

ESTUDO DO VALOR PROGNÓSTICO E DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE EZRINA E MOESINA EM METÁSTASES DE CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS DO TIPO CÉLULAS CLARAS

MARCOS VINÍCIUS ODORÍSSIO FERRARI

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr Walter Henriques da Costa

Co-Orientador: Dr José Augusto Rinck Júnior

São Paulo, 2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferrari, Marcos Vinícius Odoríssio.

**ESTUDO DO VALOR PROGNÓSTICO E DA EXPRESSÃO IMUNO-
HISTOQUÍMICA DE EZRINA E MOESINA EM METÁSTASES DE
CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS DO TIPO CÉLULAS CLARAS. /
Marcos Vinícius Odoríssio Ferrari. São Paulo, 2024.**

35f.

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

Orientador: Walter Henriques da Costa.

**1. Neoplasias renais/Kidney Neoplasms, 2. Carcinoma de Células
Renais/Carcinoma, Renal Cell, 3. Biomarcadores/Biomarkers**

CDU 616

Página de aprovação

Nome: Marcos Vinícius Odoríssio Ferrari

Título: Estudo do valor prognóstico e da expressão imuno-histoquímica de ezrina e moesina em metástases de carcinoma de células renais do tipo células claras

Aprovado em: 10/12/2024

Banca Examinadora

Orientador: Dr Walter Henriques da Costa

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Dr Marcus Vinícius Sadi

Instituição: UNIFESP/EPM

Membro da banca: Dr Stenio de Cassio Zequi

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Dra Maria Nirvana Formiga

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Dr Clovis Antônio Lopes Pinto

Instituição: Fundação Antônio Prudente

“Não é a mais forte das espécies que sobrevive, nem a mais inteligente,
mas a que melhor se adapta às mudanças.”

— Charles Darwin

DEDICATÓRIA

À minha família, fonte de amor, orientação, imenso suporte e acolhimento

À minha amada esposa Indiara por todo carinho, apoio e companheirismo

Dedico este trabalho em especial aos meus filhos Isabela e Lucas que nasceram durante este curso de Doutorado, tornando o desafio ainda mais especial.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr Walter Henriques da Costa, meu orientador, pelo intenso apoio em todas as fases deste estudo, pela grande disponibilidade e profissionalismo com os quais me guiou durante este trabalho.

Ao Dr José Augusto Rinck Júnior meu co-orientador pela participação atuante e pelos ensinamentos valiosos durante o decorrer do estudo.

Ao Prof Dr Stenio de Cassio Zequi, líder do Núcleo de Urologia do A.C.Camargo Cancer Center e idealizador do grande projeto temático em neoplasia renal do qual faço parte. Um profissional brilhante em todos seus aspectos desde a pesquisa acadêmica até às práticas clínica e cirúrgica.

À Dra Stephania Bezerra por toda orientação que recebi, pela dedicação, disponibilidade e paciência no trabalho de bancada no Departamento de Patologia.

À instituição A.C.Camargo Cancer Center pela possibilidade de aprendizado inestimável proporcionada pelos seus professores

RESUMO

Ferrari MVO. **Estudo da expressão imuno-histoquímica de ezrina e moesina e de seu valor prognóstico em metástases de carcinoma de células renais do tipo células claras.** [Tese de doutorado]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente, 2024

O propósito deste estudo foi analisar o valor prognóstico das expressões imuno-histoquímicas das proteínas ezrina e moesina em pacientes com diagnóstico de neoplasia de células renais do tipo células claras metastático (CCRccm). Foram revisados os dados de prontuários de 103 pacientes tratados no A.C.Camargo Cancer Center. Todos os pacientes foram tratados na instituição. Os espécimes de metástase foram examinados por única médica patologista do serviço e selecionados seus locais mais representativos para criação de lâmina de *tissue microarray* (TMA). O estudo imuno-histoquímico evidenciou que 61 (61,6%) pacientes não apresentaram expressão de ezrina, ao passo que 38 (38,4%) pacientes demonstraram expressão do biomarcador. Na análise da moesina, 19 (19%) das pessoas não apresentaram expressão imuno-histoquímica, e 81 (81%) exibiram expressão da proteína. A expressão de ezrina não esteve correlacionada a outras variáveis clínico-patológicas de interesse. Houve associação entre expressão de moesina e grau histológico ISUP ($p=0,006$). A negatividade na expressão de ezrina alterou de modo significativo a sobrevida global. Na análise multivariada, a ausência de expressão imuno-histoquímica de ezrina foi considerada um fator independente de prognóstico para sobrevida global (HR 2,11 [IC95% 1,11 – 3,96]).

Descritores: Neoplasias renais. Carcinoma de Células Renais. Biomarcadores. Imuno-histoquímica. Prognóstico. Domínios FERM. Metástase neoplásica.

ABSTRACT

Ferrari MVO. **[Prognostic evaluation and immunohistochemical expression analysis of ezrin and moesin in metastatic clear cell renal cell carcinoma]**. [Tese de doutorado]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente, 2024

The aim of the study was to evaluate the prognostic role of immunohistochemical expression of ezrin and moesin proteins in metastatic clear cell renal cell carcinoma (ccRCCm). The charts of 103 patients treated on A.C. Camargo Cancer Center were reviewed. All patients were treated in our institution. A single pathologist reviewed all cases to make a uniform reclassification and determined the most representative tumor areas for construction of a tissue microarray (TMA). Of all ccRCCm specimens, 61 (61.6%) had ezrin negative expression and 38 (38.4%) had positive ezrin expression. For moesin, 19 (19%) had negative expression and 81 (81%) had positive expression. The expression of ezrin was not associated with other clinical or pathological features. There was association between moesin expression and histological grade tumor (ISUP) ($P=0.006$). Ezrin expression significantly influenced overall survival. In multivariate analysis, ezrin negative expression was an independent prognostic factor for overall survival (HR 2,11 [IC 95% 1.11 – 3.96]).

Key-words: Kidney Neoplasms. Carcinoma, Renal Cell. Biomarkers. Immunohistochemistry. Prognosis. FERM Domains. Neoplasm Metastasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura das proteínas do complexo ERM	08
Figura 2	Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de ezrina e moesina.....	19
Figura 3	Expressão imuno-histoquímica de ezrina e moesina na população do estudo..	19
Figura 4	Método de Kaplan-Meier associando ezrina e sobrevida global.....	20
Figura 5	Método de Kaplan-Meier associando moesina e sobrevida global.....	21
Figura 6	Mecanismo de ação das proteínas da família ERM	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos utilizados na reação imuno-histoquímica de ezrina e moesina	13
Tabela 2	Frequência de metástase por número de sítios acometidos	16
Tabela 3	Variáveis clínico-patológicas e a expressão imuno-histoquímica de ezrina e moesina	17
Tabela 4	Análise multivariada em sobrevida global	22

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
CC1	<i>Cell conditioning 1</i> (para reação imuno-histoquímica)
CCR	Carcinoma de Células Renais
CCRm	CCR metastático
ccRCCm	Carcinoma de células renais do tipo células claras metastático
CEC	Carcinoma epidermoide
CEP	Comitê de Ensino e Pesquisa
CHL1	Homólogo próximo de L1
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
ERM	Ezrina-radixina-moesina
HGFR	Receptor do fator de crescimento de hepatócitos
HIF	Fator induzível por hipóxia
IHC	Imuno-histoquímica
IMDC	<i>International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium</i>
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i>
mTOR	Receptor de mamíferos da rapamicina
MSKCC	<i>Memorial Sloan Kettering Cancer Center</i>
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
PD-L1	Ligante de morte programada 1
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SG	Sobrevida global
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TKi	Inibidores de tirosina-quinase
TMA	<i>Tissue microarray</i> (microarranjo tecidual)
TNM	<i>Tumor-Node-Metastasis</i>
TS	Terapia sistêmica
VA	Vigilância ativa
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VHL	Gene Von Hippel-Lindal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O Carcinoma de Células Renais (CCR).....	1
1.2	Os Marcadores	6
2	OBJETIVOS.....	10
2.1	Objetivo Geral	10
2.2	Objetivos Específicos	10
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1	Pacientes.....	11
3.2	Construção do microarranjo tecidual (TMA)	12
3.3	Imuno-histoquímica	12
3.4	Estatística.....	13
3.5	Critérios de Inclusão e Exclusão.....	14
4	RESULTADOS	15
5	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	23
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

ANEXOS

Anexo 1. Carta de Autorização do CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CARCINOMA DE CÉLULAS RENAI (CCR)

O carcinoma de células renais representa 2,2% do número de tumores malignos no mundo, sendo responsável por noventa por cento das neoplasias renais. No ano de 2022 foi o décimo quarto câncer mais incidente globalmente, registrando mais de 434 mil casos novos¹. Este tipo de câncer apresenta maior incidência no sexo biológico masculino com uma razão de 1,5 : 1, e é majoritariamente diagnosticado após 60 anos de idade². O câncer renal contribuiu para 155 mil mortes no mundo em 2022¹. No contexto brasileiro, foram diagnosticados 4885 novos casos em 2022 segundo a base de dados DATASUS, e 3851 pacientes foram a óbito por neoplasia renal naquele mesmo ano, segundo a mesma base de dados. Estes números evidenciam que, apesar da baixa incidência, a letalidade do câncer renal é significativa.

Os fatores de risco para o CCR, em ordem decrescente de risco adicionado são o tabagismo, a obesidade e a hipertensão arterial sistêmica, todos amplamente reconhecidos e bem estabelecidos³.

Cerca de um terço dos pacientes recebe o diagnóstico de câncer renal com base em sinais e sintomas clínicos. No entanto, a maioria expressiva dos casos de câncer renal é descoberta incidentalmente, em virtude do aumento na realização de exames subsidiários, como ecografia abdominal e tomografia computadorizada, inicialmente destinados a outras investigações clínicas ou empregados como parte de procedimentos de rastreamento. Esse cenário tem contribuído para elevar significativamente a proporção de neoplasias renais diagnosticadas em estágios iniciais².

Apesar deste contexto epidemiológico favorável, 20% das neoplasias renais se apresentam com metástase sincrônica, e 20% dos pacientes tratados cirurgicamente por doença localizada com intenção curativa, irão progredir para doença metastática⁴.

