

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA
E VALOR PROGNÓSTICO DA ERITROPOETINA
(EPO) E DO SEU RECEPTOR (EPO-R)
EM CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS**

DANIEL BELTRAME FERREIRA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Stênio de Cássio Zequi

Co-Orientador: Dr. Rafael Malagoli Rocha

São Paulo

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Ferreira, Daniel Beltrame

Análise da expressão imuno-histoquímica e valor prognóstico da eritropoetina (EPO) e do seu receptor (EPO-R) em carcinoma de células renais / Daniel Beltrame Ferreira – São Paulo, 2014.

140p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Oncologia.

Orientador: Stênio de Cássio Zequi

Descritores: 1. NEOPLASIAS RENAIAS. 2. IMUNO-HISTOQUÍMICA. 3. FATORES PROGNÓSTICOS. 4. ERITROPOETINA. 5. RECEPTOR DE ERITROPOETINA.

DEDICATÓRIA

A Deus, por me guiar pelos caminhos corretos,
renovar as minhas forças e me tornar perseverante.

Aos meus queridos e amados pais, Péricles e Maria Aparecida,
pelo amor, carinho, respeito e educação
valores fundamentais na minha vida.

À minha esposa Juliana, o meu grande amor.
Agradeço a Deus por me presentear com a sua vida.

À minha filha Beatriz, ainda tão pequena e doce.
Não imaginava que poderia existir amor assim.
Minha vida é para você.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Péricles, Mãe Maria Aparecida e meu irmão

“Pelo carinho, amor e pelos ensinamentos de toda uma vida, bases para um ser humano digno e correto”.

À minha amada esposa Juliana

“Obrigado pelo carinho, amor, paciência nos dias difíceis e pelo cuidado com a nossa família, nosso bem mais precioso”.

Aos meus sogros Irineu e Lenita

“Obrigado pelo carinho, preocupação e ajuda nos cuidados de nossa pequena Beatriz, possibilitando tranquilidade para realização o desse projeto”.

Ao Prof. Dr. Stênio de Cássio Zequi

“Pessoa de caráter ímpar e inteligência excepcional, modelo de médico e pesquisador. Obrigado pela paciência, pelo incentivo e pelos ensinamentos. Sou seu aluno, admirador e amigo, conte comigo”

Ao Prof. Dr. Rafael Malagoli Rocha,

“Meu co-orientador, membro do Departamento de Anatomia Patológica e responsável pelo setor de imuno-histoquímica do A.C. Camargo Cancer Center. Obrigado pelo apoio na elaboração do projeto, orientação e competência.”

Ao Prof. Dr. Fernando Soares

“Diretor do Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center, pela receptividade e confiança.”

Ao Prof. Dr. Gustavo Guimarães

“Diretor do Núcleo de Urologia do A.C. Camargo Cancer Center, exemplo de liderança e pelo apoio direta ou indiretamente.”

Ao Dr. Diego Abreu Clavijo e Dr. Ricardo Décia

“Médicos urologistas do Hospital Pasteur, Uruguai, pela participação indispensável nesse projeto e contribuição com a nossa casuística que tanto abrilhantou o nosso trabalho.”

Aos colegas urologistas do Núcleo de Urologia, Dr. Thiago Borges Marques Santana, Dr. Rodrigo de Souza Madeira Campos, Dr. Ricardo de Lima Favaretto, Carlos Alberto Ricetto Sacomani e Dr. Renato Almeida Rosa de Oliveira

“Pelo apoio irrestrito e confiança em todas as fases do projeto.”

Ao Dr. Walter Henriques da Costa

“Membro titular do Núcleo de Urologia do A.C. Camargo Cancer Center e pessoa de grande competência e dedicação. Obrigado pela amizade, oportunidade e ajuda essencial na elaboração desse projeto.”

À Dra. Luciana Schultz

“Pelas orientações nas análises das reações, pelo tempo dedicado e pela excelência no trabalho.”

À Dra. Isabela Werneck da Cunha e Dra. Stephania Martins Bezerra

“Pelas orientações, paciência e tempo dispendido para as revisões de lâminas e no processo de elaboração do TMA.”

À Mariana Rezende Alves

“Pela realização das reações imuno-histoquímicas o meu agradecimento pela atenção e cuidado.”

Aos colegas de pós graduação

“Pelo tempo compartilhado, ajuda mútua e perseverança.”

Ao Carlinhos e ao Seven do Departamento de Patologia

“Pela ajuda indispensável na elaboração e organização do TMA.”

Aos amigos de residência médica do Hospital do Servidor Público Municipal de São Paulo, Dr. Alberto de Figueiredo, Dr. Eduardo Hidenobu Taromaru, Dr. Charles Villacorta de Barros e Dr. Lucas Ballarotti

“Pelo convívio, pela amizade e pelos anos compartilhados em nosso processo de treinamento, pessoas formidáveis e amizade para a vida inteira.”

Ao A.C. Camargo Cancer Center e seu programa de pós-graduação pela receptividade e oportunidade oferecida.

À Sra. Suely Francisco

“Bibliotecária do A.C. Camargo Cancer Center, obrigado pela presteza no atendimento, pela paciência, bom humor e pela ajuda no processo de formatação.”

Às Sras. Luciana Pitombeira, Vanuza Rodrigues e Ana Maria Kuninari da Pós-Graduação do A.C. Camargo Cancer Center pela ajuda e orientações.

RESUMO

Ferreira DB. **Análise da expressão imuno-histoquímica e valor prognóstico da eritropoetina (EPO) e do seu receptor (EPO-R) em carcinoma de células renais.** São Paulo; 2014. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O carcinoma de células renais (CCR) corresponde a 3% das neoplasias malignas em adultos e sua incidência está aumentando nos últimos 20 anos, apesar dos recentes avanços no diagnóstico e tratamento dessa neoplasia. A evolução do CCR apresenta natureza imprevisível e a busca de novos marcadores moleculares para o melhor entendimento da biologia tumoral são necessários. Nesse estudo, foram avaliadas as expressões imuno-histoquímicas de EPO e EPO-R de 220 pacientes portadores de CCR e no tecido benigno adjacente, as associações com os fatores clínicos e patológicos principais e o seu impacto prognóstico na SG, SCE e SLD. **Casuística e métodos:** Dados epidemiológicos, clínicos e patológicos foram coletados. As reações imuno-histoquímicas de EPO e EPO-R foram avaliadas pelo método de *tissue microarray*. A leitura das reações foi manual e os pacientes foram classificados em baixa e alta expressão dos marcadores analisados. De forma qualitativa, as reações foram também estratificadas como ausentes ou presentes. **Resultados:** A expressão imuno-histoquímica de EPO e EPO-R foi maior no tecido renal não neoplásico (benigno) em comparação ao CCR. Observou-se associação da expressão desses marcadores com critérios de pior prognóstico. Ausência de expressão de EPO e EPO-R estava presente em 21,8% e 41,7% dos casos, respectivamente. A expressão de EPO influenciou as taxas de SG e SCE nas análises univariadas e multivariadas. A expressão de EPO-R não apresentou impacto nas taxas de sobrevida estudadas. **Conclusão:** A perda de expressão de EPO pela análise qualitativa, foi fator prognóstico independente desfavorável para SG e SCE. A expressão de EPO-R não influenciou as taxas de sobrevida avaliadas.

SUMMARY

Ferreira DB. **[Immunohistochemical analysis and evaluation of prognostic value of the expression of erythropoietin (EPO) and its receptor (EPO-R) in renal cell carcinoma]**. São Paulo; 2014. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Renal cell carcinoma (RCC) accounts for 3% of malignant neoplasms in adults, and its incidence has increased over the last 20 years, despite recent advances in the diagnosis and treatment of this malignancy. The RCC evolution is unpredictable. New studies for molecular markers evaluation are needed to better understanding of tumor biology. In this study, the immunohistochemical expression of EPO and EPO-R of 220 patients with RCC and adjacent benign tissue were evaluated. Furthermore, we evaluated the associations with the main clinical and pathological prognostic factors and their impact on survival rates. **Methods:** Epidemiological, clinical and pathological data were collected. The immunohistochemical reactions of EPO and EPO-R were evaluated by tissue microarray method. Reading reactions was manual and the patients were classified into low and high expression of markers analyzed. Qualitatively, the reactions were also stratified as absent or present. **Results:** The immunohistochemical expression of EPO and EPO-R was higher in non-neoplastic renal tissue (benign) compared to RCC. An association of the expression of these markers with criteria of poor prognosis was observed. Lack of expression of EPO and EPO-R was detected in 21.8% and 41.7% of the cases, respectively. The expression of EPO influenced rates of SG and SCE in univariate and multivariate analyzes. The expression of EPO-R showed no impact on survival rates studied. **Conclusion:** The loss of EPO expression by qualitative analysis, was an independent prognostic factor for unfavorable OS and DES. The expression of EPO-R did not influence survival rates evaluated.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	A via VHL-HIF-EPO na progressão do CCR.....	24
Figura 2	A via de sinalização da EPO-R.....	27
Figura 3	Demonstração esquemática do método de TMA.....	31
Figura 4	Gráfico descritivo de Boxplot demonstrando grau de expressão de EPO em tecido não neoplásico (n=51) e em CCR (n=220).....	52
Figura 5	Fotomicrografias dos padrões de expressão imunohistoquímica de EPO nos diferentes tecidos considerados (aumento original 400x).....	53
Figura 6	Gráfico descritivo de Boxplot demonstrando o grau de expressão de EPO-R em tecido não neoplásico (n=50) e em CCR (n=213).....	61
Figura 7	Fotomicrografias dos padrões de expressão imunohistoquímica de EPO-R nos diferentes tecidos considerados (aumento original 400x).....	62
Figura 8	Curva de sobrevida global aos 120 meses para os 220 pacientes portadores de CCR.....	69
Figura 9	Curva de sobrevida global em 120 meses para os pacientes portadores de CCR estratificados em baixo e alto grau de expressão de EPO.....	73

Figura 10	Curva de sobrevida global em 120 meses para os pacientes portadores de CCR estratificados em baixo e alto grau de expressão de EPO-R.....	74
Figura 11	Curva de sobrevida global em 120 meses para os pacientes portadores de CCR de acordo com estratificação qualitativa da expressão de EPO.....	76
Figura 12	Curva de sobrevida câncer específica em 120 meses para os 220 pacientes portadores de CCR.....	78
Figura 13	Curva de sobrevida câncer específica em 120 meses para os pacientes portadores de CCR estratificados em baixo e alto grau de expressão de EPO.....	83
Figura 14	Curva de sobrevida câncer específica em 120 meses para os pacientes portadores de CCR estratificados em baixo e alto grau de expressão de EPO-R.....	84
Figura 15	Curva de sobrevida câncer específica em 120 meses para os pacientes portadores de CCR de acordo com estratificação qualitativa de expressão de EPO.....	86
Figura 16	Curva de sobrevida livre de doença em 120 meses (n=193)....	88
Figura 17	Curva de sobrevida livre de doença em 120 meses para os pacientes portadores de CCR estratificados em baixo e alto grau de expressão de EPO (p=0,228).....	92
Figura 18	Curva de sobrevida livre de doença em 120 meses para os pacientes portadores de CCR estratificados em baixo e alto grau de expressão de EPO-R (p=0,849).....	93

Figura 19	Curva de sobrevida livre de doença em 120 meses para os pacientes portadores de CCR de acordo com estratificação qualitativa da expressão de EPO (p=0,291).....	95
Figura 20	Curva de sobrevida livre de doença em 120 meses para os pacientes portadores de CCR de acordo com estratificação qualitativa da expressão de EPO-R (p=0,052).....	96

