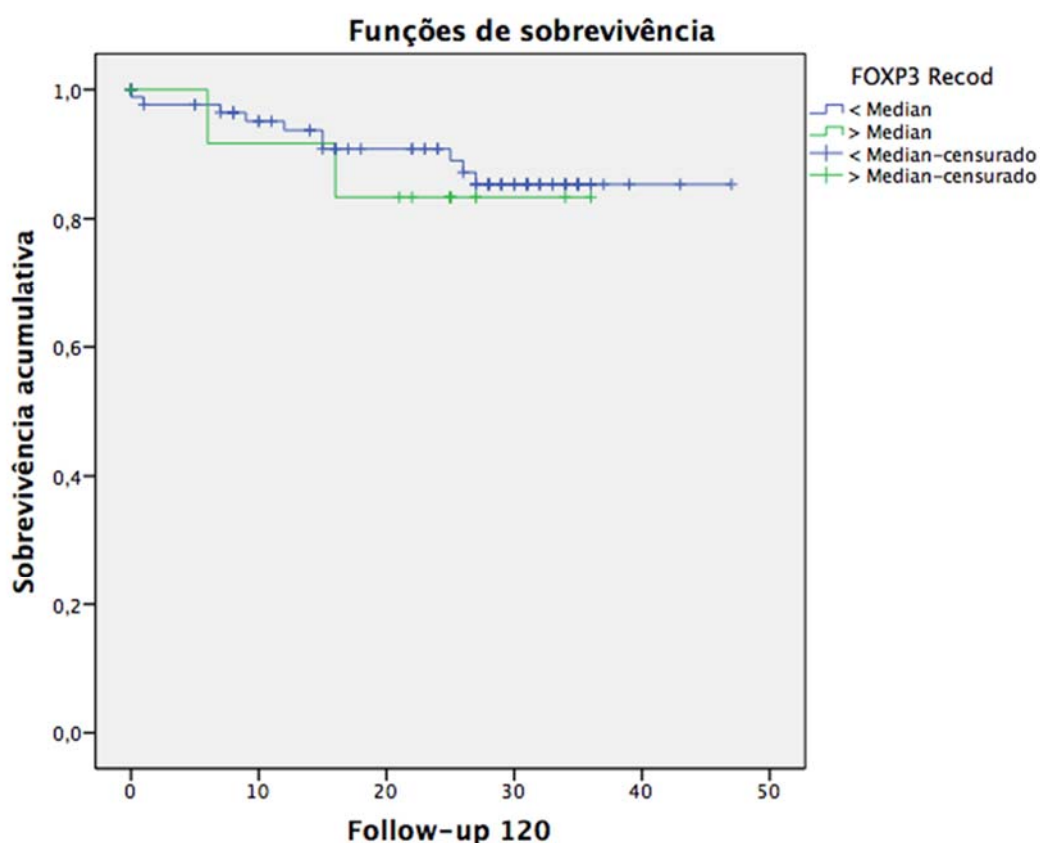


Figura 9 - Curva de sobrevida global em 50 meses para os 103 pacientes portadores de CCR estratificados em acima e abaixo da mediana de linfócitos FOXP3⁺ (LogRank p=0,671).

4.4.2 Sobrevida câncer específica

Durante o seguimento, ocorreram 10 óbitos (8 dentre os casos com quantidade de linfócitos FOXP3⁺ abaixo da mediana e 2 dentre aqueles com quantidade de linfócitos FOXP3⁺ acima da mediana). A SCE em 50 meses foi de 90% nos casos com quantidade de linfócitos FOXP3⁺ abaixo da mediana e 84% dentre aqueles com quantidade de linfócitos FOXP3⁺ acima da mediana conforme ilustrado na Figura 6.