O tratamento da neoplasia renal localizada é fundamentalmente operatório. A nefrectomia radical inclui a remoção completa do rim incluindo a fáscia de Gerota, sendo essencial a ligadura precoce de artéria e veia renais, podendo ou não incluir a glândula adrenal ipsilateral e a linfadenectomia para estadiamento⁵. No cenário metastático, a nefrectomia

imediate tem sido preterida para pacientes de prognóstico ruim segundo a classificação do *International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium* (IMDC) ou que já tem indicação de terapia sistêmica (TS), após dados publicados de não-inferioridade da TS sobre a cirurgia⁶.

O tratamento adjuvante com terapia sistêmica em câncer renal ganhou novo capítulo após diversos estudos negativos em sobrevida livre de doença na última década. Há poucos anos houve publicação de estudo com dados positivos sobre o uso de pembrolizumabe em pacientes submetidos previamente a nefrectomia sem evidencia de metástase (ou pós metastasectomia) vs uso de placebo: houve diminuição no risco de recidiva da doença no grupo tratamento da ordem de 32% com *hazard ratio* (HR) 0,68 [0,53 – 0,87] $p=0,002$ ⁷. Mais recentemente foi publicada a atualização sobre estes dados, evidenciando que a vantagem na recidiva também se estendeu para o desfecho de sobrevida global⁸.

O CCR metastático (CCRm) apresentou historicamente um prognóstico seriamente reservado: os pacientes apresentavam uma sobrevida menor de 5% em 10 anos entre os anos 1990 e 2000⁹. A terapia alvo molecular, empregando inibidores de tirosina-quinase (TKI) notadamente contra o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), e também inibidores do receptor de mamíferos da rapamicina (mTOR), demonstrou impacto positivo na sobrevida dos pacientes, porém em sua maioria de maneira parcial, com poucos pacientes exibindo respostas completas¹⁰. Há pouco anos, a introdução de medicamentos inibidores de checkpoint imunológico tem revelado resultados mais promissores em termos de sobrevida nos casos metastáticos. Esquemas de drogas associando um inibidor de checkpoint imunológico com um inibidor de tirosina quinase são considerados atualmente tratamentos de primeira linha para o câncer renal metastático¹¹. No cenário de prognóstico favorável pela classificação IMDC temos como opções os seguintes esquemas terapêuticos: nivolumabe (inibidor de PD1) e cabozantinibe (inibidor de tirosina-quinase), pembrolizumabe (inibidor de PD1) e axitinibe (inibidor tirosina-quinase), pembrolizumabe e lenvatinibe (inibidor tirosina-quinase). No cenário de prognóstico ruim ou intermediário, além dos três esquemas citados acima, podemos utilizar também a associação de nivolumabe associado ao ipilimumabe (anticorpo anti-CTLA4). Todos os esquemas acima são baseados em estudos randomizados e controlados de fase 3. ¹²¹³¹⁴.

A vigilância ativa (VA) para pacientes oligometastáticos é uma opção que pode ser considerada em pacientes selecionados. Uma parte dos pacientes com CCRm apresenta

metástases indolentes, de crescimento lento, permitindo a aplicação de vigilância ativa em vez de TS imediata, preservando a qualidade e quantidade de vida. Um estudo prospectivo observacional de braço único que acompanhou 504 pacientes metastáticos, sendo 143 submetidos a vigilância ativa mostrou que o seguimento se manteve em 50% destes pacientes sem terapia sistêmica, com mediana de vida global não atingida e índices de qualidade de vida superior ao de pacientes que iniciaram TS imediata¹⁵. Os resultados sugerem que a VA é uma opção justificável em pacientes cuidadosamente selecionados, indicando a necessidade de estudos adicionais para definir melhor essa população, enfatizando a importância da abordagem individualizada no tratamento do CCRm.

Os fatores prognósticos classicamente considerados para neoplasia renal são o estadió clínico, o grau histológico de malignidade, o envolvimento linfonodal e a presença de metástases a distância¹⁶.

O sistema prognóstico mais amplamente utilizado no CCR é o *Tumor-Node-Metastasis* (TNM). Está em sua oitava edição pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e constitui importante ferramenta para estratificação dos pacientes. Baseia-se na avaliação de características tumorais anatômicas como tamanho do tumor e invasão de estruturas hilares e peri-renais, bem como invasão vascular macroscópica, disseminação linfonodal e metástases à distância¹⁷.

A classificação IMDC e a classificação MSKCC (Memorial Sloan Kettering Cancer Center) são os sistemas mais utilizados para avaliar especificamente o prognóstico de pacientes com câncer renal metastático na prática clínica e no cenário de pesquisa clínica. O IMDC categoriza os pacientes em prognóstico bom, intermediário ou ruim, com base em seis fatores de risco: tempo desde o diagnóstico até o tratamento sistêmico, anemia, neutrofilia, plaquetose, hipercalcemia e *status performance* do paciente, sendo bom prognóstico zero pontos, intermediário 1-2 pontos e prognóstico ruim com 3 pontos ou mais¹⁸. A classificação do MSKCC compartilha muitos elementos com o IMDC e leva os seguintes critérios para classificação: tempo desde o diagnóstico até o tratamento sistêmico, anemia, DHL elevado, hipercalcemia e *status performance* do paciente; a pontuação para prognóstico é a mesma do IMDC⁹.

Apesar de existirem fatores prognósticos definidos para o câncer renal, é notável que pacientes com tumores que compartilham características similares possam ter resultados bastante diversos. Essa discrepância pode ser explicada por fatores biológicos e genéticos¹⁹.

Portanto, a análise de biomarcadores se torna crucial nesse contexto, pois pode prever desfechos clínicos e orientar a seleção das terapias sistêmicas mais adequadas para cada paciente.

Entre as principais mutações genéticas identificadas no CCR de células claras, a mutação do gene supressor de tumor Von Hippel-Lindau (*VHL*), localizado no braço curto do cromossomo 3, foi a primeira a ser investigada. A perda de função desse gene resulta em um aumento nos fatores induzidos pela hipóxia (HIF-1a e HIF-2a), que regulam processos celulares como apoptose, proliferação celular e angiogênese, principalmente através do aumento do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)²⁰. Essa alteração genética está associada à doença de von Hippel-Lindau e também é encontrada na maioria dos tumores renais esporádicos. Os estudos nessa área foram fundamentais para o desenvolvimento de terapias-alvo moleculares, como os inibidores de tirosina quinase²¹.

De modo diferente da ação do gene *VHL*, os demais genes mais comumente mutados no CCRcc: *PBRM1*, *BAP1* e *SETD2* desempenham papéis na remodelação da cromatina e na metilação das histonas^{22,23}. Um estudo publicado em 2017 avaliou 341 genes em 220 amostras tumorais de pacientes com CCRcc metastático tratados com terapia antiangiogênica. Descobriu-se que 73% dos tumores apresentavam até 10 mutações genéticas, sendo as mais comuns *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, *BAP1*, *KDM5C* e *PTEN*, estes cinco últimos envolvidos na biologia da cromatina e das histonas. A presença de mutação em *BAP1*, quando os pacientes foram tratados com everolimus seguido de sunitinibe, resultou em menor sobrevida global (9,8 meses) em comparação com pacientes com mutação em *PBRM1* (43,5 meses) ou com tumores de tipo selvagem (18,1 meses). No entanto, quando a ordem da terapia foi invertida (sunitinibe seguido por everolimus), a sobrevida foi semelhante entre os grupos (*BAP1*, 29,9 meses; *PBRM1*, 33,2 meses e selvagem, 33,1 meses)²⁴. Este estudo sugere que a análise de biomarcadores pode influenciar na escolha da terapia sistêmica, visando uma maior sobrevida.

Um dos estudos do nosso grupo observou expressões imuno-histoquímicas das proteínas e análise RT-PCR dos genes *BAP1* e *PBRM1* em 441 amostras de tumores localizados e revelou que a perda de expressão desses marcadores se correlacionou com piores desfechos em sobrevidas global e câncer específica²⁵. Porém, em estudos recentes sobre carcinoma de células renais (CCR), alguns destes marcadores moleculares falharam em demonstrar um impacto prognóstico significativo. Um exemplo notável é justamente a proteína *PBRM1*, que,

embora seja frequentemente mutada no CCR, não conseguiu se consolidar como um preditor de desfechos clínicos consistentes em alguns estudos retrospectivos. Apesar de sua perda estar associada a características patológicas adversas, sua correlação com a sobrevida global ou livre de progressão não foi suficientemente robusta em coortes publicadas mais recentemente. Da mesma forma, o marcador anidrase carbônica 9 (CA-IX), embora relacionado à resposta ao tratamento e à biologia do tumor, apresentou resultados inconsistentes como fator prognóstico em estudos que o investigaram no CCR localizado²⁶.

Outro biomarcador que mostrou resultados limitados em termos de prognóstico no câncer renal é o PD-L1. Apesar de ser amplamente estudado devido ao seu papel no microambiente imunológico e na resposta às imunoterapias, a expressão de PD-L1, quando avaliada isoladamente, falhou em demonstrar uma associação sólida com a sobrevida dos pacientes em muitos estudos. Isso sugere que sua utilidade clínica pode estar mais ligada à predição de resposta a terapias imunológicas do que como um marcador prognóstico independente. A combinação de múltiplos marcadores, ao invés de um único biomarcador, tem sido sugerida como uma abordagem mais eficaz para avaliar o prognóstico no CCR^{27,28}.

1.2 OS MARCADORES

1.2.1 Ezrina e Moesina

Ezrina e moesina são membros da família de proteínas ERM (ezrina-radixina-moesina), reconhecidas por sua função na ligação entre o citoesqueleto de actina e a membrana celular²⁸. Sua presença está associada a uma variedade de processos celulares, incluindo adesão, mobilidade, polaridade e sobrevivência celular. Essas características podem promover a invasão local e a formação de metástases em tecidos cancerosos.

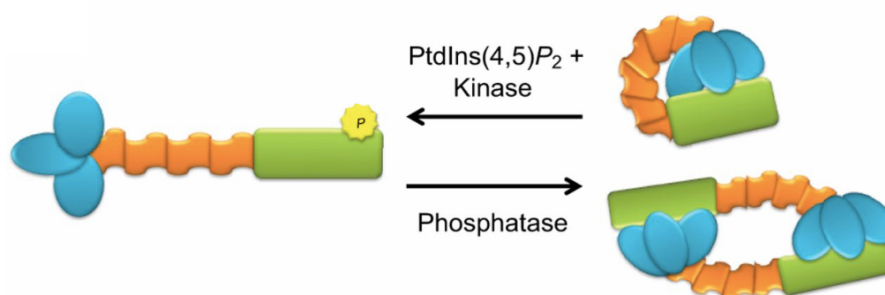
A ezrina é uma proteína produto do gene *EZR*, localizado no braço longo do cromossomo 6. Com cerca de 80 kDa, foi inicialmente identificada em células formadoras de microvilosidades intestinais na borda em escova, além de ser encontrada em microvilosidades placentárias. Estudos relacionaram a hiperexpressão de ezrina a pior prognóstico em neoplasias no trato gastrointestinal (como estômago, pâncreas e cólon)²⁹ e também de mama³⁰.