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Tipos histológicos e respectivas alterações citogenéticas de carcinomas de células renais.....	5
Quadro 2	Estadiamento TNM para câncer renal.....	13
Quadro 3	Lista de anticorpos primários utilizados no estudo imunohistoquímico.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variáveis epidemiológicas dos pacientes portadores de CCR (n=220).....	47
Tabela 2	Variáveis clínicas dos pacientes portadores de CCR (n=220).....	48
Tabela 3	Variáveis terapêuticas dos pacientes portadores de CCR (n=220).....	49
Tabela 4	Variáveis anatomopatológicas dos pacientes portadores de CCR (n=220).....	50
Tabela 5	Variáveis relacionadas ao estadiamento dos pacientes portadores de CCR (n=220).....	51
Tabela 6	Desfechos clínicos após o tratamento do tumor primário e situação clínica aos 10 anos do estudo dos pacientes portadores de CCR (n=220).....	51
Tabela 7	Expressão de EPO segundo variáveis clínicas e demográficas de 220 pacientes portadores de CCR.....	55
Tabela 8	Expressão de EPO segundo variáveis anatomopatológicas dos 220 pacientes portadores de CCR.....	57
Tabela 9	Expressão qualitativa de EPO segundo variáveis clínicas e demográficas dos 220 pacientes portadores de CCR.....	59
Tabela 10	Expressão qualitativa de EPO segundo variáveis anatomopatológicas dos 220 pacientes portadores de CCR...	60

Tabela 11	Expressão quantitativa de EPO-R segundo variáveis clínicas e demográficas de 213 pacientes portadores de CCR.....	63
Tabela 12	Expressão quantitativa de EPO-R segundo variáveis anatomopatológicas dos 213 pacientes portadores de CCR...	65
Tabela 13	Expressão qualitativa de EPO-R segundo variáveis clínicas e demográficas de 213 pacientes portadores de CCR.....	67
Tabela 14	Expressão qualitativa de EPO-R segundo variáveis anatomopatológicas de 213 pacientes portadores de CCR.....	68
Tabela 15	Probabilidade acumulada de SG de portadores de CCR aos 5 anos e 10 anos de seguimento de acordo com variáveis clínicas.....	71
Tabela 16	Probabilidade acumulada de SG de portadores de CCR aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo com variáveis anatomopatológicas.....	72
Tabela 17	Probabilidade acumulada de SG de portadores de CCR aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo o grau de expressão de EPO e EPO-R.....	73
Tabela 18	Análise multivariada do risco de óbito por variáveis selecionadas em portadores de CCR.....	75
Tabela 19	Probabilidade acumulada de SG de portadores de CCR aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo com a expressão qualitativa de EPO e EPO-R.....	75

Tabela 20	Análise multivariada do risco de óbito por variáveis selecionadas em portadores de CCR.....	77
Tabela 21	Probabilidade acumulada de sobrevida SCE de portadores de CCR aos 5 anos e 10 anos de seguimento de acordo com variáveis clínicas.....	79
Tabela 22	Probabilidade acumulada de SCE de portadores de CCR aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo com variáveis anatomopatológicas.....	81
Tabela 23	Probabilidade acumulada de SCE de portadores de CCR aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo o grau de expressão de EPO e EPO-R.....	82
Tabela 24	Análise multivariada do risco de óbito específico por variáveis selecionadas em portadores de CCR.....	85
Tabela 25	Probabilidade acumulada de SCE de portadores de CCR aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo com a expressão qualitativa de EPO e EPO-R.....	85
Tabela 26	Análise multivariada do risco de óbito específico por variáveis selecionadas em portadores de CCR.....	87
Tabela 27	Probabilidade acumulada de SLD de portadores de CCR aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo com variáveis clínicas e demográficas.....	89
Tabela 28	Probabilidade acumulada de SLD de portadores de CCR aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo com variáveis anatomopatológicas.....	91

Tabela 29	Probabilidade acumulada de SLD de portadores de CCR aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo o grau de expressão de EPO e EPO-R.....	92
Tabela 30	Análise multivariada do risco de recidiva por variáveis selecionadas em portadores de CCR não metastático.....	94
Tabela 31	Probabilidade acumulada de SLD de portadores de CCR aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo com a expressão qualitativa de EPO e EPO-R.....	94
Tabela 32	Análise multivariada do risco de recidiva por variáveis selecionadas em portadores de CCR não metastático.....	97

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AJCC	American Joint Comitite on Cancer
ASA	American Society of Anesthesiology
CCR	Carcinoma de Células Renais
CCR	Carcinoma de células renais
DHL	Desidrogenase láctica
ECOG	Eastern Cooperative Oncologic Group
HIF – 1	Hipoxya Inducible Factor 1
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
IHQ	Imuno-histoquímica
ILM	Invasão linfática microscópica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRA	Insuficiência renal aguda
IRC	Insuficiência renal crônica
IVM	Invasão vascular microscópica
KPS	Karnofsky Performance Status
MSKCC	Memorial Sloan Kettering Cancer Center-MSKCC
Mtor	Mamalian Target of Rapamicin
NP	Nefrectomia parcial
NR	Nefrectomia radical
PCR	Polymerase chain reaction
PS	Performance status
SCE	Sobrevida câncer especifica
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
SRM	do inglês, <i>small renal masses</i>
TMA	Tissue microarray
TNM	Tumor-node-metastasis
UCLA	University of California Los Angeles
UICC	Union for International Cancer Control

UISS	UCLA Integrate Staging System
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	Von Hippel Lindau

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Justificativa do estudo	1
1.2	Revisão de literatura.....	3
1.2.1	Epidemiologia	3
1.2.2	Aspectos clinicopatológicos.....	4
1.2.3	Diagnóstico	6
1.2.4	Tratamento	8
1.3	Fatores prognósticos	10
1.3.1	Fatores clínicos, anatômicos e histopatológicos.....	10
1.3.2	Fatores biomoleculares e genéticos	20
1.3.3	O papel da hipóxia no CCR (a via VHL-HIF-EPO)	22
1.3.4	A eritropoetina (EPO) e o seu receptor (EPO-R).....	24
1.3.5	O Tissue Microarray (TMA)	29
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo Principal.....	32
2.2	Objetivos Secundários.....	32
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	33
3.1	População do estudo	33
3.1.1	Crítérios de inclusão	33
3.1.2	Crítérios de exclusão	33
3.2	Metodologia	34
3.2.1	Diagnóstico e estadiamento	35
3.2.2	Procedimento cirúrgico	36
3.2.3	Seguimento	36
3.3	Confecção do TMA.....	37
3.4	Técnica de imuno-histoquímica	38
3.5	Análise das reações (padronização)	40
3.6	Estatística	41
3.7	Análise de riscos e aspectos éticos.....	43
3.8	Casuística.....	44

4	RESULTADOS	52
4.1	Reações imuno-histoquímicas da EPO	52
4.1.1	Análise qualitativa da expressão de EPO.....	58
4.2	Reações imuno-histoquímicas do EPO-R	61
4.2.1	Análise qualitativa da expressão de EPO-R.....	66
4.3	Análise de sobrevida	69
4.3.1	Sobrevida global.....	69
4.3.2	Análise de SG com estratificação qualitativa de EPO e EPO-R.....	75
4.3.3	Sobrevida câncer específica.....	78
4.3.4	Análise de SCE com estratificação qualitativa de EPO e EPO-R.....	85
4.3.5	Sobrevida livre de doença (SLD).....	87
4.3.6	Análise de SLD com estratificação qualitativa de EPO e EPO-R	94
5	DISCUSSÃO	98
5.1	Aspectos Gerais	98
5.2	Imuno-histoquímica de EPO e EPO-R	120
6	CONCLUSÕES	123
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	121

ANEXOS

- Anexo 1** Classificação de performance/status de Karnofsky (KPS)
- Anexo 2** Classificação de performance/status do ECOG: Eastern Cooperative Oncologic Performance Status Classification
- Anexo 3** Ficha de levantamento de dados
- Anexo 4** Estadiamento clínico da American Joint Committee on Cancer (AJCC Cancer Staging)
- Anexo 5** Graduação histológica de Fuhrman
- Anexo 6** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP do A.C. Camargo Cancer Center
- Anexo 7** Carta de aprovação do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

1 INTRODUÇÃO

1.1 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O carcinoma de células renais (CCR) corresponde a 3% das neoplasias malignas do adulto, muitas vezes com apresentação heterogênea e evolução imprevisível (WALLEN et al. 2007). Aproximadamente 30% dos pacientes se apresentam com metástases ao diagnóstico e até metade dos pacientes podem desenvolver metástases durante o seguimento, mesmo após tratamento de doença localizada (KONTAK e CAMPBELL 2003; JEMAL et al. 2007).

Notadamente, a maioria das informações sobre prognóstico são baseadas em variáveis clinicopatológicas como estadiamento TNM, grau, tipo histológico, arranjo arquitetural e acometimento linfonodal. No entanto, tumores com as mesmas características e tratamento podem apresentar evoluções distintas (UNO et al. 2004; LAM et al. 2005). Apesar desses fatores, nenhum fator prognóstico isolado é capaz de prever com acurácia os desfechos clinicopatológicos. A associação de fatores em modelos como nomogramas podem auxiliar no manejo desses pacientes, embora ainda com limitações (KATTAN et al. 2001; MOTZER et al. 2004).

Recentemente, muitos estudos estão avaliando os aspectos biomoleculares em busca de novos marcadores que, somados aos fatores

prognósticos clássicos, podem predizer com maior acurácia a evolução dos portadores de CCR (NOGUEIRA e KIM 2008; VICKERS e HENG 2010).

Recentemente, a eritropoetina (EPO) e seu receptor (EPO-R) foram localizados em inúmeros tecidos não hematopoiéticos como fígado, útero, sistema nervoso central, células endoteliais e diversos tumores sólidos malignos (FARRELL e LEE 2004; JELKMANN e WAGNER 2004). Os efeitos da EPO na estimulação da eritropoiese são conhecidos, no entanto, nos tecidos não hematopoiéticos e nos tumores acredita-se que esse hormônio possa estimular a angiogênese, promover a proliferação celular e inibir a apoptose (RIBATTI et al. 1999; MICHAEL et al. 2007).

O rim pode ser considerado um órgão endócrino pela produção de eritropoetina (EPO). A maioria dos CCR são originários dos túbulos contorcidos proximais, local em que a maioria dos autores descrevem como o sítio de produção desse hormônio (ECKARDT 1996; WESTENFELDER et al. 1999). Portanto, entender o papel da eritropoietina nessas neoplasias se constitui um tema importante.

Em tese, a descoberta de fatores prognósticos seguros pode ser útil no diagnóstico, prognóstico e planejamento terapêutico desses pacientes. Fatores prognósticos biomoleculares poderão permitir avanços significativos nos aspectos prognósticos e, eventualmente, na individualização terapêutica.

1.2 REVISÃO DA LITERATURA

1.2.1 Epidemiologia

O carcinoma de células renais (CCR) corresponde a 2-3% das neoplasias malignas em adultos e tem apresentado uma incidência crescente ao longo das últimas décadas (JEMAL et al. 2009). Estimativas norte-americanas revelam que cerca de 65.150 novos casos serão diagnosticados em 2013 com cerca de 13.680 mortes (American Cancer Society-ACS 2013). A notificação de novos casos de CCR no Brasil é muito deficiente, no entanto, a Organização Mundial de Saúde, por meio do Projeto Globocan, estima que cerca de 4.176 casos foram diagnosticados em 2008 com cerca de 2316 mortes (FERLAY et al. 2008). A incidência no Brasil varia de 7 a 10 casos por 100.000 habitantes / ano, principalmente nas regiões mais industrializadas (WÜNSCH-FILHO 2002). Trata-se de tumor mais frequente em homens numa proporção de 2:1 em relação ao sexo feminino, sendo mais prevalente entre os 50 e 70 anos de idade (HOWLADER et al. 2012).