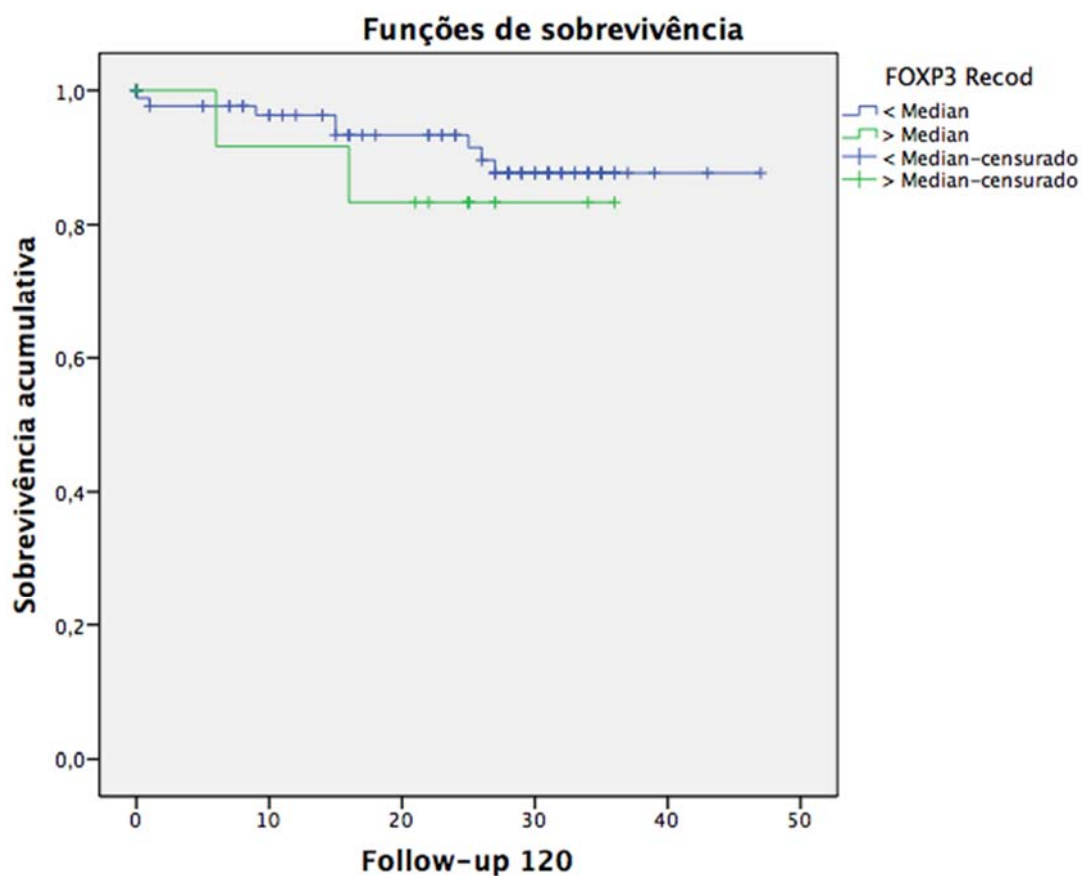


Figura 10 - Curva de sobrevida câncer-específica em 50 meses para os 103 pacientes portadores de CCR estratificados em acima e abaixo da mediana de linfócitos FOXP3⁺ (LogRank p=0,472).

4.4.3 Sobrevida livre de doença

Durante o seguimento, ocorreram 15 óbitos/recidivas (13 dentre os casos com quantidade de linfócitos FOXP3⁺ abaixo da mediana e 2 dentre aqueles com quantidade de linfócitos FOXP3⁺ acima da mediana). A SLD em 50 meses foi de 85% nos casos com quantidade de linfócitos FOXP3⁺ abaixo da mediana e 84% dentre aqueles com quantidade de linfócitos FOXP3⁺ acima da mediana conforme ilustrado na Figura 7.