Moesina é uma proteína codificada pelo gene *MSN* situado no cromossomo X, também apresenta aproximadamente 80 kDa e foi investigada primeiramente como uma proteína que se liga a heparina em célula muscular lisa³¹. Expressão de moesina é abundante no tecido pulmonar e esplênico e difere das outras proteínas do complexo ERM principalmente por não apresentar um trecho de poliprolina na região do domínio α helicoidal³². Sua expressão também é frequente em tecidos com microvilosidades, a semelhança com a expressão de ezrina.

Radixina foi previamente identificada em hepatócitos na região da junção célula-célula. Outros estudos sugerem que sua concentração principal ocorre nas células das microvilosidades dos canalículos biliares, enquanto sua expressão em outros tecidos parece ser limitada²⁸.

As proteínas pertencentes ao complexo ERM apresentam duas extremidades distintas: uma carboxi-terminal e uma amino-terminal, unidas por uma estrutura central em forma de alfa hélice. O domínio carboxi-terminal demonstra uma afinidade significativa com os filamentos de actina quando testado *in vitro*, enquanto o domínio amino-terminal se conecta à membrana celular por meio da porção citoplasmática de proteínas transmembrana, como CD44 e CD43³². Essa organização permite que as proteínas do complexo ERM induzam ou estabilizem protrusões na superfície celular em resposta a estímulos provenientes do

ambiente extracelular³³. Tanto a ezrina quanto a moesina podem existir em estado ativado ou inativo dentro da célula, e sua atividade é regulada por meio de processos de fosforilação e interação com fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato [PtdIns(4,5)P₂]. A figura abaixo exemplifica tais processos.



Fonte: Adaptado de CLUCAS e VALDERRAMA (2015)

Legenda: Extremidade amino-terminal (azul). Extremidade carboxi-terminal (verde). Centro alfa-helicoidal (laranja)

Figura 1. Estrutura das proteínas do complexo ERM em suas formas ativa (esquerda) e inativas (a direita) em monômeros ou dímeros.

As proteínas do complexo ERM, juntamente com os receptores na membrana plasmática, desempenham um papel essencial na sinalização celular. Especificamente, sua interação com CD44, receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e receptor do fator de crescimento de hepatócitos (HGFR), estão intimamente ligados ao processo de migração celular, com implicações significativas na invasão de células neoplásicas e na formação de metástases²⁸.

Estudos sobre as proteínas quinases envolvidas na ativação do complexo ERM revelaram que, em estudos *in vitro*, elas desempenham um papel na regulação da ezrina e moesina, incluindo a Rho-quinase (ROCK)³⁴ e a proteína quinase Ca (PKCa)³⁵. No entanto, estudos mais pertinentes realizados *in vivo* indicam que essas quinases não são fundamentais para a fosforilação, destacando não apenas a importância da concentração celular de uma

quinase específica, mas também sua expressão temporal e espacial em diferentes células, órgãos e tecidos²⁸.

Ezrina e moesina são consideradas também proteínas de suporte (*scaffold molecules*) na ativação da superfamília Ras de pequenas GTPases, incluindo os subgrupos Ras e Rho, através da interação com inibidores dissociados de guanina (GDIs) e fatores trocadores de guanina (GEFs)³⁶. É sabido que mutações oncogênicas no Ras, bem como nos receptores tirosina-quinase EGFR e HGFR, podem desempenhar um papel na formação tumoral³⁷. Estudos indicam uma correlação entre a alta expressão de ezrina e um prognóstico desfavorável em várias neoplasias, como aquelas com sítios primários em mama, próstata e pulmão. Alterações na expressão das proteínas do complexo ERM podem afetar sua interação com receptores de membrana celular, levando a modificações nas vias de sinalização celular e potencialmente contribuindo para a tumorigênese³⁷.

A investigação da expressão de ezrina e moesina também se estendeu para tumores de orofaringe. Um estudo anterior conduzido sobre carcinoma epidérmoide (CEC) de laringe investigou a presença de ezrina e moesina por meio de ensaios imuno-histoquímicos e de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR), comparando os tecidos do tumor primário, das metástases linfonodais e do tecido normal do próprio paciente. Foi observada uma maior expressão dessas proteínas, em ordem decrescente, nos linfonodos metastáticos, no tumor primário e no tecido normal. Essa expressão se mostrou como um fator prognóstico para um estágio clínico mais desfavorável e a presença de metástases, resultando também em piores índices de sobrevida global, especialmente em pacientes cujos tecidos neoplásicos demonstravam uma expressão intensa de ezrina e moesina³⁸.

Em neoplasias renais, a ezrina pode servir como um marcador diagnóstico útil na diferenciação entre os diferentes subtipos de carcinoma de células renais. Foi observado que a expressão de ezrina foi predominantemente positiva nos subtipos de células claras e papilífero, enquanto foi negativa no subtipo cromóforo³⁹.

Publicação relevante sobre a avaliação da expressão de micro-RNA (miR-96) e ezrina foi conduzido, empregando qRT-PCR e Western-blotting, respectivamente, para quantificá-los em uma amostra de 63 pacientes com CCR submetidos à nefrectomia. Os resultados revelaram uma expressão mais elevada de ezrina nos pacientes com doença metastática em comparação com os pacientes em remissão da doença ($p < 0,05$)⁴⁰.

Um estudo do mesmo ano analisou a expressão imuno-histoquímica de ezrina, anidrase carbônica IX e neuropilina-2 em tecidos de nefrectomias de pacientes com câncer renal metastático, de várias histologias e risco intermediário, que não responderam ao tratamento sistêmico primário com interferon alfa e posteriormente receberam algum inibidor de tirosina quinase (sunitinibe, sorafenibe, pazopanibe) em segunda linha. Os resultados revelaram que, entre os tumores dos 45 pacientes analisados, aqueles com expressão aumentada de ezrina apresentaram pior sobrevida livre de progressão (sobrevida média de 3 meses vs 7 meses, $p=0,01$) e pior sobrevida global (sobrevida média de 13 meses vs 26 meses, $p=0,009$)⁴¹.

Nosso grupo publicou em 2019 estudo que analisou a expressão imuno-histoquímica de ezrina e moesina em 575 casos de carcinoma de células renais claras (ccRCC) tratados cirurgicamente. A expressão de ezrina foi associada a fatores prognósticos, como estadiamento clínico, metástases síncronas e grau histológico ISUP. Pacientes sem expressão imuno-histoquímica de ezrina apresentaram piores taxas de sobrevida global em 10 anos em relação aos pacientes positivos para este marcador: 86% para os pacientes que demonstraram expressão positiva de ezrina e 68% para os pacientes negativos para o referido marcador ($p = 0,001$). Na análise multivariada, a ausência de ezrina foi identificada como fator prognóstico independente (HR 1,89; IC 95% 1,11–3,20).

Mais recentemente conhecemos os dados do primeiro e único estudo publicado até o momento que avaliou a expressão de ezrina no tecido metastático de uma população recebendo sunitinibe em primeira linha. A hiperexpressão de ezrina nos espécimes de metástases dos pacientes que progrediram nos primeiros 3 meses foi maior do que nos pacientes que progrediram após 3 meses ($P = 0,003$). A mediana de sobrevida global foi mais longa em pacientes com baixos níveis de expressão de ezrina (27 meses) em comparação com pacientes com altos níveis de expressão de ezrina (12 meses) ($P = 0,001$)⁴², sugerindo o papel de biomarcador prognóstico para a ezrina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as expressões imuno-histoquímicas das proteínas ezrina e moesina no tecido metastático de pacientes portadores de CCR do tipo células claras e associá-las a fatores prognósticos para sobrevida

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Analisar o impacto das suas expressões na taxa de sobrevida global (SG)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PACIENTES

Os dados foram coletados de prontuários de pacientes com neoplasia de células renais do subtipo células claras, tratados nos Departamentos de Urologia e Oncologia Clínica do A.C.Camargo Cancer Center entre 2003 e 2020, com seguimento mínimo de três meses.

A coleta das informações a cerca do quadro clínico e epidemiológico de todos os pacientes foi feita através do prontuário eletrônico (Tasy®) e tabulados no RedCap.

As variáveis coletadas foram: idade, sexo, *performance status*, tempo de evolução, se foi submetido ou não a nefrectomia, topografia das lesões metastáticas, data do diagnóstico oncológico, data de detecção da primeira metástase, associação de outros subtipos histológico pelo Consenso de 2012⁴³, grau histológico definido pela Sociedade Internacional de Uro-patologia, tipo de tratamento sistêmico das metástases em primeira e segunda linhas de tratamento, status de metastasectomia e situação clínica ao final do estudo.

Nosso estudo é parte do projeto temático INCITO-INOTE que avalia o impacto prognóstico de uma série de marcadores moleculares em câncer renal, os quais foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ensino e Pesquisa (CEP) desta instituição. O referido instituto também subsidiou nosso projeto. Os marcadores selecionados para este estudo específico fazem parte daquele conjunto de marcadores já aprovados para estudo, e estão disponíveis no Departamento de Anatomia Patológica.

A coorte do projeto temático é internacional, incluindo dados de prontuários do A.C.Camargo Cancer Center, da Santa Casa de Presidente Prudente – SP, e de instituições estrangeiras do Uruguai (Hospital Pasteur) e dos Estados Unidos (Lee Moffitt Cancer Center), enquanto a coorte deste estudo derivado exclusivo para ezrina e moesina no contexto metastático abrange apenas os pacientes tratados nos Departamentos de Urologia e Oncologia Clínica do A.C.Camargo Cancer Center

3.2 CONSTRUÇÃO MICROARRANJO TECIDUAL (TMA)

Os microarranjos teciduais (TMA) deste estudo foram montados no Departamento de Anatomia Patológica da mesma instituição e as reações imuno-histoquímicas foram realizadas no mesmo local, pela mesma equipe de patologistas.