Existem diversos fatores de risco reconhecidos para o CCR com impacto e relevância variáveis. Tabagismo e obesidade são os fatores de risco com associação positiva mais bem estabelecidos. Outros fatores de risco descritos são hipertensão arterial, uso de diuréticos e medicações anti-hipertensivas, história familiar de CCR, dieta pobre em frutas e vegetais, insuficiência renal crônica terminal, esclerose tuberosa, doença renal cística adquirida e fatores ocupacionais como exposição ao asbesto, gasolina ou

tricloroetileno. (LIPWORTH et al. 2006; CHOW et al. 2010). Os exercícios físicos e o consumo de álcool podem oferecer um efeito protetor para o desenvolvimento de CCR, embora essa associação seja discutível (LEE et al. 2007; MOORE et al. 2008). O CCR pode apresentar incidência do tipo esporádica em até 95% dos casos ou estar associado à síndromes familiares de CCR, como as caracterizadas pelas alterações do gene VHL (Von Hippel-Lindau), a Síndrome de Birt-Hogg-Dube (BHD) e a Síndrome do Carcinoma Renal Papilífero Hereditário (EDGE et al. 2009).

1.2.2 Aspectos Clinicopatológicos

O termo carcinoma de células renais (CCR) designa as neoplasias renais de origem epitelial com potencial maligno. A classificação atual de CCR foi proposta em 2004 pela *World Health Organization* (WHO) e divide o CCR em diversos subtipos histológicos padronizados devido à diferenças citogenéticas, fenotípicas e clínicas. Essa classificação morfológica em categorias implica em diferenças importantes no prognóstico e manejo desses pacientes. Cerca de 85% dos tumores renais são adenocarcinomas e a maioria derivados dos túbulos proximais (LOPEZ-BELTRAN et al. 2009). O **Quadro 1** apresenta os tipos histológicos e suas respectivas alterações citogenéticas e prevalências.

Os sinais e sintomas mais comuns são dor lombar ou no flanco, massa palpável e hematúria, associado ou não à emagrecimento, febre, sudorese noturna, varicocele e hipertensão. As síndromes paraneoplásicas podem acometer 20% dos pacientes portadores de CCR e são

caracterizadas por anemia, hipertensão, disfunção hepática, caquexia, hipercalcemia, febre, perda de peso e policitemia (CHISHOLM 1974; GELB 1997).

Quadro 1 - Tipos histológicos e respectivas alterações citogenéticas de carcinomas de células renais.

Tipo histológico	Prevalência	Alterações citogenéticas
Células claras	75%	-3p, +5q22, -6q, -8p, -9p, -14q
Papilífero	10%	+3q, +7, +8, +12, +16, +17, +20, -Y
Cromóforo	5%	-1, -2, -6, -10, -17, -21, hipoploidia
Ductos coletores (Bellini)	1%	-1q, -6p, -8p, -13q, -21q, -3p
Não classificados	4% - 6%	Desconhecido
Multilocular Cístico	Raro	Mutação do gene VHL
Medular	Raro	Perda do cromossomo 22
Carcinoma Tubulocístico	Raro	Trissomia do cromossomo 17
Translocação Xp11	Raro	t(X;1)(p11.2;q21), t(X;17)(p11.2;q25)
Mucinoso tubular	Raro	1, -4, -6, -8, -13, -14 +7, +11, +16, +17
Pós-neuroblastoma	Raro	Desequilíbrio alélico 20q13
Tireóide folicular carcinoma-like	Raro	+ 7q36, +8q24, +12, +16,+17p11-q11, 17
Doença renal terminal	Raro	Ganhos de cromossomos 7 e 17

Fonte: LOPEZ-BELTRAN et al. (2009)

Em estudo epidemiológico recente no Brasil, a tríade clássica (hematúria, dor em flanco e massa palpável) esteve presente em apenas 4,5%, predominando o diagnóstico incidental (NARDI et al. 2010). Sabe-se que a presença de sintomas está associado à pior prognóstico. A sobrevida câncer específica em 5 anos de pacientes sintomáticos foi de 64,1%, em

contrapartida, os pacientes assintomáticos apresentaram sobrevida de 85,2% (DALL'OGGIO et al. 2007).

1.2.3 Diagnóstico

Atualmente, o diagnóstico do CCR é achado incidental em mais da metade dos casos (LANDIS et al 1999). A maioria dos pacientes portadores de CCR não apresentam sintomas específicos que possam orientar o diagnóstico clinicamente. Desse modo, os métodos de imagem se tornam ferramentas fundamentais para o diagnóstico precoce e planejamento terapêutico.

A radiografia simples e a urografia excretora apresentam acurácia limitada na investigação dos tumores renais (WARSHAUER et al. 1988). O ultra-som (US) constitui o método mais utilizado para o rastreamento de lesões parenquimatosas localizadas (CHARBONEAU et al. 1983). As alterações altamente suspeitas à esse método (cistos renais septados, abaulamentos e nódulos sólidos) devem ser investigadas com tomografia computadorizada (TC) (SHETH et al. 2001). Em casos selecionados, como em pequenos cistos hiperdensos < 2 cm, pacientes com insuficiência renal crônica ou alergia ao meio de contraste ou na avaliação de lesões císticas complexas de difícil caracterização pelo TC, a Ressonância Nuclear Magnética (RNM) pode ser uma alternativa.

Algumas imagens sugestivas de cistos renais septados, angiomiolipomas de difícil caracterização (pobres em gordura) e lesões nodulares pequenas são mais facilmente avaliadas através da TC. Os cistos

renais são divididos criteriosamente segundo a classificação de BOSNIAK (1997) em cistos renais simples e cistos renais complexos em diversos graus. Os cistos renais complexos normalmente estão associados à CCR. Dessa forma, a TC representa o exame de maior importância na investigação, diferenciação e planejamento terapêutico dos tumores renais (SHETH et al. 2001)

A ressonância magnética (RM) é considerada um método alternativo à TC e pode ser utilizada na avaliação de lesões císticas complexas de difícil caracterização e de pequenos cistos hiperdensos menores que 2 cm (ZHANG et al. 2003).

As indicações da biópsia renal percutânea estão aumentando gradativamente devido, principalmente, ao desenvolvimento de novas técnicas com maior segurança e baixa morbidade. O aumento do diagnóstico de tumores incidentais, a descoberta de novas terapias alvo no tratamento de doenças metastáticas e o desenvolvimento de tratamentos minimamente invasivos tornam a biópsia renal uma ferramenta de grande importância, evitando cirurgias desnecessárias sobretudo em pacientes de alto risco, idosos portadores de pequenas massas renais e candidatos à protocolos de vigilância ativa (VOLPE et al. 2012). Em centros de grande experiência a acurácia desse método pode chegar até 90%, principalmente com o uso de técnicas imuno-histoquímicas e biomoleculares (VOLPE et al. 2007).

1.2.4 Tratamento

O tratamento do CCR com intenção curativa é cirúrgico. Durante muitos anos, a nefrectomia radical (NR), normatizada por ROBSON et al. (1969), foi considerada o padrão-ouro no tratamento do carcinoma renal. No entanto, verificou-se que muitos pacientes submetidos à ressecção completa do rim evoluíam com insuficiência renal crônica (IRC) e aumento do risco de complicações cardiovasculares e morte (HUANG et al. 2009). Desse modo, o conceito de cirurgia preservadora de néfrons, por meio da nefrectomia parcial (NP), se tornou alternativa para o tratamento do CCR (MILLER et al. 2006; OAKLEY et al. 2006).

Inicialmente, a NP era indicada apenas para os tumores menores que 3 cm, presença de tumores bilaterais, portadores de rim único e pacientes com insuficiência renal instalada ou iminente. Atualmente, mesmo alguns tumores selecionados maiores que 4 cm podem ser tratados com NP, com bons resultados (BECKER et al. 2006). Em estudo multicêntrico recente com mais de 1400 pacientes não foi observado diferenças na mortalidade câncer específica para pacientes T1b submetidos à nefrectomia parcial comparado com a nefrectomia radical (6% vs 9%, $p=0,6$), demonstrando a segurança oncológica e eficácia da técnica (PATARD et al. 2004b).

No tratamento cirúrgico dos tumores renais, a adrenalectomia ipsilateral deve ser realizada em tumores de alto risco como os do polo superior, tumores multifocais e de estadiamento elevado (tumores de grande volume) (TSUI et al. 2000). A linfadenectomia hilar e retroperitoneal deve ser reservada apenas para os pacientes com evidências clínicas de

acometimento linfonodal estando associado com melhora da sobrevida e provavelmente, com melhora da resposta à imunoterapia adjuvante quando indicada (PANTUCK et al. 2003).

A cirurgia pode ser realizada por via aberta ou via laparoscópica. Técnicas ablativas e pouco invasivas como crioablação e radiofrequência vem sendo empregadas como alternativa para pacientes portadores de pequenas massas renais (< 3 cm de diâmetro) e sobretudo nos pacientes com baixa expectativa de vida, alto risco cirúrgico, portadores de múltiplas comorbidades, lesões múltiplas e em pacientes com função renal comprometida (KAOUK et al. 2006).

A observação de que alguns tumores renais apresentam pouca agressividade, com crescimento lento e muitas vezes baixa mortalidade durante o curso da doença tornou a vigilância ativa uma alternativa de conduta. CHAWLA et al (2006) observaram crescimento de cerca de 0,28 cm ao ano de pequenas massas renais (diâmetro médio de 2,60 cm) submetidas à vigilância ativa e apenas 1% de progressão para doença metastática.

Historicamente, no tratamento de doença metastática renal a imunoterapia com interferon-alfa (IFN) ou interleucina-2 (IL-2) foram consideradas como alternativas embora com resultados ainda modestos (FLANIGAN et al. 2001; MCDERMOTT et al. 2005). Em revisão de 58 estudos envolvendo imunoterapia realizado pela Cochrane foram demonstrados taxas de resposta objetivas em torno de 12% e respostas completas em apenas 4% dos pacientes (COPPIN et al. 2005). Nos últimos

anos, a denominada terapia de alvo molecular, caracterizada pelo uso dos inibidores da tirosina quinase, os inibidores da serina/treonina quinases e os inibidores da via do mTOR (*mammalian target of rapamycin*) proporcionam algum controle da doença, porém com ganho ainda limitado na sobrevida (MOTZER et al. 2008; RINI 2009). Novas drogas ainda em investigação conhecidas como inibidores da via do checkpoint imunológico (Anti-PD1, Anti-PDL1, AntiCTLA4) apresentam resultados bastante promissores (TOPALIAN et al. 2012). Embora sendo amplamente avaliados em protocolos de pesquisa, na prática clínica ainda não dispomos de medicações adjuvantes ou neoadjuvantes realmente efetivas no tratamento do CCR localmente avançado ou metastático (PIRROTTA et al. 2011).

1.3 FATORES PROGNÓSTICOS

1.3.1 Fatores clínicos, anatômicos e histopatológicos

O prognóstico associado ao CCR pode variar amplamente. A maioria dos tumores renais é diagnosticado de forma incidental, no entanto, cerca de 30% dos pacientes se apresentam com doença metastática ao diagnóstico e sobrevida em 3 anos menor que 5% (JEMAL et al. 2007). A doença responde mal à quimioterapia e radioterapia convencional e as respostas às novas drogas são ainda muito modestas. Portanto, fatores prognósticos precisos são extremamente importantes para discernir pacientes com lesões de bom prognóstico, elegíveis aos tratamentos convencionais, daqueles

pacientes portadores de doença de alta agressividade que requeiram tratamento multimodal associado à cirurgia.