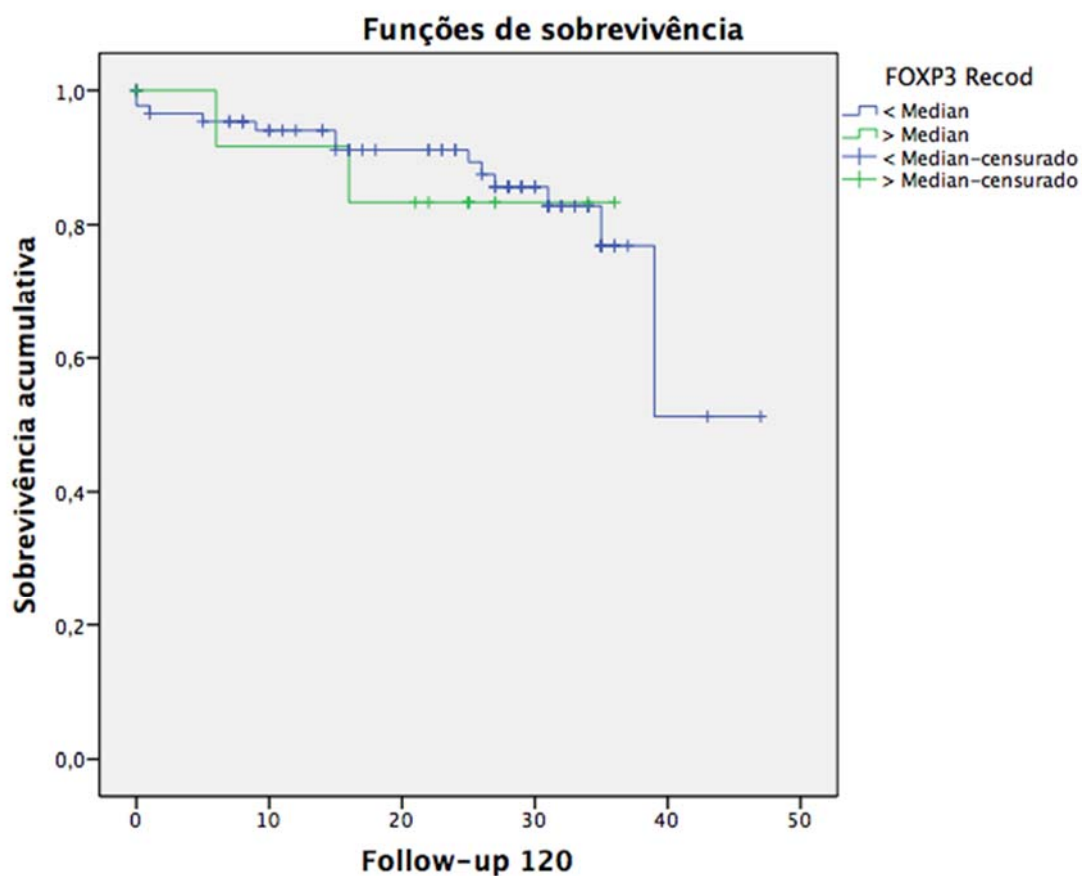


Figura 11 - Curva de sobrevida livre de doença em 50 meses para os 103 pacientes portadores de CCR estratificados em acima e abaixo da mediana de linfócitos FOXP3⁺ (LogRank p=0,762).

5 DISCUSSÃO

5.1 ASPECTOS GERAIS

Uma análise abrangente das interações entre três sistemas altamente complexos - as células tumorais, a resposta imune e o microambiente tecidual - com o objetivo de integrar o tumor a células imunes, aos microrganismos e ao microambiente com dados clínicos (incluindo, informações sobre histologia, evolução e histórico de tratamento), é necessária (FRIDMAN et al. 2012). Isto fornecerá uma imagem mais clara do contexto imunológico dos tumores humanos e também das interações dinâmicas das células tumorais com o sistema imunológico. A importância disso é ilustrada pelo fato de que, embora as densidades de células imunes sejam variáveis de tumor para tumor, todos os componentes das células imunes (células B, células NK, células T CD8⁺, células Th1, células Th2, células Treg, células TH17, células TFH, macrófagos e células dendríticas) são encontrados em densidades mais altas no tumor do que em tecidos não cancerosos. No entanto, as células imunes podem estar localizadas em diferentes partes do tumor. Uma alta densidade de células T de memória citotóxica e TH1, tanto no núcleo quanto na margem invasiva de um tumor é um forte fator prognóstico que prediz recidiva e maior sobrevida global. Um ambiente complexo de citocinas e quimiocinas também está presente no microambiente tumoral, permitindo a

infiltração de células imunes e potencial ativação em tumores adjacentes a ELT.

Estes dados não só lançam nova luz sobre a relação entre imunidade e câncer, mas também fornecem informações sobre o manejo de doenças malignas. De fato, o padrão de infiltração de células imunes permaneceu como o único critério significativo usado para prever sobrevida livre de doença e sobrevida global, além da classificação TNM (FRIDMAN et al. 2012). Juntamente com estudos em camundongos, a análise do microambiente imunológico humano oferece um novo paradigma pelo qual a resposta imune, pelo menos tanto quanto a classificação histopatológica de TNM, afeta o resultado clínico e a capacidade de guiar a terapêutica.

Os novos desenvolvimentos e a percepção dos mecanismos regulatórios do sistema imune ampliaram a compreensão dos mecanismos imunológicos e tornaram a imunoterapia novamente o foco do tratamento dos CCR metastáticos

5.2 RAZÃO DE LINFÓCITOS CD4⁺/CD8⁺

Neste trabalho, nenhuma das variáveis clínico-patológicas estudadas mostrou relação significativa com a razão da quantidade de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺.

Pacientes que apresentaram valores da relação CD4⁺/CD8⁺ abaixo da mediana tiveram menores taxas de sobrevida. Casos que apresentaram mediana da razão de linfócitos CD4⁺/CD8⁺ menor que 0,474 viveram cerca de 45 meses (intervalo de confiança; IC 95:43-47), enquanto aqueles que

apresentaram mediana maior que 0,474 viveram cerca de 33 meses (intervalo de confiança; IC 95:30-37).

Ao comparar nossos achados a outros estudos que avaliaram carcinomas renais vemos algumas similaridades.

BAINE et al. (2015) apresentaram resultados semelhantes e também demonstraram a falta de correlação entre grau nuclear, estágio tumoral e densidade de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. Já NAKANO et al. (2001) mostraram que abundante infiltração do tecido tumoral por linfócitos CD8⁺ e CD4⁺ esteve associada a sobrevida mais curta.

MENARD et al. em 2018 mostrou haver um maior aumento da densidade de células T duplamente positivas (CD4⁺ e CD8⁺) nos CCR quando comparado ao câncer de pulmão e colorretal. Além disso, relatou também que idade do paciente, estágio, grau e tamanho tumoral foram similares entre os pacientes que apresentaram ou não aumento da densidade de células T CD4⁺CD8⁺.

Comparando com outros tipos de tumores, vemos que a relação CD4⁺/CD8⁺ ainda apresenta resultados controversos e requer um melhor entendimento. Estudos abordando câncer ovariano e colorretal encontraram que o aumento da razão de linfócitos CD8⁺/CD4⁺ resulta em melhora da sobrevida (SATO et al. 2005; MENARD et al. 2018). Neste caso, apesar de estudar os mesmos subtipos linfocitários, a razão utilizada foi inversa da analisada neste estudo.