Após revisão das lâminas pelo Departamento de Anatomia Patológica, foram selecionadas duas áreas mais representativa da metástase para elaboração do TMA. Os respectivos blocos de parafina contendo o tecido metastático foram resgatados e obtidos então cilindros de material de 1,0 mm de diâmetro cada, correspondente a área selecionada para elaboração do TMA, conforme padronização de KONONEN et al. (1998). Assim, cada cilindro retirado do bloco doador foi introduzido em um novo bloco de parafina (receptor) em duplicata para cada caso. As áreas tumorais selecionadas foram retiradas do bloco doador e adicionadas ao bloco receptor com auxílio do Manual Tissue Arrayer 1 (Beecher Instruments Micro-array technology, Silver Spring, USA). Os cortes seriados do bloco de TMA foram depositados em lâminas silanizadas (Starfrost®) recobertas com adesivo e submetidas à fixação por UV (Instrumedics Inc®, Hackensack, NJ). Posteriormente, as lâminas passaram por um banho de parafina e foram armazenadas à - 20°C no freezer para posteriormente serem utilizadas para o estudo imuno-histoquímico (IHQ).

3.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

Para análise IHQ foram realizados cortes convencionais seccionados no micrótomo (Leica, RM2255), na espessura de quatro micrômetros, postos em lâminas com carga elétrica (StarFrost) e mantidas em estufa a 60°C *overnight*. As lâminas foram posteriormente incubadas com os anticorpos Ezrina e Moesina, através dos kits de detecção Ultraview (cat. 760-500, Ventana Medical Systems) ou OptiView DAB IHC Detection Kit (cat. 760-700, Ventana Medical Systems). As reações foram realizadas no sistema automatizado Ventana BenchMark XT (Ventana Medical Systems) seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, desparafinizadas utilizando a solução EZprep (cat. 950-102, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA). A recuperação antigênica foi feita com os reagentes cell conditioning 1 (cat. 950-224, Ventana Medical Systems, Inc.) ou cell conditioning 2 (cat. 950-223, Ventana Medical Systems, Inc.) a 95°C. A especificação do kit de detecção, a recuperação e a diluição de

cada anticorpo estão descritas na tabela abaixo. Após o ensaio de imuno-histoquímica, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, xilol e montadas com meio de montagem Entellan (cat. 107961, Merck).

Tabela 1. Relação dos anticorpos utilizados na reação imuno-histoquímica de ezrina e moesina

Anticorpo	Fabricante	Concentração	Kit de detecção	Tempo de incubação	Recuperação antigênica
Moesina	<i>Neomarkers</i>	1:200	<i>OptiView</i>	32 min	32 min de CC1
Ezrina	<i>Epitomics</i>	1:100	<i>Ultraview</i>	32 min	30 min de CC1

Fonte: autoria própria

Para a análise das lâminas de imuno-histoquímica, a marcação IHQ foi analisada manualmente por experiente patologista do nosso grupo (SMB). Foram consideradas as marcações exclusivamente na membrana celular e no citoplasma. Os grupos foram divididos entre pacientes com expressão inequívoca do marcador em ao menos uma amostra e os pacientes que não apresentam nenhuma expressão do marcador. Optamos pela dicotomização da expressão dos marcadores dada a escassa literatura disponível a cerca do melhor método para categorizar grupos de expressão imuno-histoquímica em CCRcc metastático. Foram excluídos os casos com presença menor que 25% de células no cilindro de TMA.

3.4 ESTATÍSTICA

Análises estatísticas foram realizadas através do software SPSS versão 23, da IBM. Para verificar a associação entre a expressão dos marcadores estudados e as variáveis clínicas e patológicas foi utilizado o teste de qui-quadrado de Pearson. O teste exato de Fisher foi realizado quando a frequência esperada em alguma das caselas da tabela for menor que 5. O nível de significância estatística utilizado (p) foi de 5%.

O tempo de sobrevida global foi considerado pelo intervalo de tempo entre o diagnóstico da primeira metástase até a última consulta de acompanhamento ou data do óbito; e sua análise foi realizada através do método de Kaplan-Meier. Para comparação das curvas de sobrevida para uma determinada variável, utilizamos o teste de log-rank, com nível de significância estatística (p) também de 5%.

Na análise multivariada, foi utilizado a regressão de Cox, para determinar quais variáveis influenciaram a sobrevida de maneira independente.

3.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Critérios de Inclusão

- CCR subtipo células claras comprovado histologicamente em maior parte da amostra;
- Evidência radiológica da presença de metástase;
- Material histopatológico proveniente da metástase em boas condições para realização de imuno-histoquímica;
- Ausência de comorbidades que reduzam a expectativa de vida a menos de seis meses.

Critérios de Exclusão

- Pacientes tratados em outros serviços;
- Prontuários com dados incompletos ou faltantes;
- Pacientes com tempo de seguimento inferior a três meses ou que tenham abandonado o seguimento por um período superior ao dobro daquele solicitado para seu retorno, desde que não se consiga informações ao seu respeito através de contato telefônico ou por escrito.

4 RESULTADOS

O total de pacientes com diagnóstico de carcinoma de células renais do subtipo células claras metastático tratados na instituição no período estudado foi de 141 pacientes. Trinta e oito pacientes foram excluídos do estudo devido ao respectivo material arquivado em parafina estar em más condições para a elaboração de novos cortes para imuno-histoquímica. Portanto, 103 pacientes foram incluídos neste estudo. Destes, 77 pacientes são do sexo masculino e a mediana de idade dos pacientes incluídos no estudo foi de 57 anos.

Em relação a fonte pagadora do tratamento, 49 pacientes dispunham apenas do sistema único de saúde, 52 pacientes contavam com cobertura do sistema de saúde suplementar (planos de saúde) e 2 pacientes foram totalmente particulares.

O ano do diagnóstico de câncer metastático variou de 2003 até 2020 entre os pacientes incluídos no estudo. Mais de metade (52 pacientes) recebeu o tratamento sistêmico entre 2013 e 2018.

Quase a totalidade dos pacientes havia sido submetido a nefrectomia (95 pacientes) previamente ao tratamento sistêmico. A minoria dos casos foi de metástase sincrônica: 35 pacientes, enquanto 68 pacientes se apresentaram com metástase metacrônica.

Do total de pacientes, 72 apresentaram metástase pulmonar, 54 apresentaram metástase óssea, 21 apresentaram metástase hepática, 23 apresentaram metástase no sistema nervoso central, 20 apresentaram metástases para tecidos de partes moles. Também observamos pacientes com metástases em sítios pouco frequentes como pâncreas (5), pele (3), mediastino (2), gengiva (2), baço (1), língua (1), olho (1), tireoide (1).

Muitos pacientes apresentavam mais de um órgão afetado por metástase, 68 pacientes foram acometidos com até 2 sítios diferentes de metástases, como pormenorizado na tabela 2 a seguir.

Tabela 2. Frequência de metástase por número de sítios acometidos.

Número de órgãos acometidos	Frequência (n)
1	41
2	27
3	28
4	5
5	2

Fonte: autoria própria

A análise histopatológica dos espécimes obtidos de metástase foram todos de carcinoma de células renais do subtipo células clara, como inicialmente proposto no projeto de pesquisa, e o grau histológico foi avaliado como Furhman ou ISUP de acordo com o ano do diagnóstico. A partir da nova proposta de graduação histológica de 2012, passou-se a utilizar progressivamente o grau de ISUP. Totalizou-se 11 pacientes em grau 1; 31 pacientes em grau 2; 23 pacientes em grau 3 e 21 pacientes em grau 4. Dada a dificuldade técnica em resgate das lâminas de hematoxilina e eosina para revisão central, optamos por manter no banco de dados o grau histológico identificado na ocasião do tratamento e seguimento clínicos.

A seguir a tabela 3 resume as principais variáveis clínico-patológicas relacionadas a expressão dos biomarcadores estudados.

Tabela 3. Análise de referência cruzada entre as principais variáveis clínico-patológicas e a expressão imuno-histoquímica de ezrina e moesina.

Variável	Ezrina negativa n (%)	Ezrina positiva n (%)	p	Moesina negativa n (%)	Moesina positiva n (%)	p
Sexo						
Masculino	45 (73,8)	29 (74,4)	0,94	16 (84,2)	58 (71,6)	0,26
Feminino	16 (26,2)	10 (25,6)		3 (15,8)	23 (28,4)	
Metástase sincrônica						
Sim	21 (34,4)	13(33,3)	0,91	11 (57,9)	24 (29,6)	0,2
Não	40 (65,6)	26 (66,7)		8 (42,1)	57 (70,4)	
ISUP/ Fuhrman						
1 e 2	13 (32,5)	6 (28,6)	0,75	0 (0)	20 (40)	0,006
3 e 4	27 (67,5)	15 (71,4)		12 (100)	30 (60)	
Metástase Pulmonar						
Sim	43 (72,9)	26 (70,3)	0,78	12 (66,7)	57 (73,1)	0,58
Não	16 (27,1)	11 (29,7)		6 (33,3)	21 (26,9)	
Metástase Hepática						
Sim	14 (24,1)	6 (15,4)	0,29	2 (11,1)	18 (22,8)	0,26
Não	44 (75,9)	33 (84,6)		16 (88,9)	61 (77,2)	
Metástase Óssea						
Sim	30 (51,7)	23 (60,5)	0,39	9 (52,9)	44 (55,7)	0,83
Não	28 (48,3)	15 (39,5)		8 (47,1)	35 (44,3)	
Metástase SNC						
Sim	11 (18,3)	10 (26,3)	0,34	2 (11,1)	20 (25)	0,2
Não	49 (81,7)	28 (73,7)		16 (88,9)	60 (75)	
Metástase Linfonodal						
Sim	24 (40)	12 (30,8)	0,35	8 (44)	28 (34,6)	0,43
Não	36 (60)	27 (69,2)		10 (55,6)	53 (65,4)	
Metástase Partes moles						
Sim	8 (13,6)	4 (10)	0,63	1 (5)	11 (14)	0,07
Não	51 (86,4)	35 (90)		17 (95)	69 (86)	

Fonte: autoria própria

Em relação ao tratamento sistêmico, a média de tempo dos pacientes em primeira linha de tratamento foi de 14 meses. Em relação ao esquema de drogas escolhido, 55 pacientes receberam sunitinibe em primeira linha, 21 pazopanibe, 3 sorafenibe e 4 uma associação de ipilimumabe e nivolumabe.

Dos que receberam tratamento sistêmico, 64 apresentaram progressão da doença na primeira linha de tratamento, 10 se mantiveram estáveis em seu volume de doença, 3 pacientes apresentaram resposta parcial e apenas 1 resposta completa ao tratamento, o qual também evoluiu com toxicidade, sendo suspenso seu tratamento.