A sobrevida destes pacientes depende da extensão da doença no momento do diagnóstico, do performance status (PS) e de outros fatores prognósticos bem definidos na evolução do CCR, como arquitetura sarcomatóide, grau histológico nuclear, o tamanho do tumor, acometimento linfonodal e a presença de invasão microvascular intratumoral. A degeneração sarcomatóide pode estar associada a qualquer tipo histológico e invariavelmente, caracteriza doença de maior agressividade e pior prognóstico. Nos pacientes com metástases, a imunoterapia e, mais recentemente, os agentes inibidores de tirosina-quinase ou da mTOR (mammalian Target Rapamicin) são opções para o tratamento sistêmico embora apresentem ainda, resultados insatisfatórios (KONTAK e CAMPBELL 2003; FICARRA et al. 2004; GONÇALVES et al. 2004).

A maioria das informações sobre prognóstico de pacientes portadores de CCR são baseadas em variáveis clínicas e patológicas. Os fatores prognósticos clínicos são aqueles relacionados ao próprio paciente como estadio clínico, estado geral, variáveis de *performance status*, presença de sinais e sintomas e parâmetros laboratoriais como dados hematimétricos, provas inflamatórias e calcemia. Os fatores patológicos estão relacionados ao próprio tumor e são representados por estadio patológico, tipo histológico, grau nuclear de Fuhrman, tamanho tumoral, arranjo arquitetural, invasão microvascular e/ou linfática microscópica, presença de necrose entre outros achados anatomopatológicos (DELAHUNT et al. 2013).

O primeiro sistema de classificação prognóstica utilizando fatores clínicos e anatômicos foi publicado por ROBSON et al. em 1969. Esse sistema foi amplamente utilizado e se popularizou principalmente pela facilidade de utilização, no entanto, após novos estudos, o papel prognóstico do sistema de Robson foi extensamente criticado. A principal falha desse sistema ocorre por agrupar na categoria III pacientes reconhecidamente com evolução distinta, ou seja, pacientes com acometimento linfonodal, pacientes com trombos tumorais vasculares e pacientes com acometimento da veia cava inferior (PANTUCK et al. 2001).

O sistema de classificação prognóstica mais importante e mais utilizado para avaliação do CCR é o TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) desenvolvido por Pierre Denoix (França) entre os anos de 1943 e 1962. Os tumores renais foram categorizados pelo sistema TNM primeiramente em 1974 sendo submetido à inúmeras revisões ao longo dos anos pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). Atualmente, encontra-se na sétima edição e constitui ferramenta validada pelo tempo de grande importância na classificação de pacientes portadores de CCR (FICARRA et al. 2007). As principais modificações em relação à versão anterior (TNM 2002) são representadas pela subdivisão do T2 em T2a (tumores entre 7,1 e 10 cm) e T2b (tumores > 10 cm), pela alteração de categoria da invasão da veia renal que se tornou T3a, o envolvimento linfonodal foi simplificado para N0 (ausente) e N1 (presente) e o acometimento da glândula adrenal por contiguidade passa a ser classificado como T4 (EDGE et al. 2009). O **Quadro 2** demonstra as principais modificações da última versão do TNM.

Quadro 2 - Estadiamento TNM para câncer renal.

Tumor primário (T)	
T1	Tumor limitado ao rim, até 7,0 cm no maior diâmetro
T1a	Tumor até 4 cm, limitado ao rim
T1b	Tumor entre 4,1 e 7,0 cm, limitado ao rim
T2	Tumor limitado ao rim, maior que 7,0 cm no maior diâmetro
T2a	Tumor entre 7,1 e 10 cm, limitado ao rim
T2b	Tumor maior que 10,1 cm, limitado ao rim
T3	Tumor invade veias maiores ou tecido perirrenal, porém limitado à fáscia de Gerota
T3a	Tumor invade veia renal, gordura perirrenal ou do seio renal, limitado à fáscia de Gerota
T3b	Tumor se estende à veia cava, abaixo do diafragma
T3b	Tumor se estende à veia cava, acima do diafragma ou invade a sua parede
T4	Tumor se estende além da fáscia de Gerota, incluindo extensão por contiguidade da adrenal ipsilateral
Linfonodos regionais (N)	
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases linfonodais regionais
N1	Presença de metástases em linfonodos regionais
Metástases à distância	
M0	Ausência de metástases
M1	Presença de metástases

Fonte: Adaptado de EDGE et al. (2009)

O tamanho tumoral é o componente principal do sistema TNM e o mais importante fator prognóstico para o CCR. RUSSO et al. (2008) analisaram as taxas de sobrevida de pacientes submetidos à tratamento cirúrgico por CCR localizado de 1989 e 2004 demonstrando sobrevida livre

de progressão de 98%, 95%, 90% e 70% para pacientes com tumores < 2 cm, 2-4 cm, 4-7 cm e > 7 cm, respectivamente.

Um estudo recente e multicêntrico envolvendo 706 pacientes portadores de CCR demonstrou que tumores > 11 cm estavam associados com maior presença de metástases se comparado com tumores entre 7 a 11 cm de diâmetro (KLATTE et al. 2007). Pacientes portadores de metástases ao diagnóstico apresentam prognóstico reservado com sobrevida em dois anos variando de 10 a 20% (FLANIGAN et al. 2004).

Alguns autores descrevem a associação dos principais tipos histológicos de CCR com a sobrevida câncer específica em análises univariadas, no entanto, na maioria dos estudos, o impacto dessa variável não é reproduzida em análises multivariadas. Os tumores de células claras normalmente são os mais agressivos e com pior prognóstico, seguido dos tumores papilíferos e cromóforos (PATARD et al. 2004a). Os tumores papilíferos são divididos em dois grupos com evoluções distintas: tipo I e tipo II. Os tumores papilíferos do tipo I geralmente apresentam melhor prognóstico. Os tumores papilíferos do tipo II usualmente são de alto grau e com grande potencial metastático (PIGNOT et al. 2007). O tumor derivado de translocação cromossômica do gene TFE3 no cromossoma Xp11 foi recentemente descoberto e apresenta características histológicas peculiares tanto de carcinoma de células renais quanto de tumores papilíferos. Esse tumor raro pode acometer crianças e quando ocorre em adultos apresentam maior agressividade e pior prognóstico (ROSS e ARGANI 2010).

O acometimento linfonodal é reconhecido em vários estudos como fator prognóstico independente, no entanto, não existe até o momento consenso da indicação de linfadenectomia para doença localizada e o seu benefício terapêutico é ainda incerto. A SCE em 5 anos dos pacientes com acometimento linfonodal pode variar de 11% a 35% e metástases à distância podem estar presentes em mais da metade dos casos. Dados recentes sugerem que a linfadenectomia estendida poderia estar indicada em casos selecionados como tumores localmente avançados (T3-T4), alto grau nuclear de Fuhrman, presença de necrose tumoral, linfonodos palpáveis durante a cirurgia e presença de diferenciação sarcomatóide (CAPITANIO et al. 2011).

A classificação de Fuhrman, descrita por Susan Fuhrman em 1982, representa outro fator prognóstico de grande importância no CCR. O tamanho nuclear, sua morfologia e as características do nucléolo são utilizados para classificação dos tumores renais em 4 graus. Essa classificação está associada com tamanho tumoral, estágio, presença de metástases, acometimento linfonodal, invasão vascular e da gordura perirrenal. As taxas de sobrevida câncer específica em 5 anos dos pacientes com tumores estratificados como grau 1, 2, 3 ou 4 foram 76%, 72%, 51% e 35%, respectivamente (BRETHEAU et al. 1995). A classificação de Fuhrman foi inicialmente validada para a variante histológica de células claras e ainda não há consenso para o seu uso em outros tipos histológicos de CCR (DELAHUNT et al. 2001).

Outros achados histológicos como a presença de padrão sarcomatóide e o achado de necrose tumoral apresentam importância prognóstica distinta. O padrão sarcomatóide se apresenta como uma transformação de alto grau caracterizada pela presença de elementos fusiformes difusos. Trata-se de uma condição rara, encontrada em apenas 5% dos casos, podendo ocorrer em qualquer tipo histológico de CCR. A sobrevida câncer específica em 5 anos dos pacientes com e sem padrão sarcomatóide pode variar de 22% a 79%, respectivamente (DE PERALTA-VENTURINA et al. 2001). A presença de necrose tumoral é outro achado histológico com impacto prognóstico negativo. Em estudo retrospectivo recente com mais de 2300 pacientes submetidos à tratamento cirúrgico, a presença de necrose tumoral foi considerada em análise multivariada como fator preditivo independente de pior sobrevida e maior incidência de metástases, tanto em carcinoma de células claras como em tumores papilíferos (PICHLER et al. 2012).

LEE et al. (2002) avaliaram 721 portadores de CCR e 57% desses pacientes se apresentaram de forma incidental. A presença de sintomas ao diagnóstico está associada à tumores mais agressivos e doença avançada, sendo mais prevalente em pacientes jovens, tumores maiores e em carcinoma de células claras convencional (LEE et al. 2002). Em estudo com mais de 2200 pacientes, PATARD et al. (2004b) descreveram que o risco de morte por CCR em pacientes com sintomas locais e sintomas sistêmicos era respectivamente, 2,8 e 8,8 vezes maior se comparado aos pacientes assintomáticos.

Tumores que invadem a gordura tanto perirrenal ou adjacente ao seio renal são considerados T3a pela classificação TNM. Em contrapartida, parece haver diferenças prognósticas significativas quando ocorre a invasão da gordura do seio renal se comparado ao acometimento da gordura perirrenal, conferindo pior evolução e maior associação com metástases linfonodais, tumores de alto grau e maior incidência de diferenciação sarcomatóide (THOMPSON et al. 2005).

A incidência de invasão microvascular é outro parâmetro histopatológico reconhecido como fator prognóstico independente. GONÇALVES et al. (2004) descreveram a presença de invasão microvascular em 25% dos 95 pacientes operados por CCR. Associa-se à tumores maiores, alto grau de Fuhrman, estadios mais avançados e presença de acometimento linfonodal sendo fator preditivo também para o desenvolvimento de metástases (KROEGER et al. 2012).

A invasão da glândula supra-renal ipsilateral por contiguidade constitui fator de pior prognóstico demonstrado em muitos estudos, o que resultou na sua reclassificação no TNM de T3a para T4. As taxas de sobrevida câncer específica em 2 anos e 5 anos relatada por JUNG et al. (2008) foram de 31% e 21%, respectivamente. Assim, a invasão direta da adrenal ipsilateral apresenta pior prognóstico se comparado com o acometimento da gordura perirrenal ou do seio renal (THOMPSON et al. 2005).

Ainda como fatores prognósticos, diversos mecanismos de avaliação e estratificação de performance clínica podem ser utilizados na avaliação de

portadores de CCR como o Karnofsky's Performance Status (KPS), o *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) e o índice de comorbidade de Charlson (Anexos 1, 2 e 3). Essas classificações avaliam principalmente o impacto das neoplasias nas condições gerais de saúde do indivíduo, não considerando as comorbidades e o seu impacto no desfecho desses tumores (KARNOFSKY e BURCHENAL 1950; SHVARTS et al. 2004). A presença de múltiplas comorbidades deve ser considerada em portadores de CCR com efeitos significativos na sobrevida, principalmente em pacientes mais idosos. ATHER e NAZIM (2010) demonstraram que além de fatores preditivos clássicos de sobrevida para o CCR como estadió, grau de Fuhrman e tamanho tumoral, diferenças no índice de comorbidades de Charlson também apresentaram impacto significativo SG em análise multivariada.