Em câncer de mama triplo negativo, trabalhos semelhantes que estudaram a relação CD4⁺/CD8⁺ mostrou que na interface tumor-hospedeiro,

esta relação foi significativamente associada tanto à sobrevida livre de recidiva quanto à sobrevida global (SATO et al. 2005). No Carcinoma pulmonar não-pequenas células a baixa razão $CD4^+/CD8^+$ prediz melhor prognóstico (SATO et al. 2005). Em câncer de colo uterino, um baixa razão $CD8^+/CD4^+$ mostra pior prognóstico (JORDANOVA et al. 2008).

REMARK et al. em 2013 comparou carcinoma colorretal e CCR e afirmou que elevadas densidades de linfócitos $CD8^+$ foram correlacionadas a tempo de sobrevida maior em carcinoma colorretal e tempo de sobrevida menor em CCR.

De acordo com ZINGG et al. (2010), a razão de linfócitos $CD8^+/FoxP3^+$ não é um fator preditivo de sobrevida para câncer de esôfago.

Outros estudos envolvendo carcinomas ovarianos, carcinomas colorretais, carcinomas pulmonares não-pequenas células, carcinomas mamários, adenocarcinomas pancreáticos, carcinomas uroteliais e hepatocarcinomas mostraram que a alta quantidade de infiltrado linfocitário tumoral $CD4^+$ e/ou $CD8^+$ esteve relacionada a melhor prognóstico (NAITO et al. 1998; ZHANG et al. 2003; FUKUNAGA et al. 2004; SHARMA et al. 2007; AL-SHIBLI et al. 2008; MAHMOUD et al. 2011; FOERSTER et al. 2018).

5.3 LINFÓCITOS FOXP3⁺

Neste trabalho, nenhuma das variáveis clínico-patológicas estudadas mostrou relação significativa com a quantidade de linfócitos FOXP3 positivos. Já outros autores puderam demonstrar algo diferente.

IIDA et al. (2019) estudaram 87 pacientes e viram que altas contagens de infiltrado linfocitário FOXP3⁺ estavam relacionadas a fatores independentes de mau prognóstico, metástase e recorrência local após nefrectomia radical ($p = 0,006$).

Da mesma forma, NAKAYAMA et al. (2017) mostraram que a infiltração por células T regulatórias no tumor estava associada a pior prognóstico em 111 pacientes com ccCCR. KANG et al. em 2013 demonstraram resultado semelhante onde a infiltração intratumoral de linfócitos FOXP3 positivos se correlacionou com metástase à distância e pior sobrevida global em CCRcc após estudar 199 casos.

Em tumores de outros sítios, encontramos resultados diversos. LI et al. em 2017 relataram que a expressão nuclear aumentada de FOXP3 se correlacionou com melhor prognóstico no carcinoma ductal invasivo da mama após estudar 123 casos.

Por outro lado, PENG et al. (2016) que também estudaram câncer de mama, adversos.

SPECTOR et al. (2019) estudaram 464 casos de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e viram que o aumento dos níveis de linfócitos FOXP3⁺ estavam associados a melhora na sobrevida.

NEVES FILHO et al. em 2018 estudou 54 casos de tumores gástricos e viu que a alta expressão de FOXP3 foi associada a tumores pouco diferenciados ($p = 0,03$) e à presença de infiltração vascular ($p = 0,04$).

LEE et al. (2018) também estudou câncer gástrico em 2018 e viu que a alta expressão de células T FOXP3⁺ foi correlacionada com pior sobrevida global.

Em câncer colorretal, um estudo com 168 pacientes de FENG et al. (2019) concluiu que pacientes com alto infiltrado linfocitário tumoral FOXP3⁺ tiveram significativamente melhor sobrevida livre de recidiva e sobrevida global.

De acordo com YANG et al. (2017) linfócitos FOXP3⁺ podem agir na indução do crescimento tumoral e metástase em tumor de pulmão não pequenas células.

LI et al. estudou tumores ovarianos em 2016 e encontrou que a presença de linfócitos FOXP3⁺ não teve impacto na sobrevida global e SCE (HR = 0,98).

Como pudemos observar, em carcinomas de células renais, a relação da quantidade de infiltrado inflamatório CD4⁺, CD8⁺ e/ou FOXP3⁺ parece ter pouca ou nenhuma correlação com dados clínico-patológicos, assim como prognóstico. Isso pode ser devido ao fato da maior parte dos casos deste estudo corresponder a CCR localizado, enquanto a imunoterapia aplica-se principalmente a doença renal avançada.

Além disso, uma falha no nosso estudo foi ter avaliado a quantidade de linfócitos apenas intra-tumoral, devido a técnica utilizada em TMA. No corte

inteiro a quantidade de linfócitos estudada é maior e possivelmente mais fidedigna. Também no corte inteiro é possível estudar a população linfocitária do fronte de invasão, onde há uma maior concentração de linfócitos T citotóxicos, um dos responsáveis pela destruição das células tumorais. Logo, estudos com corte inteiro da interface tumor/tecido não tumoral podem trazer dados distintos.