Até o presente momento, 7 pacientes não haviam recebido nenhum tratamento sistêmico, todos estes submetidos a metastasectomia completa. Outros 80 pacientes foram submetidos também ao procedimento de metastasectomia em algum momento de seu tratamento.

Trinta e cinco pacientes receberam uma segunda linha de tratamento sistêmico, as drogas mais frequentemente indicadas para este novo regime foram nivolumabe (18 pacientes), everolimus (7 pacientes), sunitinibe (4 pacientes), sorafenibe (3 pacientes), pazopanibe (1 paciente), axitinibe (1 paciente) e cabozantinibe (1 paciente).

Ao final do estudo, 54 pacientes foram a óbito (52,4%), 41 (39,8%) permaneceram vivos com evidência de doença e apenas 8 (7,8%) continuaram sem evidência de doença oncológica. A média de seguimento dos pacientes foi de 57 meses. O tempo de seguimento mínimo foi de 3 meses.

A análise dos marcadores estudados, como na figura 2, revelou que 61 pacientes não expressaram ezrina em nenhuma das duas amostras, enquanto 38 apresentaram alguma expressão deste marcador na leitura imuno-histoquímica.

Para moesina, a expressão foi diametralmente oposta, enquanto apenas 19 pacientes não expressaram moesina em nenhuma das duas amostras, 81 apresentaram algum grau de expressão do marcador, como na figura 3.

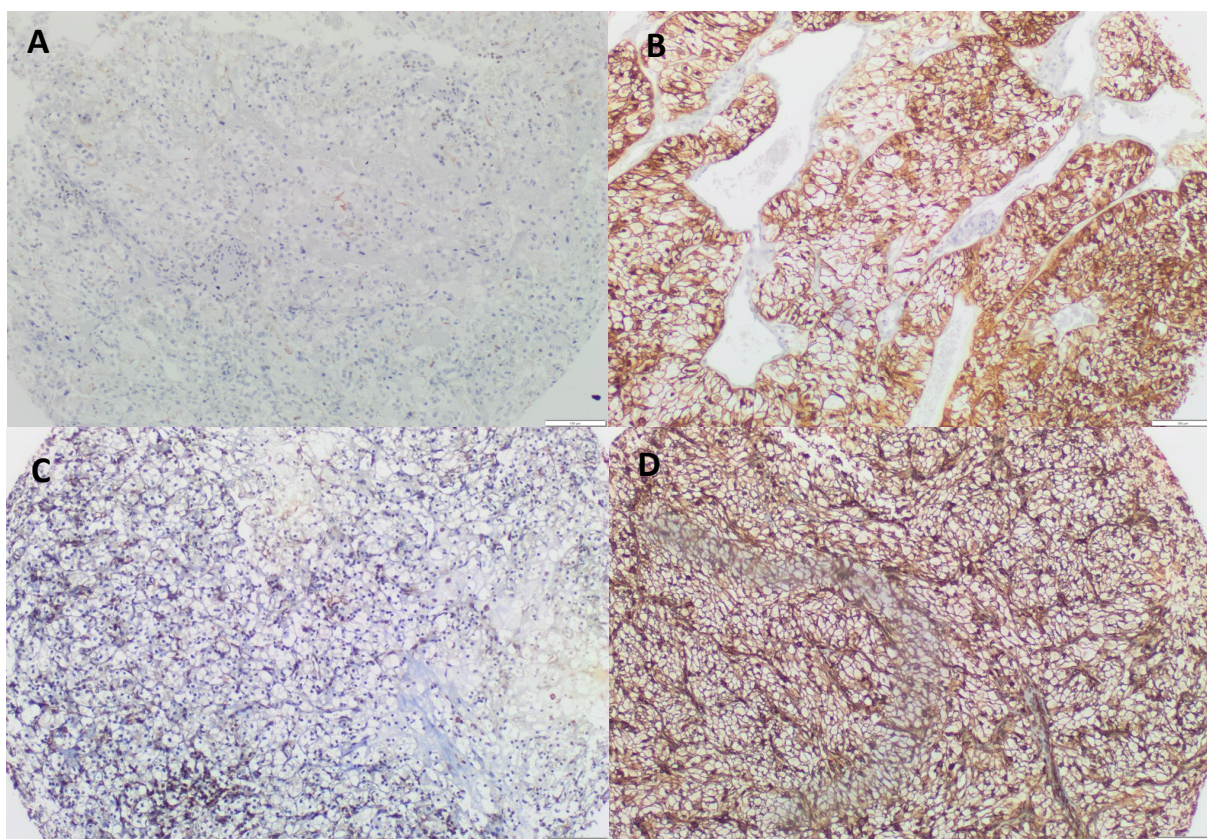


Figura 2. Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica em microarranjos de tecidos de ezrina e moesina em carcinoma de células renais subtipo células claras metastático. **A.** Expressão negativa de ezrina. **B.** Expressão positiva de ezrina. **C.** Expressão negativa de moesina. **D.** Expressão positiva de moesina.

Fonte: autoria própria

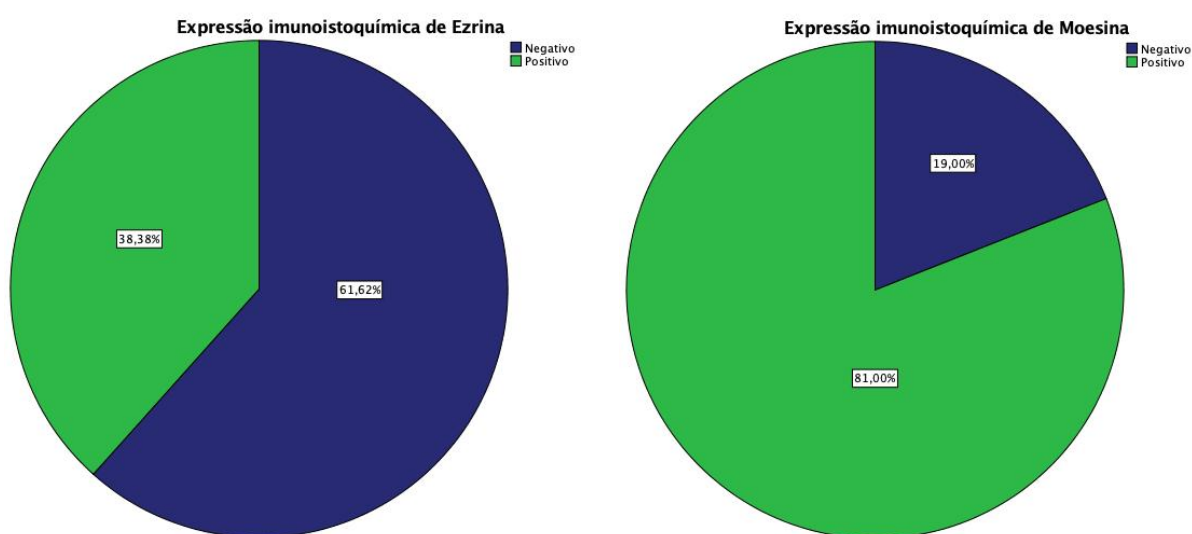
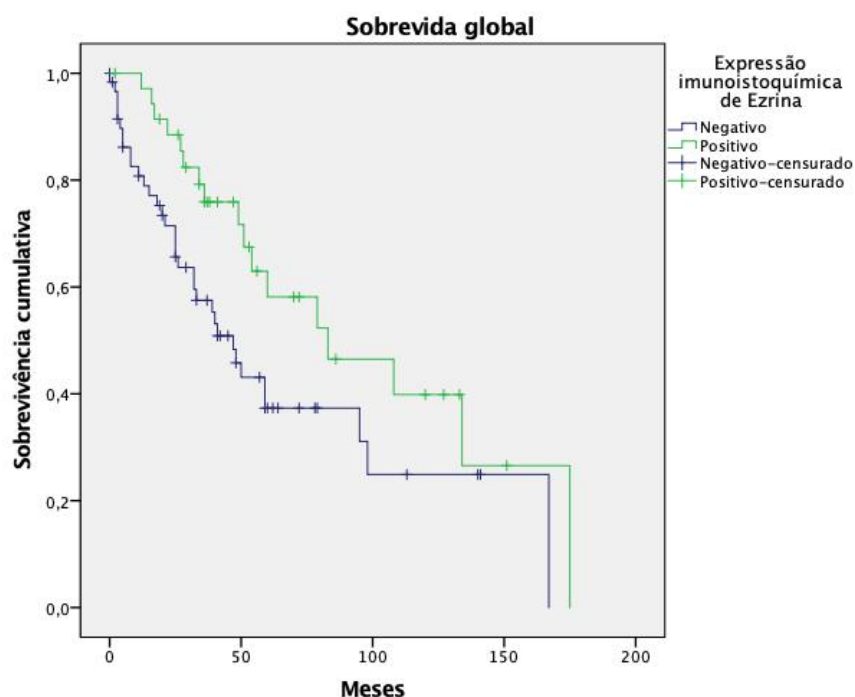


Figura 3. Expressão imuno-histoquímica de ezrina e moesina na população do estudo

Fonte: autoria própria

Ezrina se mostrou como marcador prognóstico na análise univariada de sobrevida global. Os pacientes que não apresentaram expressão de ezrina evoluíram com menor tempo de sobrevida. A mediana de sobrevida no grupo sem expressão do marcador foi de 47 meses, e 83 meses para o grupo com expressão de ezrina. A seguir a análise pelo método de Kaplan-Meier evidencia graficamente os achados, o teste de log rank resultou em $p = 0,039$.