Em estudo recente de nosso grupo, DE CÁSSIO ZEQUI et al. (2010) avaliaram o uso da classificação pré-operatória da *American Society of Anesthesiology* (ASA) como fator prognóstico em 141 pacientes portadores de CCR submetidos à tratamento cirúrgico. Nesse estudo, os pacientes estratificados por ASA apresentaram impacto nas taxas de SG, SCE e de sobrevida livre de doença, bem como no risco de desenvolvimento de metástases. Nesse estudo, os pacientes ASA 3 apresentaram menos tumores incidentais ao diagnóstico e configuraram um grupo de alto risco de morte e de progressão da doença em comparação aos classificados como ASA 1 e 2.

Marcadores inflamatórios como proteína C reativa (PCR), taxa de sedimentação de eritrócitos e presença de trombocitose também podem apresentar impacto negativo na sobrevida (NÉGRIER et al. 2002; SUPPIAH et al. 2006).

A despeito desses estudos, nenhum fator prognóstico isolado é capaz de prever com acurácia os desfechos clinicopatológicos. Desse modo, a associação de fatores prognósticos em modelos como nomogramas podem auxiliar no manejo desses pacientes, embora ainda com limitações (KATTAN et al. 2001; MOTZER et al. 2004). RAJ et al. (2008) desenvolveram um modelo de nomograma pré-operatório para tumores renais localizados considerando inúmeros fatores como a presença de acometimento linfonodal, tamanho do tumor, sinais sugestivos de necrose em exames de imagem, modo de apresentação e presença de metástases. Posteriormente, diversos nomogramas foram desenvolvidos somando-se os dados patológicos pós-operatórios, com características peculiares e melhor acurácia na predição de resultados (CINDOLO et al. 2005).

O nomograma mais utilizado e de maior importância foi desenvolvido por KATTAN et al. (2001) do *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* (MSKCC) considerando o tipo histológico, presença de sintomas ao diagnóstico, tamanho tumoral e estadiamento pela versão do TNM de 1997. A acurácia em prever recorrência após tratamento de doença localizada nesse estudo foi de 74%. Em 2005, SORBELLINI et al. atualizaram o nomograma de Kattan para uso somente para o subtipo histológico de células claras, determinando uma acurácia de 85%.

Em 2002, foi publicado pelo grupo da Universidade da Califórnia em Los Angeles (UCLA), um sistema prognóstico integrado denominado *UCLA Integrated Staging System* (UISS). Esse nomograma considerou além do estadió e grau, a classificação de *performance status* do ECOG, estratificando os pacientes portadores de CCR em cinco grupos com diferenças significativas na SG. Em seguida, essa classificação foi simplificada em apenas três grupos e validada em estudo multicêntrico internacional envolvendo mais de 4000 pacientes com acurácia preditiva de 81% (PATARD et al. 2004b).

Outro sistema prognóstico de grande importância foi elaborado pela *Mayo Clinic* é indicado para pacientes com diagnóstico de CCR de células claras localizado e metastático. Esse nomograma, denominado SSIGN, apresenta dez escores de risco considerando apenas fatores histopatológicos como estadió (TNM 1997), tamanho tumoral, grau nuclear e presença de necrose tumoral. A SCE em 5 anos para pacientes graduados pelo SSIGN com escore 0-1, escore 5 e ≥ 10 foi de 99,7%, 65,4% e 7,4%, respectivamente (FRANK et al. 2002).

1.3.2 Fatores biomoleculares e genéticos

O desenvolvimento de modelos prognósticos baseados em variáveis clínicas, anatômicas e histopatológicas, como descritos anteriormente, apresentam importância histórica reconhecida na abordagem do CCR. No entanto, fatores prognósticos mais precisos podem melhorar a acurácia para prever resultados e auxiliar na individualização terapêutica desses

pacientes. O avanço da tecnologia para o estudo da genômica e proteômica permitiu a identificação das principais vias moleculares envolvidas no crescimento e desenvolvimento de metástases do CCR. Assim, nos últimos anos, inúmeros marcadores moleculares e genéticos tem sido estudados como fatores prognósticos com melhor compreensão da biologia tumoral (KLATTE et al. 2009).

O carcinoma de células renais do tipo células claras (CCRCC) pode ocorrer de forma esporádica ou como síndromes hereditárias como a Síndrome de Von Hippel Lindau. O principal gene associado ao CCRCC é o gene de Von Hippel Lindau (VHL), um gene supressor de tumor localizado no cromossoma 3p. Além de condições de hipoxemia tecidual, as mutações, deleções e a hipermetilação desse gene constituem os principais fatores responsáveis pelo acúmulo de HIF-1 α (*Hypoxia Induced Factor 1*) no citoplasma, estimulando o crescimento tumoral por meio da ativação de uma série de genes relacionados à angiogênese. No entanto, o papel prognóstico das mutações desse gene ainda não está claro. PATARD et al. (2008) avaliaram o papel prognóstico da mutação do gene VHL e da expressão imuno-histoquímica da anidrase carbônica do tipo IX (CAIX) em 100 pacientes submetidos à tratamento cirúrgico. Nesse estudo, a ausência de mutações do VHL e a baixa expressão de CAIX estavam associados com doença avançada e presença de metástases. Em análise multivariada, apenas a expressão de CAIX se caracterizou como fator prognóstico independente. Em contrapartida, outro estudo envolvendo 240 casos de CCR esporádicos não demonstrou qualquer associação de alterações do

VHL com tamanho tumoral, estágio, acometimento linfonodal e presença de metástases. BALDEWIJNS et al. (2009), estudando 150 casos de CCR também não demonstraram impacto de alterações do gene VHL na angiogênese e progressão tumoral.

1.3.3 O papel da hipóxia no CCR (a via VHL-HIF-EPO)

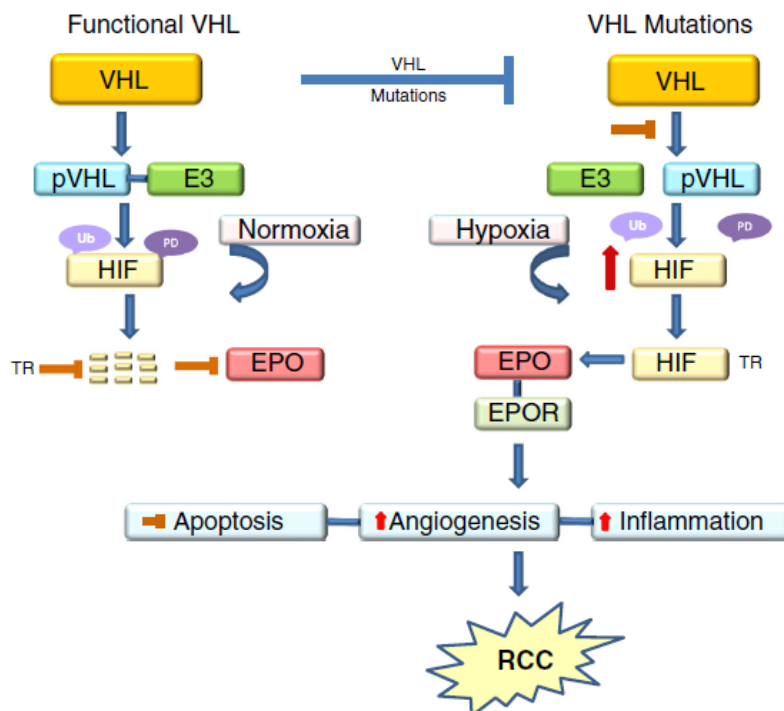
A hipoxemia tecidual é caracterizada por um estado de redução da pressão parcial de oxigênio ofertada aos tecidos de forma aguda ou crônica, interferindo nas principais vias metabólicas celulares (ZANDER e VAUPEL 1985). Como em outros tumores, a hipoxemia no CCR é decorrente da deficiência de suprimento sanguíneo tecidual, notadamente por proliferação celular descontrolada e formação de vasos aberrantes (HARRIS 2002).

Essa condição de baixa oferta de oxigênio aos tecidos, frequente no microambiente tumoral, atua como um fator regulador inibindo ou estimulando a expressão de determinados genes específicos (HÖCKEL e VAUPEL 2001). A ativação da via do VHL-HIF-EPO caracteriza o principal mecanismo adaptativo celular em resposta às condições de hipóxia. O HIF (hypoxia inducible factor) é um heterodímero composto por duas unidades, o HIF- α (constituído por três subunidades, HIF-1 α , HIF-2 α e HIF-3 α) e o HIF- β , no entanto, apenas o HIF-1 α / β é descrito como regulador dos genes relacionados à hipóxia (WANG et al. 1995). O HIF- β é expresso continuamente, enquanto a síntese de HIF-1 α é controlada por mecanismos pós-translacionais determinados pela concentração intracelular de oxigênio (HARRIS 2002).

Em condições de normais de oxigênio, o HIF-1 α é hidroxilado em dois resíduos de prolina e um resíduo de asparaginase. Esse composto proli-hidroxilado do HIF-1 α se liga à proteína de VHL (pVHL) e à E3 ubiquitina-ligase, para depois, ser degradado gradualmente nos proteossomos (OHH et al. 2000; BRUICK e MCKNIGHT 2001).

No entanto, em condições de hipóxia, o HIF-1 α não é hidroxilado e não se liga ao complexo pVHL-E3 ubiquitina-ligase, escapando assim, dos mecanismos de degradação proteossômica (SALCEDA e CARO 1997). Como resultado, o HIF-1 α se acumula no citoplasma e se dirige ao núcleo, formando um complexo funcionalmente ativo com HIF- β , responsável pela ativação e transcrição de inúmeros fatores angiogênicos como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento transformador alfa (TGF- α) e a eritropoetina (EPO) (OHH 2006) **(Figura 1)**

Ademais, no CCR, a estabilização e acúmulo de HIF-1 α no citoplasma não é somente consequência das condições de hipóxia. As mutações, deleções e a hipermetilação do gene VHL impedem a degradação normal desse fator, estimulando o crescimento e o desenvolvimento dos tumores renais (MAXWELL et al. 1999). Na literatura as deleções do gene VHL podem ocorrer de 33% a 56% e a hipermetilação em até 19% dos casos de CCR esporádicos (KIM e KAELIN 2004). Desse modo, os tumores renais frequentemente apresentam expressão aumentada de HIF-1 α , do contrário, raramente isso ocorre nos tecidos normais (ZHONG et al. 1999).



Fonte: Adaptado de MORAIS et al. (2013)

Figura 1 - A via VHL-HIF-EPO na progressão do CCR.

1.3.4 A eritropoetina (EPO) e o seu receptor (EPO-R)

A eritropoetina (EPO) é uma glicoproteína de 30,4 KDa, pertencente à família das citocinas de classe I (WEN et al. 1994). A principal função dessa citocina é o controle da proliferação e a diferenciação dos eritrócitos na medula óssea (LACOMBE e MAYEUX 1999). Durante a embriogênese, a EPO é produzida pelo fígado, mas após o nascimento a sua produção é realizada pelas células endoteliais peritubulares do córtex renal (ECKARDT 1996). O gene da EPO está localizado no braço longo do cromossomo 7, constituído por cinco exóns e quatro íntrons e considerado o único fator de crescimento hematopoiético regulado por hipóxia local (SASAKI et al. 2000).