Uma melhor compreensão da natureza constitutiva e da especificidade das respostas de células T CD8⁺ CD4⁺ e FOXP3 em pacientes com CCR são necessárias e provavelmente fornecerão informações para projetar, implementar e monitorar tratamentos mais eficazes.

6 CONCLUSÕES

A razão de linfócitos $CD4^+/CD8^+$ apresentou impacto na sobrevida câncer específica (SCE) ($p=0,045$), sendo pacientes com valores de relação $CD4^+/CD8^+$ abaixo da mediana aqueles que tiveram menores taxas de sobrevida.

Não houve associação entre a quantidade intratumoral de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ e parâmetros clínico-patológicos.

A quantidade de linfócitos intratumorais $FOXP3^+$ não apresentou impacto nas taxas de sobrevida estudadas.

Semelhante ao $CD4$ e $CD8$, não houve associação entre a quantidade de linfócitos $FOXP3^+$ intratumorais e parâmetros clínico-patológicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Shibli KI, Donnem T, Al-Saad S, Persson M, Bremnes RM, Busund LT. Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res** 2008; 14:5220-7.

Baine MK, Turcu G, Zito CR, et al. Characterization of tumor infiltrating lymphocytes in paired primary and metastatic renal cell carcinoma specimens. **Oncotarget** 2015; 6:24990-5002.

Battegay M, Moskophidis D, Rahemtulla A, Hengartner H, Mak TW, Zinkernagel RM. Enhanced establishment of a virus carrier state in adult CD4⁺ T-cell-deficient mice. **J Virol** 1994; 68:4700-4.

Beck-Engeser GB, Monach PA, Mumberg D, et al. Point Mutation in Essential Genes with Loss or Mutation of the Second Allele. **J Exp Med** 2002; 194:285-300.

Bihr S, Ohashi R, Moore AL, et al. Expression and Mutation Patterns of PBRM1, BAP1 and SETD2 Mirror Specific Evolutionary Subtypes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. **Neoplasia** 2019; 21:247-256.

Bozic I, Reiter JG, Allen B, et al. Evolutionary dynamics of cancer in response to targeted combination therapy. **Elife** 2013; 2:1-15.

Cheever MA, Thompson DB, Klarnet JP, Greenberg PD. Antigen-driven long term-cultured T cells proliferate in vivo, distribute widely, mediate specific tumor therapy, and persist long-term as functional memory T cells. **J Exp Med** 1986; 163:1100-12.

Costa WH, Jabboure G Netto, Cunha IW. Urological cancer related to familial syndromes. **Int Braz J Urol** 2017; 43:192-201.

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **Nat Med** 2004; 10:942-9.

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

Daniel D, Meyer-Morse N, Bergsland EK, Dehne K, Coussens LM, Hanahan D. Immune enhancement of skin carcinogenesis by CD4 + T cells. **J Exp Med** 2003; 197:1017-28.

de Cássio Zequi S, da Costa WH, Korkes F, et al. Renal cell cancer treatment: an expert panel recommendation from the Latin American cooperative group-genitourinary and the Latin American renal cancer group: focus on surgery. **Ther Adv Urol** 2019; 11:1756287219872324.

Decker WK, Safdar A. Bioimmunoadjuvants for the treatment of neoplastic and infectious disease: Coley's legacy revisited. **Cytokine Growth Factor Rev** 2009; 20:271-81.

Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of Cd4 + Cd25 + T cells with regulatory properties from human blood. **J Exp Med** 2002; 193:1303-10.

Disis ML. Immune regulation of cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28:4531-8.

Dudley ME. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. **Science** 2002; 298:850-4.

Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:666-75.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat Immunol** 2002; 3:991-8.

El Dib R, Touma NJ, Kapoor A. Cryoablation vs radiofrequency ablation for the treatment of renal cell carcinoma: a meta-analysis of case series studies. **BJU Int** 2012; 110:510-6.

Escudier B, Porta C, Schmidinger M, et al. Renal cell carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol** 2016; 27:v58-v68.

Feng Y, Li Y, Cai S, Peng J. <p>Immunological nomograms predicting prognosis and guiding adjuvant chemotherapy in stage II colorectal cancer</p>. **Cancer Manag Res** 2019; 11:7279-94.

Figlin R, Sternberg C, Wood CG. Novel agents and approaches for advanced renal cell carcinoma. **J Urol** 2012; 188:707-15.

Finn OJ. Human tumor immunology at the molecular divide. **J Immunol** 2007; 178:2615-6.

Foerster F, Hess M, Gerhold-Ay A, et al. The immune contexture of hepatocellular carcinoma predicts clinical outcome. **Sci Rep** 2018; 8:1-11.

Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nat Rev Cancer** 2012; 12:298-306.

Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, et al. CD8 + Tumor-Infiltrating Lymphocytes Together with CD4 + tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. **Pancreas** 2004; 28:e26-31.

Giaccia A, Kurban G, Pause A, Frydman J. State-of-the-science : an update on renal cell carcinoma. **Mol Cancer Res** 2012; 10:859-80.