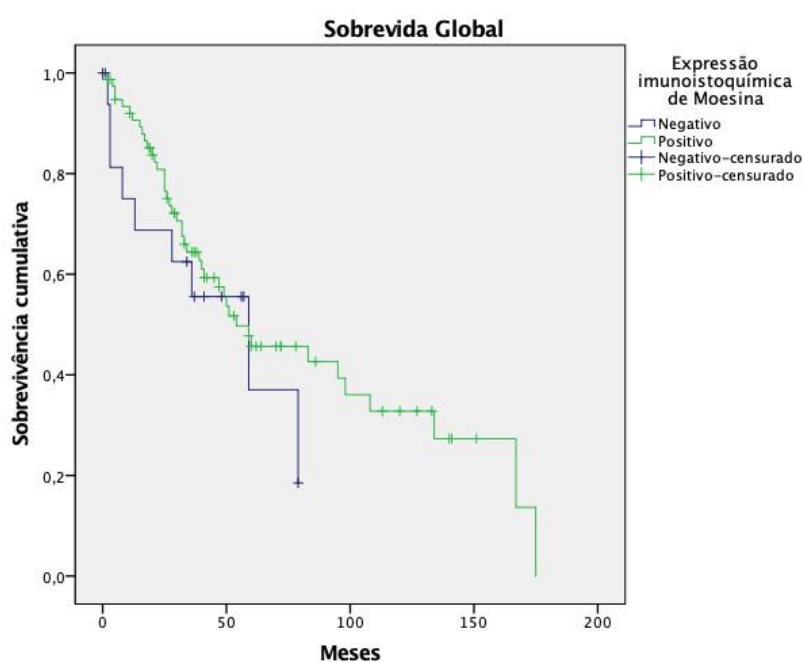


$p = 0,039$

Figura 4. Gráfico da análise do método de Kaplan-Meier associando a expressão imuno-histoquímica de ezrina e sobrevida global.

Fonte: autoria própria

Já a análise da expressão de moesina na sobrevida global evidenciou sobreposição de curvas de sobrevida global, teste de log rank $p = 0,28$, portanto não evidenciando diferença de prognóstico entre os pacientes negativos e positivos para o referido marcador. A mediana de sobrevida no grupo sem expressão do marcador foi de 59 meses, e 54 meses para o grupo com expressão de ezrina.



$p = 0,28$

Figura 5. Gráfico da análise do método de Kaplan-Meier associando a expressão imuno-histoquímica de moesina e sobrevida global.

Fonte: autoria própria

Análise multivariada

Para a análise multivariada, foi realizada a regressão de Cox comparando a razão de risco de variáveis que obtiveram na análise univariada de sobrevida global um $p < 0,30$. Foram incluídas no modelo a presença ou não de metástases em sistema nervoso central ($p=0,15$), metástases linfonodais ($p=0,09$), status de ter realizado ou não metastasectomia ($p<0,001$), expressão imuno-histoquímica de ezrina negativo vs positivo ($p=0,03$) e expressão imuno-histoquímica de moesina negativo vs positivo ($p=0,28$). Os resultados seguem na Tabela 4:

Tabela 4. Análise multivariada em sobrevida global

Variável	Univariada	Multivariada		
	Valor p	HR	95% CI	Valor p
Metástase linfonodal	0,09	1,44	0,777 - 2,688	0,24
Metástase sistema nervoso central	0,15	1,24	0,595 - 2,585	0,56
Status metastasectomia (não fez vs fez)	<0,001	3,51	1,762 - 6,989	<0,001
Ezrina (negativo vs positivo)	0,039	2,11	1,117 - 3,969	0,021
Moesina (negativo vs positivo)	0,28	1,11	0,498 - 2,451	0,806

Fonte: autoria própria

Os dados obtidos nesta análise demonstram que a expressão de ezrina no tecido metastático é um fator independente para prognóstico no câncer renal metastático. A ausência de expressão de ezrina implicou em um risco de morte 2,11 vezes maior em relação aos pacientes que expressaram o marcador.

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O carcinoma de células renais do subtipo células claras é uma neoplasia maligna complexa, cuja gestão e prognóstico têm sido amplamente estudados. A identificação de marcadores prognósticos específicos poderá fornecer informações valiosas sobre a progressão da doença e auxiliar na personalização do tratamento. Este estudo focou na avaliação do impacto prognóstico da expressão de ezrina e moesina em pacientes com carcinoma de células renais do subtipo células claras metastático. Nossos resultados indicam que a ausência de expressão de ezrina é um fator prognóstico independente para sobrevida global, enquanto a expressão de moesina não mostrou uma associação clara com a sobrevida global.

Os microarranjos teciduais (TMA) utilizados neste trabalho foram confeccionados no Departamento de Anatomia Patológica de nossa instituição, bem como as reações imuno-histoquímicas foram realizadas pela mesma equipe. A expressão imuno-histoquímica dos marcadores foi analisada manualmente por patologista experiente, sendo os pacientes divididos entre aqueles que apresentaram expressão evidente do marcador e os sem expressão detectável.

A imuno-histoquímica é uma técnica importante na identificação e classificação da expressão de marcadores em células específicas dentro de uma população celular heterogênea. Utilizando-a em associação com a técnica de microarranjo tecidual (TMA) pode-se aprimorar o processo da pesquisa clínica, especialmente por permitir a avaliação simultânea de múltiplas amostras teciduais em um único experimento, assim otimizando o uso de recursos laboratoriais e reduzindo o tempo necessário para as análises, aumentando a reprodutibilidade e a consistência dos resultados.

Além disso, o TMA possibilita a padronização da análise de biomarcadores em grandes coortes de pacientes, permitindo a identificação de padrões de expressão proteica relacionados a prognóstico, resposta ao tratamento e desenvolvimento de novas terapias personalizadas. Deste modo, o TMA torna-se uma ferramenta essencial para avançar a pesquisa translacional e o desenvolvimento de estratégias clínicas mais precisas.

Neste estudo optamos pela dicotomização dos pacientes em relação à expressão imuno-histoquímica nos seguintes grupos: ausência de expressão do marcador (“negativos”) e presença de expressão do marcador (“positivos”). Esta escolha foi feita para simplificar a

análise histopatológica e facilitar sua interpretação, de modo semelhante aos artigos anteriormente publicados pelo nosso grupo analisando biomarcadores em câncer renal^{44,45}.

A evidência disponível sugere que sistemas dicotômicos podem ser mais práticos e podem também se correlacionar melhor com certos parâmetros clínicos em comparação com sistemas de pontuação mais complexos. Como exemplo, em *guideline* publicado sobre o manejo do carcinoma anaplásico da tireoide, a imuno-histoquímica é usada para distinguir entre diferentes tipos de câncer de tireoide com base na presença ou ausência de marcadores específicos, como pan-citoqueratinas e Ki-67⁴⁶. A menor variabilidade interobservador também é uma das vantagens do sistema dicotômico⁴⁷.

Nossa análise revelou que pacientes sem expressão imuno-histoquímica de ezrina na metástase apresentaram uma mediana de sobrevida global de 47 meses, comparada a 83 meses para aqueles com expressão de ezrina. Esses achados vão de encontro ao único estudo anteriormente publicado na literatura que associou a expressão de ezrina como um marcador prognóstico em carcinoma renal metastático. Os autores daquele estudo também inferiram que ezrina é um biomarcador independente de prognóstico em pacientes com carcinoma renal subtipo células claras metastático, porém demonstraram que a hiperexpressão de ezrina (e não sua ausência) estava associada a piores resultados clínicos e a uma progressão mais rápida da doença, aparentemente o inverso de nossos achados neste estudo⁴². Alguns motivos podem ser apontados como substrato para divergência de achados. A data de diagnóstico metastático em nossa coorte foi mais ampliada, variou de 2003 até 2020 entre os pacientes incluídos no estudo, sendo que mais da metade (52 pacientes) recebeu o tratamento sistêmico entre 2013 e 2018; já o referido artigo arrolou apenas pacientes com diagnóstico e tratamento entre 2007 e 2012, o que pode mudar parte da terapia sistêmica recebida pelos pacientes. A avaliação da expressão imuno-histoquímica naquele artigo utilizou-se de pontuação multiplicando a intensidade e o percentual de células acometidas, enquanto nosso estudo comparou positividade contra negatividade de expressão. Outro detalhe é que levamos em consideração apenas a expressão no marcador na membrana celular e no citoplasma, e não em topografia nuclear ou nucleolar como o referido artigo o fez, devido a localização das referidas proteínas ser próxima ao citoesqueleto de membrana celular. Além disso, os dois estudos são retrospectivos, com todos os vieses que isso pode trazer, como a coleta de dados e a seleção dos pacientes.

Outros autores associaram a ausência de expressão de ezrina a um desfecho desfavorável em outros tipos de neoplasias. Autor espanhol identificou padrões de expressão de ezrina como preditores de progressão em tumores uroteliais de bexiga tratados com bacilo Calmette-Guérin (onco-BCG). Foi observado que a redução de expressão ezrina desempenhou um papel crucial na progressão tumoral e na resposta ao tratamento, associando baixa expressão a piores desfechos em sobrevida⁴⁸. Um autor sueco também encontrou piores desfechos em sobrevida global associados a redução de expressão imuno-histoquímica de ezrina em tumores uroteliais de bexiga⁴⁹. Um autor finlandês que realizou estudo em carcinoma seroso de ovário identificou que a ausência de expressão imuno-histoquímica de ezrina estava associada a uma menor sobrevida global⁵⁰. Os estudos acima reforçam a ideia de que a ezrina pode ser um marcador relevante em diferentes tipos de câncer.

A relação entre a expressão de ezrina e a sobrevida pode ser atribuída ao papel funcional da ezrina na adesão celular e na invasão tumoral. A ezrina é uma proteína que conecta a membrana celular ao citoesqueleto, influenciando a adesão, polaridade e motilidade celular, bem como a formação de metástases.

O mecanismo exato pelo qual a ausência da expressão de ezrina influencia positivamente a progressão tumoral e impacta a sobrevida global ainda é desconhecido. A ruptura de filamentos de actina e a redução da adesão celular focal são características da transição epitélio-mesênquima, que está ligada à invasão tumoral. Também se suspeita que a ezrina tenha um papel nas funções de adesão celular, devido às suas interações com a via de apoptose mediada pela Akt, a transdução de sinal ligada ao Rho, além da interação com a E-caderina e a β -catenina^{51,52,53}. Estes resultados indicam que a ausência de ezrina resulta em uma estrutura modificada do citoesqueleto, falta de adesão focal e desregulação da sinalização, todos esses processos podem intensificar a invasão tumoral⁴⁸.