Notadamente, a anemia é uma complicação comum de muitos tumores (DESAI e DEMETRI 2005). Cerca de 35% dos pacientes com câncer renal se apresentam com anemia ao diagnóstico e somente 5% com policitemia (NSEYO et al. 1986; MOTZER et al. 1996).

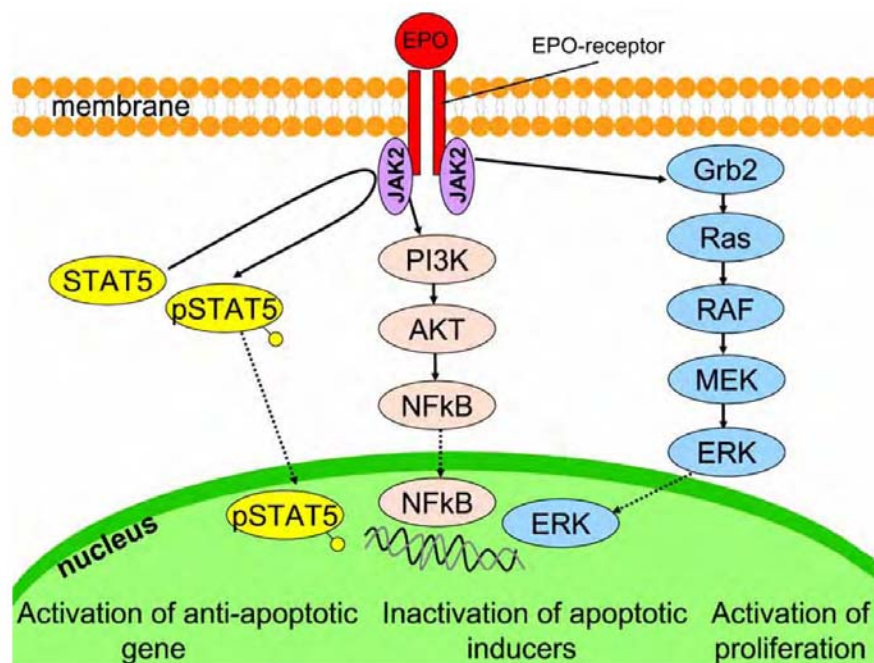
Está bem documentado que a anemia e a hipóxia tecidual influenciam de forma negativa a qualidade de vida dos pacientes portadores de câncer, bem como a resposta ao tratamento (NORDSMARK et al. 1996; LITTLEWOOD et al. 2003). Acredita-se que a presença de anemia em diversos tumores aumenta o risco de morte pela doença em até 65% e pode alterar, significativamente, a resposta à quimioterapia e radioterapia (CARO et al. 2001; VAUPEL et al. 2001).

Dessa forma, o controle da anemia e da hipoxemia tecidual são importantes para melhorar a qualidade de vida e a sobrevida dos pacientes, potencializando a resposta ao tratamento complementar (VAUPEL et al. 2001).

Durante os últimos 20 anos, grandes progressos foram feitos no estudo da EPO, das moléculas relacionadas com a sua expressão gênica e, finalmente, com a síntese da eritropoetina recombinante humana (rhEPO) para uso clínico. Assim, os agentes estimulantes da eritropoiese (ESA) tem sido utilizados no tratamento dos quadros de anemia refratária decorrentes de insuficiência renal crônica e de muitos tumores. Persiste porém, dúvidas sobre os possíveis efeitos desse tipo de tratamento na biologia das neoplasias tratadas (FARRELL e LEE 2004).

Recentemente, a EPO e seu receptor (EPO-R) foram localizados em inúmeros tecidos não hematopoiéticos como fígado, útero, sistema nervoso central, células endoteliais e diversos tumores sólidos malignos, embora sem efeito na eritropoiese (FARRELL e LEE 2004; JELKMANN e WAGNER 2004). A maioria dos tumores renais são derivados de células dos túbulos proximais e expressam receptores funcionantes de EPO (WESTENFELDER et al. 1999).

A EPO-R é um receptor de superfície celular é caracterizado por uma proteína glicosilada de 484 aminoácidos de cadeia simples, membro das citocinas de classe I (LAPPIN 2003). Uma molécula de EPO se liga de forma cruzada a dois receptores de membrana de eritropoetina, formando um dímero funcionalmente ativo, que induz à alterações conformacionais ativando a tirosina quinase intracitoplasmática, a Janus quinase 2 (JAK2) (WITTHUHN et al. 1993; FRANK 2002). Como resultado, a JAK2 fosforila inúmeros resíduos de tirosina da porção citoplasmática da EPO-R que funcionam como sítios de ligação para proteínas que contém domínios tipo *Src-homology 2* (SH2), representadas por STAT1, STAT3 e STAT5. A interação de JAK2/STAT5 é o principal complexo responsável pela ativação de várias vias de transdução de sinais intracitoplasmáticos como: PI3K/Akt, Grb2/Ras/MAPK, proteína quinase C, Src homoly fosfatases (SHP1,2) e STAT5 (BAO et al. 1999; WOJCHOWSKI et al. 1999). A **Figura 2** representa a interação da EPO com o seu receptor de membrana e a cascata de sinalização intracelular.



Fonte: TÓVÁRI et al. (2008)

Figura 2 - A via de sinalização da EPO-R.

O efeito sinalizador da EPO é fortemente reconhecido como um mecanismo relevante na biologia do tumor (WIESENER et al. 2007). Em tecidos não hematopoiéticos, a EPO atua na inibição da apoptose, na promoção da proliferação celular, na resistência à determinadas drogas e na estimulação da angiogênese (RIBATTI et al. 1999). No entanto, o significado prognóstico da expressão de EPO e EPO-R no câncer renal e seu o efeito no crescimento tumoral e angiogênese ainda é incerto.

GONG et al. (2006), estudaram a expressão imuno-histoquímica da EPO e EPO-R em 54 pacientes portadores de CCR evidenciando forte marcação em mais de 90% das amostras.

Em estudo *in vitro*, a administração exógena de EPO aumenta a proliferação celular de células de câncer de mama, rim e tumores de cabeça

e pescoço (WESTENFELDER e BARANOWSKI 2000; ACS et al. 2001; LAI et al. 2005). Esses resultados questionam se a administração de EPO pode promover crescimento tumoral através da estimulação dos receptores de eritropoetina. No entanto, BERDEL et al. (1991), não confirmaram qualquer efeito modulador da EPO em 22 tipos de tumores não hematopoiéticos.

LJUNGBERG et al. (1992), demonstraram em estudo com 165 pacientes portadores de CCR que a elevação sérica de EPO estava associada à pior prognóstico e indicava risco aumentado de doença metastática.

MICHAEL et al. (2007), avaliaram a expressão imuno-histoquímica da EPO em amostras de 113 pacientes submetidos à nefrectomia radical por CCR (período de 1990 a 2000), demonstrando 33% de positividade. Nesse estudo, os pacientes com forte expressão de EPO apresentaram probabilidade dobrada de morrer pela doença.

Em contraste, em estudo prospectivo com 49 pacientes, os resultados demonstraram que o aumento sérico de EPO não era claramente um marcador para câncer renal (GROSS et al. 1994). PAPWORTH et al. (2009), confirmaram que a expressão de EPO e EPO-R não se correlacionava com a sobrevida, não sendo considerado fator prognóstico independente.

A expressão desses marcadores no CCR e nos diversos tipos histológicos não são bem conhecidas. Ademais, não sabemos se as expressões de EPO e EPO-R se apresentam de formas diferentes nos tecidos neoplásicos e tecidos normais adjacentes. Outra dúvida é se há diferenças na expressão de tumores localizados e de tumores metastáticos

e se há diferenças na expressão intratumoral entre portadores de rim contralateral normal e portadores de rim único.

Dessa forma, existem poucos estudos na literatura avaliando os potenciais efeitos da expressão da EPO e EPO-R no câncer renal, na maioria deles com casuística modesta e com resultados conflitantes.

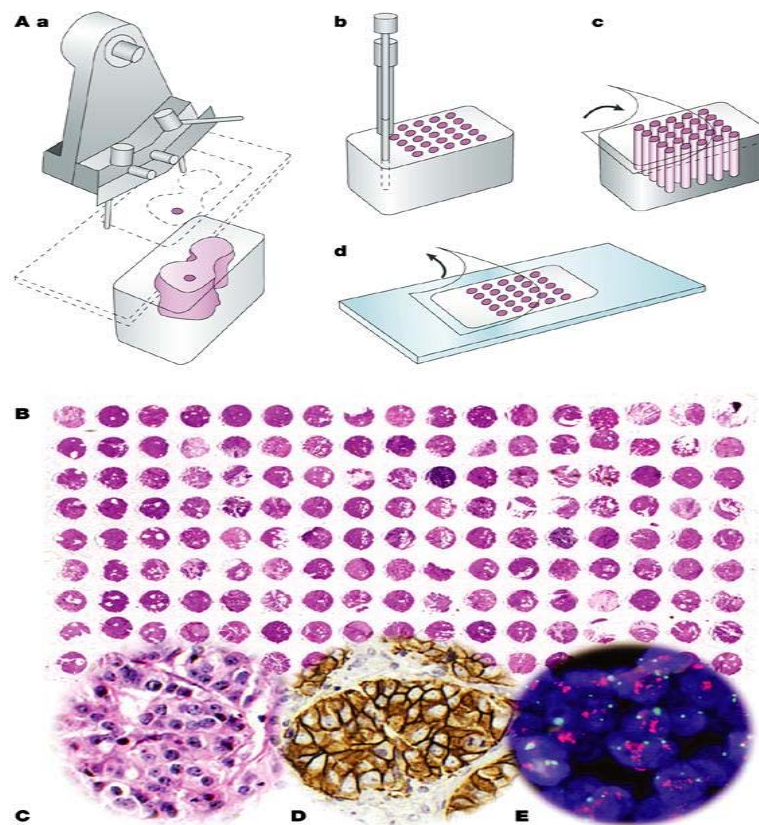
Os autores desse estudo propõem investigar a expressão imuno-histoquímica da EPO e EPO-R nos diversos tipos histológicos de CCR, nos tecidos renais não neoplásicos e avaliar o valor prognóstico desse marcador com maior casuística e com cooperação de centro internacional.

1.3.5 O *Tissue Microarray* (TMA)

O estudo dos genes, vias de sinalização e de inúmeros marcadores teciduais pode ser útil no entendimento das interações moleculares dos fenômenos oncológicos. Porém a quantidade de material disponível para estudo é finita e o desgaste a cada secção para confecção de lâminas para processos de imuno-histoquímica tradicionais é intenso.

A técnica do TMA foi descrita inicialmente por BATTIFORA (1986) e permite, de forma mais prática e rápida, o estudo simultâneo de marcadores e proteínas em múltiplas amostras de tecido. Desse modo, se torna metodologia atraente por promover economia de reagentes, submissão de todas as amostras às mesmas condições físico-químicas das reações e permitir economia de material para estudo. Posteriormente, a técnica foi aperfeiçoada aos moldes atuais por KONONEN et al. (1998).