Giatromanolaki A, Banham AH, Harris AL, Koukourakis MI. FOXP3 infiltrating lymphocyte density and PD-L1 expression in operable non-small cell lung carcinoma. **Exp Lung Res** 2019; 45:76-83.

Gooden MJM, De Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: A systematic review with meta-analysis. **Br J Cancer** 2011; 105:93-103.

Grabiner BC, Nardi V, Birsoy K, et al. A diverse array of cancer-associated MTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity. **Cancer Discov** 2014; 4:554-63.

Haas NB, Nathanson KL. Hereditary kidney cancer syndromes. **Adv Chronic Kidney Dis** 2014; 21:81-90.

Hakimi AA, Ostrovnaya I, Reva B, et al. Adverse outcomes in clear cell renal cell carcinoma with mutations of 3p21 epigenetic regulators BAP1 and SETD2: A report by MSKCC and the KIRC TCGA research network. **Clin Cancer Res** 2013; 19:3259-67.

Hakimi AA, Reznik E, Lee CH, et al. An integrated metabolic atlas of clear cell renal cell carcinoma. **Cancer Cell** 2016; 29:104-16.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-74.

Hsieh JJ, Manley BJ, Khan N, Gao JJ, Carlo MI, Cheng EH. Overcome tumor heterogeneity-imposed therapeutic barriers through convergent genomic biomarker discovery: A braided cancer river model of kidney cancer. **Semin Cell Dev Biol** 2017a; 64:98-106.

Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, et al. Renal cell carcinoma. **Nat Rev Dis Prim** 2017b; 3:17009.

Iida K, Miyake M, Onishi K, et al. Prognostic impact of tumor-infiltrating CD276/foxp3-positive lymphocytes and associated circulating cytokines in patients undergoing radical nephrectomy for localized renal cell carcinoma. **Oncol Lett** 2019; 17:4004-10.

Jordanova ES, Gorter A, Ayachi O, et al. Human leukocyte antigen class I, MHC class I chain-related molecule A, and CD8+/regulatory T-cell ratio: Which variable determines survival of cervical cancer patients? **Clin Cancer Res** 2008; 14:2028-35.

Kang MJ, Kim KM, Bae JS, et al. Tumor-infiltrating PD1-positive lymphocytes and FoxP3-positive regulatory T cells predict distant metastatic relapse and survival of clear cell renal cell carcinoma. **Transl Oncol** 2013; 6:282-9.

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

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

Karami S, Schwartz K, Purdue MP, et al. Family history of cancer and renal cell cancer risk in caucasians and African Americans. **Br J Cancer** 2010; 102:1676-80.

Kim DH, Nagano Y, Choi I, White JA, Yao JC, Rashid A. these alterations are tumor site-dependent and are different than in PETs. **Cancer** 2008; 92:84-92.

Knuth A, Danowski B, Oettgen HF, Old LJ. T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures. **Proc Natl Acad Sci USA** 1984; 81:3511-5.

Kresge CT, Leonowicz ME, Roth WJ, Vartuli JC, Beck JS. Identification of a CD4 binding site on the β 2 domain of HLA-DR molecules. **Nature** 1992; 359:710-3.

Kwiatkowski DJ, Choueiri TK, Fay AP, et al. Mutations in TSC1, TSC2, and MTOR are associated with response to rapalogs in patients with metastatic renal cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2016; 22:2445-52.

Lee CH, Hötter AM, Voss MH, et al. Bevacizumab monotherapy as salvage therapy for advanced clear cell renal cell carcinoma pretreated with targeted Drugs. **Clin Genitourin Cancer** 2016; 14:56-62.

Lee JS, Won HS, Sun DS, Hong JH, Ko YH. Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer A systematic review and meta-analysis. **Medicine (Baltimore)** 2018; 97:e11769.

Li J, Zhang X, Zheng L, Liu Y. Association of nuclear FOXP3 expression with low Ki67 index and better prognosis in patients with breast invasive ductal carcinoma. **Neoplasma** 2016; 64:754-61.

Li J, Wang J, Chen R, Bai Y, Lu X. The prognostic value of tumor-infiltrating T lymphocytes in ovarian cancer. **Oncotarget** 2017; 8:15621-31.

Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, et al. EAU Guidelines on renal cell carcinoma: 2014 Update. **Eur Urol** 2015; 67:913-24.

Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. **Nat Rev Immunol** 2017; 17:703-17.

Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. **J Clin Oncol** 2011; 29:1949-55.

Menard LC, Fischer P, Kakrecha B, et al. Renal cell carcinoma (RCC) tumors display large expansion of double positive (DP) CD4+CD8+ T cells with expression of exhaustion markers. **Front Immunol** 2018; 9:2728.

Meskawi M, Sun M, Trinh QD, et al. A review of integrated staging systems for renal cell carcinoma. **Eur Urol** 2012; 62:303-14.

Milstein C. The hybridoma revolution: an offshoot of basic research. **Bioessays** 1999; 21:966-73.

Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE. **WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs**. 2016. p.135-83. (WHO Classification of Tumours, Volume 8, IARC WHO Classification of Tumours, nº 8).

Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary bacillus calmette-guerin in the treatment of superficial bladder tumors. **J Urol** 2017; 197:S142-S5.

Morettin PA, Bussab WO. **Estatística básica**. 6ª ed. São Paulo: Saraiva; 2010.

Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. **Science** 1976; 193:1007-8.

Mukherji B, Guha A, Chakraborty NG, et al. Clonal analysis of cytotoxic and regulatory T cell responses against human melanoma. **J Exp Med** 1989; 169:1961-76.

Mumberg D, Monach PA, Wanderling S, et al. CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. **Proc Natl Acad Sci** 2002; 96:8633-8.

Naito Y, Saito K, Shiiba K, et al. Advances in brief CD8 + T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. **Cancer Res** 1998; 58:3491-4.

Nakano O, Sato M, Naito Y, et al. Proliferative activity of intratumoral CD8+T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. **Cancer Res** 2001; 61:5132-6.

Nakayama T, Saito K, Waseda Y, et al. Mp39-12 higher serum C-reactive protein level represents the immunosuppressive tumor microenvironment in patients with clear cell renal cell carcinoma. **J Urol** 2017; 197:e497-e8.

Neves Filho EHC, Pires APB, De Sant'Ana RO, Rabenhorst SHB, Hirth CG, Da Cunha MDPSS. The association among HER2, MET and FOXP3 expression and tumor regression grading in gastric adenocarcinoma. **APMIS** 2018; 126:389-95.

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

Peng G, Li L, Guo Y, et al. CD8+ cytotoxic and FoxP3+ regulatory T lymphocytes serve as prognostic factors in breast cancer. **Am J Transl Res** 2019; 11:5039-53.

Petejova N, Martinek A. Renal cell carcinoma: review of etiology, pathophysiology and risk factors. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub** 2016; 160:183-94.

Pierorazio PM, Johnson MH, Ball MW, et al. Five-year analysis of a multi-institutional prospective clinical trial of delayed intervention and surveillance for small renal masses: The DISSRM Registry. **Eur Urol** 2015; 68:408-15.

Plitas G, Rudensky AY. Regulatory T cells: differentiation and function. **Cancer Immunol Res** 2016; 4:721-5.

Potter TA, Rajan TV, Dick RF, Bluestone JA. Substitution at residue 227 of H-2 class I molecules abrogates recognition by CD8-dependent, but not CD8-independent, cytotoxic T lymphocytes. **Nature** 1989; 337:73-5.

Rashid T, Young-Pierce JL, Garrett-Mayer E, Graybill W, Neal S, Spruill LS. CD8, FoxP3, and CD45RO+ lymphocytic infiltrates in type I and type II Endometrial Cancers in African American and European American Females. **Int J Gynecol Pathol** 2017; 36:540-9.

Remark R, Alifano M, Cremer I, et al. Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. **Clin Cancer Res** 2013; 19:4079-91.

Reuter VE, Tickoo SK. Differential diagnosis of renal tumours with clear cell histology. **Pathology** 2010; 42:374-83.

Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. **N Engl J Med** 1985; 313:1485-92.

Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. **Nature** 2001; 411:380-384.

Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. **Nat Med** 2004; 10:909-15.

Rudnicka D, Oszmiana A, Finch DK, et al. Rituximab causes a polarization of B cells that augments its therapeutic function in NK-cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. **Blood** 2013; 121:4694-702.

Sadahiro S, Suzuki T, Tanaka A, et al. Induction of CD3+ and FoxP3+ T cells in left-sided colorectal tumors after UFT/LV chemotherapy. **Anticancer Res** 2019; 39:1997-2005.

Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: Possible involvement of regulatory T cells in disease progression. **Cancer** 2003; 98:1089-99.

Sato E, Olson SH, Ahn J, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. **Proc Natl Acad Sci** 2005; 102:18538-43.

Scelo G, Larose TL. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. **J Clin Oncol** 2018; 36:3574-81.

Sharma P, Shen Y, Wen S, et al. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. **Proc Natl Acad Sci** 2007; 104:3967-72.

Siegel CT, Schreiber K, Meredith SC, et al. Enhanced growth of primary tumors in cancer-prone mice after immunization against the mutant region of an inherited oncoprotein. **J Exp Med** 2000; 191:1945-56.

Spector ME, Bellile E, Amlani L, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in head and neck squamous cell carcinoma. **JAMA Otolaryngol Head Neck Surg** 2019 Sep 5. [Epub ahead of print]

Spellman CW, Daynes RA. Ultraviolet light, tumors, and suppressor T cells. **Hum Pathol** 1981; 12:299-301.

Sutmoller RPM, Van Duivenvoorde LM, Van Elsas A, et al. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25 + regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses . **J Exp Med** 2002; 194:823-32.

Tatsumi T, Herrem CJ, Olson WC, et al. Disease stage variation in CD4+ and CD8+ T-cell reactivity to the receptor tyrosine kinase EphA2 in patients with renal cell carcinoma. **Cancer Res** 2003; 63:4481-9.