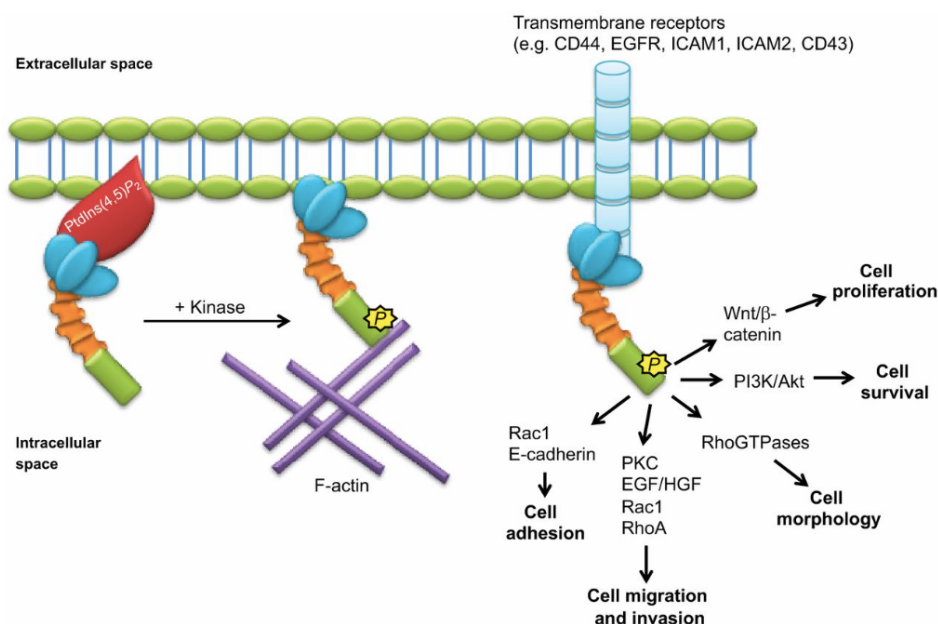


Figura 6 – Mecanismo de ação das proteínas da família ERM promovendo a ligação dos filamentos de actina à membrana plasmática e seu papel na sinalização celular

Fonte: Adaptado de CLUCAS et al (2015)

Em contraste com a função oncogênica bem estabelecida de ezrina, alguns estudos indicam que esta proteína pode inibir a progressão do câncer. Retomando a interação de ezrina na adesão celular através da interação com E-caderina e β -catenina, a depleção da expressão de ezrina reduz a adesividade célula-célula enquanto aumenta o comportamento relacionado a motilidade e o potencial de invasão das células do câncer colorretal⁵³. Além disso, no contexto do tumor ovariano, o VEGF promove a invasão de células de câncer de ovário humano através da regulação positiva do miR-205, que, por sua vez, regula negativamente a ezrina, indicando assim que esta pode ser um regulador negativo da invasão⁵⁴. No entanto, os autores não forneceram evidências, por meio de experimentos complementares, de que a regulação negativa do ezrina seja responsável pelo aumento da invasão.

Um estudo recente mostrou que a ezrina inibe a proliferação, o crescimento independente de ancoragem e a migração celular, enquanto promove a diferenciação das células do neuroblastoma ao interagir com o supressor tumoral CHL1 (homólogo próximo de L1)⁵⁵. Além deste, também foi relatado que uma maior expressão de ezrina está

correlacionada com uma melhor sobrevivência dos pacientes no sarcoma de Ewing⁵⁶, carcinoma ductal invasivo do pâncreas⁵⁷ e linfomas periféricos de células T nodais⁵⁸.

Assim, ezrina desempenha um papel supressor no crescimento, motilidade e invasão em alguns tipos de câncer. Acreditamos que a ezrina pode ter um papel dependente do contexto nesses tipos de câncer. No entanto, essas evidências não são suficientes para afirmar que ezrina é uma proteína supressora tumoral no tipo de câncer relatado e, portanto, estudos adicionais usando por exemplo modelos animais transgênicos são estritamente necessários para esclarecer se ezrina tem um papel supressor tumoral nesses tipos de tumores.

Em contraste com os achados relacionados à ezrina, a expressão de moesina não demonstrou uma associação significativa com a sobrevida global. A mediana de sobrevida foi de 59 meses para pacientes sem expressão de moesina e 54 meses para aqueles com expressão do marcador ($p=0,28$). Esse resultado sugere que, apesar da moesina ser um marcador relevante em outros contextos, ela não fornece informações prognósticas adicionais no carcinoma renal metastático.

A falta de associação significativa para moesina pode ser atribuída a alguns fatores, incluindo a heterogeneidade do carcinoma renal e a variabilidade na expressão de moesina entre diferentes pacientes. Além disso, moesina pode não ter um papel tão proeminente na patogênese do carcinoma renal quanto na de outros tipos de câncer⁵⁹. Isso reflete a necessidade de mais pesquisas para determinar os contextos específicos em que moesina pode ser um marcador prognóstico útil.

A natureza retrospectiva deste estudo pode introduzir vieses relacionados ao processo de coleta de dados clínicos e à seleção dos pacientes. Outro viés importante é a perda de pacientes devido à inviabilidade do material anatomopatológico, informação essencial para esta análise. Houve perdas principalmente entre espécimes de pacientes tratados entre 2000 e 2005, por desgaste do material, o que pode ter impactado a representatividade dos nossos resultados. A ausência de parte de dados clínicos para alguns pacientes também pode ter limitado a robustez dos resultados.

Além disso, a análise foi restrita a uma coorte de pacientes tratados em uma única instituição, o que pode limitar a generalização dos resultados. Estudos prospectivos e multicêntricos são necessários para validar os achados e explorar a aplicabilidade da expressão de ezrina em diferentes contextos clínicos e populações.

A validação dos nossos achados em coortes independentes e com diferentes características clínicas é essencial para fortalecer a evidência do papel da ezrina como marcador prognóstico. Analisar a expressão de ezrina em pacientes que não foram submetidos a nefrectomia, bem como estudar sua expressão em pacientes submetidos a um tipo específico de tratamento mais atual pode trazer inclusive respostas preditivas. Além disso, a exploração de novas abordagens terapêuticas baseadas em perfis moleculares pode também oferecer novas oportunidades para melhorar a gestão do paciente com carcinoma de células renais metastático.

Concluindo, nosso estudo retrospectivo, realizado em uma única instituição, sugere que a ausência de expressão de ezrina em amostras de tecido metastático de pacientes com carcinoma de células renais do tipo células claras pode ser um fator prognóstico independente para menor sobrevida global, corroborando com achados em outros tipos de neoplasias, apesar de divergir da única publicação prévia em carcinoma renal metastático. A expressão de moesina, por outro lado, não se mostrou um marcador prognóstico significativo nesse contexto. Ressalta-se a necessidade de estudos prospectivos e multicêntricos para validar esses resultados e elucidar o papel da ezrina na progressão tumoral, além de investigar potenciais aplicações terapêuticas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2024 May 4;74(3):229–63. Available from: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21834>
2. Capitanio U, Montorsi F. Renal cancer. *Lancet* [Internet]. 2016 Feb;387(10021):894–906. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067361500046X>
3. MCLAUGHLIN J, LIPWORTH L, TARONE R. Epidemiologic Aspects of Renal Cell Carcinoma. *Semin Oncol* [Internet]. 2006 Oct;33(5):527–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093775406002764>
4. Wiechno P, Kucharz J, Sadowska M, Michalski W, Sikora-Kupis B, Jonska-Gmyrek J, et al. Contemporary treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Med Oncol* [Internet]. 2018 Dec 27;35(12):156. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12032-018-1217-1>
5. O'Malley RL, Godoy G, Kanofsky JA, Taneja SS. The necessity of adrenalectomy at the time of radical nephrectomy: a systematic review. *J Urol* [Internet]. 2009 May;181(5):2009–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19286216>
6. Méjean A, Ravaud A, Thezenas S, Colas S, Beauval JB, Bensalah K, et al. Sunitinib Alone or after Nephrectomy in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2018 Aug 2;379(5):417–27. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1803675>
7. Choueiri TK, Tomczak P, Park SH, Venugopal B, Ferguson T, Chang YH, et al. Adjuvant Pembrolizumab after Nephrectomy in Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Aug 19;385(8):683–94. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2106391>
8. Choueiri TK, Tomczak P, Park SH, Venugopal B, Ferguson T, Symeonides SN, et al. Overall Survival with Adjuvant Pembrolizumab in Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2024 Apr 18;390(15):1359–71. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2312695>
9. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and

- prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 1999 Aug;17(8):2530–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10561319>
10. Motzer RJ, Hutson TE, Cella D, Reeves J, Hawkins R, Guo J, et al. Pazopanib versus Sunitinib in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2013 Aug 22;369(8):722–31. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1303989>
 11. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Nov 5;373(19):1803–13. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1510665>
 12. Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2019 Mar 21;380(12):1116–27. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1816714>
 13. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2018 Apr 5;378(14):1277–90. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1712126>
 14. Choueiri TK, Powles T, Burotto M, Escudier B, Boursion MT, Zurawski B, et al. Nivolumab plus Cabozantinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Mar 4;384(9):829–41. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2026982>
 15. Harrison MR, Costello BA, Bhavsar NA, Vaishampayan U, Pal SK, Zakharia Y, et al. Active surveillance of metastatic renal cell carcinoma: Results from a prospective observational study (MaRCC). *Cancer* [Internet]. 2021 Jul 25;127(13):2204–12. Available from: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.33494>
 16. Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The Results of Radical Nephrectomy for Renal Cell Carcinoma. *J Urol* [Internet]. 1969 Mar;101(3):297–301. Available from: <http://www.jurology.com/doi/10.1016/S0022-5347%2817%2962331-0>
 17. Paner GP, Stadler WM, Hansel DE, Montironi R, Lin DW, Amin MB. Updates in the Eighth Edition of the Tumor-Node-Metastasis Staging Classification for Urologic

- Cancers. *Eur Urol* [Internet]. 2018 Apr;73(4):560–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0302283817310643>
18. Parosanu AI, Baston C, Stanciu IM, Parlog CF, Nitipir C. Second-Line Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma in the Era of Predictive Biomarkers. *Diagnostics* (Basel, Switzerland) [Internet]. 2023 Jul 20;13(14). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37510173>
 19. Sakai I, Miyake H, Takenaka A, Fujisawa M. Expression of potential molecular markers in renal cell carcinoma: impact on clinicopathological outcomes in patients undergoing radical nephrectomy. *BJU Int* [Internet]. 2009 Oct;104(7):942–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19388989>
 20. Shen C, Kaelin WG. The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2013 Feb;23(1):18–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22705278>
 21. Joosten SC, Smits KM, Aarts MJ, Melotte V, Koch A, Tjan-Heijnen VC, et al. Epigenetics in renal cell cancer: mechanisms and clinical applications. *Nat Rev Urol* [Internet]. 2018;15(7):430–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29867106>
 22. Dalgliesh GL, Furge K, Greenman C, Chen L, Bignell G, Butler A, et al. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature* [Internet]. 2010 Jan 21;463(7279):360–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20054297>
 23. Varela I, Tarpey P, Raine K, Huang D, Ong CK, Stephens P, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature* [Internet]. 2011 Jan 27;469(7331):539–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248752>
 24. Hsieh JJ, Chen D, Wang PI, Marker M, Redzematovic A, Chen YB, et al. Genomic Biomarkers of a Randomized Trial Comparing First-line Everolimus and Sunitinib in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* [Internet]. 2017;71(3):405–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27751729>
 25. da Costa WH, da Cunha IW, Fares AF, Bezerra SM, Shultz L, Clavijo DA, et al. Prognostic impact of concomitant loss of PBRM1 and BAP1 protein expression in early stages of clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol* [Internet]. 2018 May;36(5):243.e1–243.e8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29426696>