Para confecção do TMA, os blocos de parafina e as suas respectivas lâminas devem ser recuperados. As lâminas são analisadas ao microscópio comum e as áreas mais representativas do tumor são demarcadas. A seguir, por justaposição das lâminas marcadas com os respectivos blocos de parafina são selecionadas as áreas de interesse formando um bloco doador para cada caso. Assim, essas áreas de interesse demarcadas no bloco doador são puncionadas com um instrumento em forma de agulha para obtenção de fragmentos cilíndricos microscópicos. Esses pequenos fragmentos, com a área de interesse de cada caso, são posteriormente transferidos para um único bloco receptor, constituindo o TMA. A partir deste bloco receptor, procede-se a secção de múltiplas lâminas de 3 a 5 μm para o estudo. Cada lâmina contém amostras de cada caso e, sempre são amostras em duplicata, obtidas de secções a diferentes profundidades dos blocos doadores. Deste modo, é possível a análise de diversas quantidades teciduais e de diferentes regiões tumorais sem comprometer a representatividade do material obtido em comparação as secções em lâminas tradicionais (KONONEN et al. 1998; RIMM et al. 2001).



Fonte: SAUTER et al. (2003).

Figura 3 - Demonstração esquemática do método de TMA. **A.** Amostras cilíndricas de tecido são removidas de bloco de parafina doador e depositadas em bloco receptor. **B.** Aspecto da secção corada com hematoxilina-eosina (HE). **C-E.** Magnificação óptica de secções de neoplasia de mama, utilizando-se métodos de HE, imunohistoquímica e FISH.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Analisar a expressão imuno-histoquímica da EPO e EPO-R no tumor primário de pacientes portadores de CCR submetidos à nefrectomia e correlacionar com os fatores prognósticos convencionais.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Estudar a expressão de EPO e EPO-R através de imuno-histoquímica no tumor primário dos diversos tipos histológicos;
- Estudar a expressão da EPO e EPO-R no tumor primário e comparar com a expressão no tecido renal não neoplásico;
- Analisar o impacto dos níveis de expressão da EPO e EPO-R nas taxas de sobrevida global (SG), sobrevida câncer específica (SCE) e sobrevida livre de doença (SLD);
- Correlacionar a expressão de EPO e EPO-R com diversas variáveis demográficas, clínicas e anatomopatológicas.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

3.1.1 Critérios de Inclusão

- CCR comprovado histologicamente;
- Tratamento cirúrgico exclusivo do tumor primário;
- Ausência de comorbidades que reduzam a expectativa de vida a menos de seis meses.

3.1.2 Critérios de exclusão

- Pacientes submetidos a outros tratamentos para o CCR além da cirurgia ou com comorbidades que possam comprometer a sobrevida;
- Pacientes com sarcomas renais, neoplasias renais não corticais ou com tumor de Wilms;
- Prontuários com dados incompletos ou faltantes;
- Material arquivado em parafina (blocos) em más condições;
- TMA com descolamento de *hotspot*, presença de necrose ou fibrose excessiva ou material inadequado.

3.2 METODOLOGIA

A população do estudo é caracterizada por indivíduos portadores de carcinoma de células renais (CCR) submetidos inicialmente à tratamento cirúrgico no Núcleo de Urologia do A.C. Camargo Cancer Center, entre 1980 e 2009, num total de 216 pacientes. O estudo apresentou coparticipação de instituição estrangeira (Hospital Pasteur, Uruguai) contribuindo com mais 104 casos do mesmo período, constituindo uma amostra inicial de 320 pacientes. Inicialmente, foram revisados os prontuários médicos arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) de ambas instituições e os dados coletados foram registrados em uma ficha de levantamento previamente definida (Anexo 3). Os dados epidemiológicos, demográficos e clínicopatológicos coletados foram armazenados em base simples (Excel), constituindo o banco de dados final. As variáveis consideradas foram idade, sexo, raça, *índice de performance status* pela classificação de ECOG e Karnofsky (KPS), sintomatologia ao diagnóstico, tabagismo, tempo de evolução, lateralidade da lesão, multifocalidade, hemoglobina pré-tratamento, tipo de cirurgia, data da cirurgia, complicações cirúrgicas precoces e tardias, necessidade de transfusão, estadiamento pelo TNM AJCC/UICC 2010, grau de Furhman, tamanho da lesão (maior diâmetro no exame anatomopatológico), tipo histológico, presença de metástases ao diagnóstico, invasão venosa microscópica, acometimento linfonodal, invasão linfática microscópica, presença de necrose tumoral, evolução pós-operatória, tempo de seguimento, desenvolvimento de metástases,

tratamento das metástases e situação clínica ao final do estudo. Após análise imuno-histoquímica também foram incluídas as expressões de EPO e EPO-R de forma qualitativa e quantitativa.

As lâminas e os dados anatomopatológicos de todos os pacientes do estudo, arquivados no Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center e os provenientes do Uruguai, foram revisados por três patologistas experientes (Dra. Isabela Werneck da Cunha, Dra. Stephania Martins Bezerra e Dra. Luciana Schultz) sem conhecimento dos desfechos clínicos e das características de cada caso. Todos os casos foram reclassificados de modo uniforme e as áreas mais representativas de cada caso foram selecionadas para confecção do *tissue microarray* (TMA). Concomitantemente, foi realizada análise de tecido não neoplásico (distanto pelo menos 1,0 cm do tumor) obtido das peças cirúrgicas (blocos de parafina) para comparação entre os graus de expressão dos referidos marcadores em CCR e do tecido não neoplásico adjacente.

3.2.1 Diagnóstico e Estadiamento

Todos os pacientes foram avaliados inicialmente por exame clínico geral. Os pacientes foram indagados quanto a presença de sinais e sintomas relacionados à neoplasia renal. Utilizou-se a Tomografia Computadorizada de Abdômen como método de imagem padrão para confirmação diagnóstica.

O estadiamento clínico foi realizado pelo sistema TNM (Anexos 4 e 5). As metástases pulmonares foram investigadas através de radiografias de

tórax realizadas nas incidências pósterio-anterior e perfil. Quando se observou lesões pulmonares suspeitas ou duvidosas, utilizou-se a Tomografia Computadorizada de Tórax para confirmação de possíveis focos tumorais metastáticos. Cintilografia óssea foi solicitada apenas nos casos de suspeita clínica de metástases ósseas (sintomatologia, alteração laboratorial sugestiva ou doença metastática em múltiplos sítios).

3.2.2 Procedimento Cirúrgico

Todos os pacientes foram submetidos à tratamento cirúrgico. O tipo de cirurgia realizada variou de acordo com a extensão do tumor e preferência do cirurgião. Os procedimentos realizados foram: nefrectomia radical convencional ou por técnica vídeo-laparoscópica, nefrectomia parcial convencional ou por técnica vídeolaparoscópica e nodulectomia. Nos casos submetidos a ressecções parciais, foi observada margem cirúrgica macroscópica mínima e em casos selecionados, utilizou-se técnica anatomopatológica de congelação para exclusão de neoplasia residual.

3.2.3 Seguimento

O acompanhamento dos pacientes foi realizado em consultas ambulatoriais. As consultas foram realizadas trimestralmente no primeiro e segundo anos. Do segundo ao terceiro ano de seguimento estas consultas passaram a ser semestrais, e após o terceiro ano, realizadas anualmente.

Em todas as consultas, foi realizado exame físico sistemático. Exames laboratoriais e de imagem foram utilizados rotineiramente durante o

acompanhamento clínico. Em casos suspeitos de recidiva local ou sistêmica, foi utilizado a tomografia computadorizada para confirmação diagnóstica.

Ao final do seguimento, os pacientes foram classificados como:

- a. vivos sem câncer: pacientes tratados do CCR e sem evidência clínica, radiológica ou laboratorial da neoplasia;
- b. vivos com câncer: pacientes que após o tratamento cirúrgico primário permaneceram com evidência clínica, radiológica ou laboratorial da doença ou que apresentaram recidiva durante o seguimento;
- c. mortos pelo câncer: pacientes que morreram decorrentes do CCR ou por complicação do tratamento, incluindo óbito pós-operatório (até 30 dias pós-cirurgia);
- d. mortos por outras causas: pacientes que morreram por causas não relacionadas à neoplasia ou complicações do seu tratamento;
- e. perda de seguimento: pacientes que não retornaram nas consultas de seguimento num período de tempo igual ao dobro do estipulado e que não foram localizados.

3.3 CONFECÇÃO DO TMA

Após revisão das lâminas pelo Departamento de Patologia foram selecionadas as áreas mais representativas dos tumores renais para elaboração do *tissue microarray* (TMA). Quando presentes e viáveis, também foram selecionadas áreas de tecido renal não neoplásico distando pelo menos 1,0 cm do tumor principal. Os respectivos blocos de parafina

foram resgatados e obtidos cilindros de material de 1,0 mm de diâmetro correspondente às áreas selecionadas 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. Ao todo, 314 casos foram elegíveis e preparados com a técnica e as referidas lâminas submetidas à realização de imunohistoquímica com os marcadores propostos (EPO e EPO-R).

3.4 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os blocos de parafina contendo o TMA foram submetidos à cortes convencionais de 3 µm de espessura por microtomia mecânica (Leica RN2255, LEICA). As reações imunohistoquímicas foram realizadas de forma automatizada com a utilização do equipamento Ventana Benchmark XT (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Os marcadores empregados e as suas especificações e respectivas diluições estão representados no **Quadro 3**. O sistema de visualização utilizado nas reações imunohistoquímicas para os marcadores avaliados foi o *iVIEW DAB Detection*, que exibe uma coloração marrom-acastanhada.

As reações de imunohistoquímicas automatizadas seguiram um protocolo estabelecido de acordo com os resultados obtidos na padronização da técnica. A desparafinização das lâminas foi realizada aplicando-se *EZPrep* (ROCHE) e aquecidas a 75°C por 8 minutos. Para recuperação antigênica foi aplicado *Cell Conditioner* (ROCHE) por 8 minutos

a 95°C e depois, 64 minutos a 100°C. As lâminas foram lavadas com *Reaction Buffer* (ROCHE) e incubadas por 4 minutos nessa solução. Em seguida, foi aplicado *UV INHIBITOR* (ROCHE) nas lâminas por 4 minutos e depois lavadas com *Reaction Buffer*. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado aplicando-se *UV DAB H2O2* (água oxigenada a 10 vol.). As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários estudados por 32 minutos e depois lavadas novamente com *Reaction Buffer*. Foi realizada outra lavagem com *Reaction Buffer* e as lâminas foram incubadas por 8 min com *UV DAB* (ROCHE) e *UV DAB H2O2* (ROCHE), lavadas com *Reaction Buffer* e aplicado *UV COPPER* (ROCHE) por 4 minutos e novamente lavadas com *Reaction Buffer*. Após esse processo as lâminas foram retiradas do equipamento e submetidas a processos de desidratação com banhos sucessivos de Etanol a 80%, a 95%, a 100%, por 30 segundos cada um, e em quatro banhos de Xilol de 30 segundos cada. Tecidos sabidamente positivos para os marcadores foram utilizados como controles positivos e os controles negativos foram obtidos pela omissão dos anticorpos primários.

Quadro 3 - Lista de anticorpos primários utilizados no estudo imunohistoquímico.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricante
EPO	Policlonal de coelho	1:200	Abcam (Cambridge, MA, EUA)
EPO-R	Monoclonal de camundongos	1:25	Abcam (Cambridge, MA, EUA)

3.5 ANÁLISE DAS REAÇÕES (PADRONIZAÇÃO)

Após as reações imuno-histoquímicas, as lâminas de TMA foram analisadas em microscópio comum por patologista experiente. Vale ressaltar que, por tratar-se de anticorpos pouco estudados e com grande amplitude de padronização na literatura, a qualidade das reações foi rigorosamente analisada e casos duvidosos foram excluídos. Dessa forma, os casos com *hotspots* com grandes áreas de descolamento, presença de artefatos diversos, representação com muita necrose, ausência de tumor e pacientes com dados incompletos foram excluídos. Assim, restaram 220 casos válidos para EPO e 213 casos válidos para EPO-R.