Tawara I, Take Y, Uenaka A, Noguchi Y, Nakayama E. Sequential involvement of two distinct CD4+regulatory T cells during the course of transplantable tumor growth and protection from 3-methylcholanthrene-induced tumorigenesis by CD25-depletion. **Japanese J Cancer Res** 2002; 93:911-6.

van den Berg E. Renal cell carcinoma. In: Maloy S, Hughes K, editors. **Brenner's encyclopedia of genetics**. 2nd ed. New York: Elsevier; 2013. p.130-2.

van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. **J Immunol** 2007; 178:2617-21.

Vassallo J, Rodrigues AFF, Campos AHJFM, et al. Pathologic and imunohistochemical characterization of tumoral inflammatory cell infiltrate in invasive penile squamous cell carcinomas: Fox-P3 expression is an independent predictor of recurrence. **Tumor Biol** 2015; 36:2509-16.

Voss MH, Hakimi AA, Pham CG, et al. Tumor genetic analyses of patients with metastatic renal cell carcinoma and extended benefit from mTOR inhibitor therapy. **Clin Cancer Res** 2014; 20:1955-64.

Wang HY, Lee DA, Peng G, et al. Tumor-Specific Human CD4 + Regulatory T Cells and Their Ligands: Implications for Immunotherapy. **Immunity** 2004; 20:107-18.

Ward PL, Koeppen HK, Hurteau T, Rowley DA, Schreiber H. Major Histocompatibility Complex Class I and Unique Antigen Expression by Murine Tumors That Escaped from CD8+ T-Cell-dependent Surveillance. **Cancer Res** 1990; 50:3851-8.

Wick M, Dubey P, Koeppen H, et al. Antigenic cancer cells grow progressively in immune hosts without evidence for t cell exhaustion or systemic anergy. **J Exp Med** 2002; 186:229-38.

Wilke CM, Wu K, Zhao E, Wang G, Zou W. Prognostic significance of regulatory T cells in tumor. **Int J Cancer** 2010; 127:748-58.

Wolff I, May M, Hoschke B, et al. Do we need new high-risk criteria for surgically treated renal cancer patients to improve the outcome of future clinical trials in the adjuvant setting? Results of a comprehensive analysis based on the multicenter CORONA database. **Eur J Surg Oncol** 2016; 42:744-50.

Woo EY, Yeh H, Chu CS, et al. Cutting Edge: regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. **J Immunol** 2014; 168:4272-6.

Xu J, Pham CG, Albanese SK, et al. Mechanistically distinct cancer-associated mTOR activation clusters predict sensitivity to rapamycin. **J Clin Invest** 2016; 126:3526-40.

Yang S, Liu Y, Li MY, et al. FOXP3 promotes tumor growth and metastasis by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway and EMT in non-small cell lung cancer. **Mol Cancer** 2017; 16:124.

Yu P, Spiotto MT, Lee Y, Schreiber H, Fu Y-X. Complementary role of CD4 + T cells and secondary lymphoid tissues for cross-presentation of tumor antigen to CD8 + T cells. **J Exp Med** 2003; 197:985-95.

Yu P, Lee Y, Liu W, et al. Intratumor depletion of CD4 + cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. **J Exp Med** 2005; 201:779-91.

Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: Friends or foes? **Lab Invest** 2006; 86:231-45.

Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. **N Engl J Med** 2003; 348:203-13.

Zhang L, Wang XI, Ding J, Sun Q, Zhang S. The predictive and prognostic value of Foxp3+/CD25+ regulatory T cells and PD-L1 expression in triple negative breast cancer. **Ann Diagn Pathol** 2019; 40:143-51.

Zhang Q, Jia Q, Deng T, Song B, Li L. Heterogeneous expansion of CD4+ tumor-infiltrating T-lymphocytes in clear cell renal cell carcinomas. **Biochem Biophys Res Commun** 2015; 458:70-6.

Zingg U, Montani M, Frey DM, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and survival in patients with adenocarcinoma of the oesophagus. **Eur J Surg Oncol** 2010; 36:670-7.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



A.C. Camargo Cancer Center

Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

**COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEI**

São Paulo, 19 de junho de 2019.

Ao

Dr. Stênio de Cássio Zequi

Aluna: Tercia Jovino Neves Santos (Doutorado)

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2144/15E

"Expressão de FOXP3 e resposta inflamatória em carcinomas de células renais de células claras."

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **18/06/2019, tomaram conhecimento e aprovaram** o seguinte documento:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático "Expressão imunoistoquímica e valor prognóstico de um painel de marcadores (BAP1; Beta-Catenina; CD133; Complexo Ezrina-Moesina; EPO/EPO-R; FOXP3; KDM5C; NOS-3; PBRM1; PTEN; REN/REN-R; SETD2 e STAT3) em carcinoma de células renais.", registrado neste CEP sob nº. 2144/15. O projeto afiliado em referência será Doutorado da aluna Tercia Jovino Neves Santos, sob orientação da Dra. Isabela Werneck da Cunha.

Atenciosamente,

Dra. Sandra Caíres Serrano

1ª. Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1