26. Kim SH, Park WS, Park EY, Park B, Joo J, Joung JY, et al. The prognostic value of BAP1, PBRM1, pS6, PTEN, TGase2, PD-L1, CA9, PSMA, and Ki-67 tissue markers in localized renal cell carcinoma: A retrospective study of tissue microarrays using immunohistochemistry. Lee JW, editor. PLoS One [Internet]. 2017 Jun 27;12(6):e0179610. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0179610>
27. Uemura M, Nakaigawa N, Sassa N, Tatsugami K, Harada K, Yamasaki T, et al. Prognostic value of programmed death-ligand 1 status in Japanese patients with renal cell carcinoma. *Int J Clin Oncol* [Internet]. 2021 Nov 21;26(11):2073–84. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s10147-021-01993-x>
28. Clucas J, Valderrama F. ERM proteins in cancer progression. *J Cell Sci* [Internet]. 2015;128(6):1253–1253. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.170027>
29. Liang F, Wang Y, Shi L, Zhang J. Association of Ezrin expression with the progression and prognosis of gastrointestinal cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Nov 3;8(54). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/21473>
30. Tang R, Li FX, Shao WF, Wen QS, Yu XR, Xiong JB. Protein-protein interaction between ezrin and p65 in human breast cancer cells. *Genet Mol Res* [Internet]. 2016;15(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27420986>
31. Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2002;3(8):586–99. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm882>
32. Tsukita S. ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 1997;9(1):70–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067497801548>
33. Chen X, Khajeh JA, Ju JH, Gupta YK, Stanley CB, Do C, et al. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate clusters the cell adhesion molecule CD44 and assembles a specific CD44-Ezrin heterocomplex, as revealed by small angle neutron scattering. *J Biol Chem*. 2015;290(10):6639–52.
34. Hébert M, Potin S, Sebbagh M, Bertoglio J, Bréard J, Hamelin J. Rho-ROCK-Dependent Ezrin-Radixin-Moesin Phosphorylation Regulates Fas-Mediated Apoptosis in Jurkat Cells. *J Immunol* [Internet]. 2008 Nov 1;181(9):5963–73. Available from:

- <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.181.9.5963>
35. Ng T. Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. *EMBO J* [Internet]. 2001 Jun 1;20(11):2723–41. Available from: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/20.11.2723>
 36. Sperka T, Geißler KJ, Merkel U, Scholl I, Rubio I, Herrlich P, et al. Activation of Ras Requires the ERM-Dependent Link of Actin to the Plasma Membrane. Skoulakis EMC, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011 Nov 21;6(11):e27511. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0027511>
 37. Bonaccorsi L, Carloni V, Muratori M, Formigli L, Zecchi S, Forti G, et al. EGF receptor(EGFR) signaling promoting invasion is disrupted in androgen-sensitive prostate cancer cells by an interaction between EGFR and androgen receptor(AR). *Int J Cancer* [Internet]. 2004 Oct 20;112(1):78–86. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.20362>
 38. Wang X, Liu M, Zhao CY. Expression of ezrin and moesin related to invasion, Metastasis and prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma. *Genet Mol Res*. 2014;13(3):8002–13.
 39. Tuna B, Yorukoglu K, Mazzucchelli R, Mungan U, Secil M, Montironi R, et al. Ezrin immunoreactivity in renal cell carcinomas. *Anal Quant Cytol Histol* [Internet]. 2009 Oct;31(5):340–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20701102>
 40. Yu N, Fu S, Liu Y, Xu Z, Liu Y, Hao J, et al. miR-96 suppresses renal cell carcinoma invasion via downregulation of Ezrin expression. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2015;34:107. Available from: [/pmc/articles/PMC4588898/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC4588898/?report=abstract)
 41. Cetin B, Gonul I, Buyukberber S, Afsar B, Gumusay O, Alg??n E, et al. The impact of immunohistochemical staining with ezrin-carbonic anhydrase IX and neuropilin-2 on prognosis in patients with metastatic renal cell cancer receiving tyrosine kinase inhibitors. *Tumor Biol*. 2015;36(11):8471–8.
 42. Cetin B, Gonul I, Gumusay O, Afsar B, Bilgetekin I, Ozet A, et al. Ezrin is a prognostic biomarker in patients with clear cell metastatic renal cell carcinoma receiving sunitinib. *J Cancer Res Ther* [Internet]. 2021;17(2):408. Available from: https://journals.lww.com/10.4103/jcrt.JCRT_372_18
 43. Srigley JR, Delahunt B, Eble JN, Egevad L, Epstein JI, Grignon D, et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia. *Am*

- J Surg Pathol [Internet]. 2013 Oct;37(10):1469–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24025519>
44. Ferrari MVO, da Costa WH, Matushita MAM, Meduna RR, Brazao ES, Bezerra SM, et al. Immunohistochemical negative expression of ezrin predicts poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. Urol Oncol [Internet]. 2020 Mar;38(3):75.e1-75.e7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31648868>
 45. da Costa WH, Rezende M, Carneiro FC, Rocha RM, da Cunha IW, Carraro DM, et al. Polybromo-1 (PBRM1), a SWI/SNF complex subunit is a prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. BJU Int [Internet]. 2014 May;113(5b):E157-63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24053427>
 46. Bible KC, Kebebew E, Brierley J, Brito JP, Cabanillas ME, Clark TJ, et al. 2021 American Thyroid Association Guidelines for Management of Patients with Anaplastic Thyroid Cancer. Thyroid [Internet]. 2021 Mar 1;31(3):337–86. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/thy.2020.0944>
 47. Baez-Navarro X, van Bockstal MR, Nawawi D, Broeckx G, Colpaert C, Doebar SC, et al. Interobserver Variation in the Assessment of Immunohistochemistry Expression Levels in HER2-Negative Breast Cancer: Can We Improve the Identification of Low Levels of HER2 Expression by Adjusting the Criteria? An International Interobserver Study. Mod Pathol [Internet]. 2023 Jan;36(1):100009. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0893395222000096>
 48. Palou J, Algaba F, Vera I, Rodriguez O, Villavicencio H, Sanchez-Carbayo M. Protein Expression Patterns of Ezrin Are Predictors of Progression in T1G3 Bladder Tumours Treated with Nonmaintenance Bacillus Calmette-Guérin. Eur Urol. 2009;56(5):829–36.
 49. Andersson G, Wennersten C, Gaber A, Boman K, Nodin B, Uhlén M, et al. Reduced expression of ezrin in urothelial bladder cancer signifies more advanced tumours and an impaired survival : validatory study of two independent patient cohorts. 2014;1–8.
 50. Moilanen J, Lassus H, Leminen A, Vaheri A, Bützow R, Carpén O. Ezrin immunoreactivity in relation to survival in serous ovarian carcinoma patients. Gynecol Oncol. 2003;90(2):273–81.
 51. Gautreau A, Pouillet P, Louvard D, Arpin M. Ezrin, a plasma membrane-microfilament linker, signals cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1999 Jun 22;96(13):7300–5. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10377409>
52. Curto M, McClatchey AI. Ezrin...a metastatic determinant? *Cancer Cell* [Internet]. 2004 Feb;5(2):113–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14998486>
 53. Hiscox S, Jiang WG. Ezrin regulates cell-cell and cell-matrix adhesion, a possible role with E-cadherin/beta-catenin. *J Cell Sci* [Internet]. 1999 Sep;112 Pt 18:3081–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10462524>
 54. Li J, Li L, Li Z, Gong G, Chen P, Liu H, et al. The role of miR-205 in the VEGF-mediated promotion of human ovarian cancer cell invasion. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2015 Apr;137(1):125–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825815005351>
 55. Ognibene M, Pezzolo A. Ezrin interacts with the tumor suppressor CHL1 and promotes neuronal differentiation of human neuroblastoma. Pizzo S V., editor. *PLoS One* [Internet]. 2020 Dec 16;15(12):e0244069. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0244069>
 56. Cash T, Yin H, McCracken C, Geng Z, DuBois SG, Shehata BM, et al. Correlation of Ezrin Expression Pattern and Clinical Outcomes in Ewing Sarcoma. *Sarcoma* [Internet]. 2017;2017:1–7. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/sarcoma/2017/8758623/>
 57. Oda Y, Aishima S, Morimatsu K, Hayashi A, Shindo K, Fujino M, et al. Differential ezrin and phosphorylated ezrin expression profiles between pancreatic intraepithelial neoplasia, intraductal papillary mucinous neoplasm, and invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Hum Pathol* [Internet]. 2013 Aug;44(8):1487–98. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0046817712004492>
 58. Grune T, Reinheckel T, North JA, Li R, Bescos PB, Shringarpure R, et al. Ezrin turnover and cell shape changes catalyzed by proteasome in oxidatively stressed cells. *FASEB J* [Internet]. 2002 Oct;16(12):1602–10. Available from: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.02-0015com>
 59. Barros FBA, Assao A, Garcia NG, Nonogaki S, Carvalho AL, Soares FA, et al. Moesin expression by tumor cells is an unfavorable prognostic biomarker for oral cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 2018 Dec 8;18(1):53. Available from: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-017-3914-0>

Anexo 1

Carta de aprovação do projeto de pesquisa no CEP (2020)



A.C. Camargo Cancer Center
Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

**COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP**

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de 12/05/2020, aprovaram a realização do projeto nº. 2866/20 intitulado: "ESTUDO DO VALOR PROGNÓSTICO E DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE EZRINA E MOESINA EM METÁSTASES DE CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIAS DO TIPO CÉLULAS CLARAS."

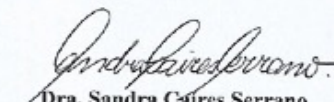
Pesquisador Responsável: Walter Henriques da Costa

Aluno: Marcos Vinicius Odorissio Ferrari (Doutorado)

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

São Paulo, 18 de maio de 2020.

Atenciosamente,


Dra. Sandra Caíres Serrano
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1