A análise das reações foi feita de forma manual, utilizando algoritmo pré-estabelecido e modificado de PAPWORTH (2011), baseado no método de *score*. Cada *hotspot* foi analisado e classificado de acordo com o grau de intensidade da marcação e o padrão de distribuição. A intensidade da reação foi estratificada em ausente, baixa, média ou alta, sendo pontuadas em 0, 1, 2 e 3, respectivamente. Na análise da distribuição, quando focal, foi pontuada como 1 e quando difusa, pontuada como 2. O *score* de cada *hotspot* foi calculado pela multiplicação da intensidade pela distribuição, podendo variar de 0 a 6. Como os casos representados no TMA estavam em duplicata, o *score* final foi considerado como a média aritmética dos *hotspots* de cada caso. Para melhor interpretação, o grau de expressão imuno-histoquímica foi estratificado como “baixa expressão” (0 a 1) ou “alta expressão” (> 1 a 6), definindo a análise quantitativa.

Em nosso estudo, considerando a dificuldade para definição do grau de intensidade das reações e para evitar a subjetividade inerente ao método, foi optado pela realização de análise complementar qualitativa, estratificando a expressão de EPO e EPO-R como “ausente” (0) ou “presente” (>0 a 6).

3.6 ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado o software *Windows Statistical Package for Social Science* (SPSS), versão 21.0. As distribuições das variáveis clínicas, demográficas, anatomopatológicas e referentes ao tratamento foram apresentadas na forma de tabelas de contingência. A mensuração das variáveis quantitativas (numéricas) foi expressa pelas médias, medianas e seus respectivos desvios-padrão. A avaliação da associação do grau de expressão de EPO e EPO-R e as demais variáveis foi realizada com o teste do Qui Quadrado de Pearson (MORETTIN e BUSSAB 2005). Para os casos em que os valores esperados foram inferiores a 5 em mais de 20% das caselas ou que tinham valores esperados < 1 foram utilizados o teste exato de Fisher. O nível de significância adotado foi o de 5%. A comparação entre os graus de expressão dos marcadores em tecido não neoplásico e CCR foi realizada através do teste estatístico de Mann-Whitney, já que se tratou de grupos não pareados.

A identificação dos fatores independentes relacionados à SG, SCE e SLD foi realizada pela regressão logística múltipla de Cox. As variáveis selecionadas para o estudo múltiplo foram as que atingiram significância

estatística na análise univariada, bem como aquelas que atingiram valores de p de até 0,20. O resultado final para os modelos multivariados, regressão logística e de COX (1972), foi obtido pela estratégia *stepwise forward selection*, onde a partir da variável de maior significância na análise univariada foram acrescentadas às outras, uma a uma, em ordem crescente.

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 45 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 no canto inferior direito de cada gráfico. O nível de significância adotado foi o de 5%. Pacientes considerados perdidos de seguimento na data da última informação contribuíram para a curva de sobrevida até tal data, sendo então considerados sob censura. 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 $p < 0,05$.

3.7 ANÁLISE DE RISCOS E ASPECTOS ÉTICOS

Por se tratar de estudo retrospectivo, não houve a participação direta de pacientes, nem a alteração da estratégia de seguimento pós-operatório ou a introdução de qualquer modificação terapêutica, ou aplicação de qualquer medicação ou método que tenha gerado danos, benefícios, ou outras consequências a qualquer paciente. Desta forma, não foi necessária a adoção de consentimento pós-informado.

Foram utilizados dados de prontuários e material arquivado em blocos de parafina no Serviço de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center e do Hospital Pasteur, Uruguai. O uso do material parafinado não acarretou prejuízo aos pacientes, pois, a terapêutica julgada necessária para os mesmos já havia sido instituída e sempre foi mantido material residual no bloco.

O projeto foi inscrito no CEP do A.C. Camargo Cancer Center (nº. 1577/11), foi aprovado sem restrições em 14/06/2011. A pesquisa apresenta cooperação estrangeira (Hospital Pasteur, Uruguai) e foi inscrita para avaliação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) seguindo orientações regimentares. A CONEP aprovou o projeto sem restrições por meio do parecer nº. 549/2011. (Anexos 6 e 7)

3.8 CASUÍSTICA

Da população estudada, um total de 134 (60,9%) eram do sexo masculino e 86 (39,1) eram do sexo feminino. A maioria dos pacientes eram brancos e 20 (9,0%) de outras raças. A idade de apresentação variou de 14 a 86 anos, com média de 57,1 anos. Do total, mais da metade dos pacientes (56,4%) tinham entre 39 e 62 anos e 18 (8,2%) pacientes tinham menos que 38 anos ao diagnóstico. A maioria dos pacientes não fumavam (60,5%) e a história familiar de CCR estava presente em apenas seis pacientes (3,0%). O diagnóstico incidental ocorreu em 116 pacientes (50,5%).

Cento e quatro (49.5%) apresentavam algum sintoma relacionado à neoplasia, sendo os mais comuns dor lombar e hematúria. Apenas dois pacientes (0,9%) apresentavam a tríade clássica de sintomas (hematúria, dor lombar e massa palpável) e 27 pacientes (12,3%) se apresentaram com doença metastática ao diagnóstico. O tempo de evolução entre as queixas iniciais e o diagnóstico variou de 1 a 48 meses, com média de 2,1 meses **(Tabela 1)**.

Cerca de 30% dos pacientes se apresentaram com anemia (Hb < 12 g/dl) no pré-operatório, com média 13,34 g/dl e mediana de 13.5 g/dl. Na avaliação de *performance status* (P/S), a maioria (93%) apresentavam KPS \geq 80 e 105 pacientes (66,4%) foram classificados como ECOG 0. Os pacientes classificados como ECOG 1 ou 2 (agrupados) corresponderam a 33,6%. O risco anestésico foi avaliado pela classificação de ASA, caracterizando 167 pacientes (76%) como ASA 1 ou 2 e 53 (24%) pacientes

como ASA 3 ou 4. A maioria apresentava alguma comorbidade ao diagnóstico, já que apenas 11,8% dos avaliados eram ASA 1 (**Tabela 2**).

Quanto à abordagem cirúrgica, a nefrectomia radical foi realizada em 171 (77,7 %) pacientes, enquanto que 49 (22,3%) foram submetidos à nefrectomia parcial. O tempo médio de cirurgia foi de 198 minutos e a taxa de transfusão de 21,4%. As complicações pós-operatórias precoces (até 30 dias) ocorreram em 30 (14%) casos destacando-se a insuficiência renal aguda e as complicações cardiovasculares. A taxa de complicações tardias foi de quase 10%, caracterizada principalmente por insuficiência renal crônica ocorrida em 11 (5,1%) pacientes (**Tabela 3**).

Quanto ao maior diâmetro tumoral, cerca de 30% dos tumores eram < 4,0 cm, com variação de 1 a 24 cm e média de 6,7 cm. Observou-se invasão da gordura e/ou seio renal em 57 (26%) pacientes, invasão da pelve ou ureter em 16 (7,3%) e acometimento da adrenal ipsilateral em 14 (6,4%) casos. Quanto à invasão de grandes vasos, a veia renal estava acometida em 24 (10,8%) dos pacientes e a invasão da veia cava inferior ocorreu em 5 (2,3%) pacientes.

O tipo histológico mais comum foi carcinoma de células claras presente em 176 (80%) dos casos, seguidos pelos tumores papilíferos do tipo 1 (2,7%), tumores papilíferos do tipo 2 (6,8%) e cromófbos (6,8%). Quatro pacientes (1,8%) foram considerados como inclassificáveis. Na análise do grau nuclear de Fuhrman, 22% dos tumores foram considerados como baixo grau (graus 1 e 2) e 78 % como alto grau (graus 3 e 4).

Cerca de 42% dos pacientes apresentavam necrose tumoral na análise microscópica. A invasão venosa e a invasão linfática microscópica estava presente em 33 (20,8%) e 17 (10,7%) dos pacientes, respectivamente. Dezoito pacientes (8,2%) apresentavam linfonodos acometidos (pN1). Os pacientes submetidos à nefrectomia parcial (49 pacientes) foram considerados, por princípio, como pN0 (**Tabela 4**).

Quanto ao estadiamento clínico, 95 (43,2%) foram considerados como estágio I, 41 (18,6%) como estágio II, 46 (21%) estágio III e 38 (17,2%) pacientes foram considerados como estágio IV.

Ocorreram 58 (26,4%) óbitos, dos quais 41 (70,6% destes) em decorrência do câncer. Dos 220 pacientes válidos, 128 (58,2%) estavam vivos e sem doença ao término do estudo, 22 (10%) estavam vivos com doença e perda de seguimento ocorreu em 12 (5,5%) pacientes.

Falha ao tratamento foi observada em 40 (21%) pacientes e os principais locais de recorrência foram pulmões e ossos. Cerca de 73% dos pacientes com recidiva da doença receberam tratamento complementar, sobretudo com cirurgia em 33% dos casos (**Tabela 8**).

Tabela 1 - Variáveis epidemiológicas dos pacientes portadores de CCR (n=220).

Variável	Categoria	N	%
Idade	14 a 38 anos	18	8,2
	39 a 62 anos	124	56,4
	63 a 86 anos	78	35,4
Sexo	Masculino	134	60,9
	Feminino	86	39,1
Raça	Branco	200	91,0
	Não brancos	20	9,0
Diagnóstico incidental	Não	116	50,5
	Sim	104	49,5
Sintomas	Não	116	50,5
	Dor lombar	27	12,7
	Hematúria	36	17,0
	Emagrecimento	8	3,8
	Massa palpável	4	1,9
	Febre	2	0,9
	Dois sintomas	22	10,4
	Tríade	2	0,9
	Outros	3	1,9
	História familiar	Sim	6
Não		214	97,0
Tabagismo	Sim	77	39,5
	Não	118	60,5
Metástase ao diagnóstico	Sim	27	12,3
	Não	193	87,7
Total	-	220	100,0

Tabela 2 - Variáveis clínicas dos pacientes portadores de CCR (n=220).

Variável	Categoria	N	%
Hemoglobina (pré-operatório)	<12,0	65	29,5
	≥12,0	155	70,5
KPS	<80	11	7,0
	≥80	146	93,0
ECOG <i>Performance Status</i>	0	105	66,4
	1+2	53	33,6
ASA	1	26	11,8
	2	141	64,0
	3	51	23,2
	4	2	0,9
Lateralidade	Direito	101	46,0
	Esquerdo	113	51,3
	Bilateral	6	2,7
Diâmetro tumoral	< 4 cm	66	30,0
	> 4,1 a 7 cm	71	32,3
	> 7,1 cm	83	37,7
Topografia renal	Pólo superior	51	26,6
	Pólo médio	29	15,1
	Pólo inferior	41	21,4
	Mais de um pólo	71	37,0
Total	-	220	100,0

Tabela 3 - Variáveis terapêuticas dos pacientes portadores de CCR (n=220).

Variável	Categoria	N	%
Tipo de cirurgia	Nefrectomia radical	171	77,7
	Nefrectomia parcial	49	22,3
Transfusão sanguínea	Sim	47	21,4
	Não	173	78,6
Tempo cirúrgico	Até 3 horas	107	48,6
	Acima de 3 horas	113	51,4
Margens cirúrgicas microscópicas	Livres	209	95,0
	Comprometidas	11	5,0
Tempo de internação	≤ 4 dias	122	55,7
	> 4 dias	98	44,3
Complicações precoces	Não	184	85,8
	IRA	10	4,5
	Íleo paralítico	2	0,8
	Cardiovasculares	5	2,3
	Hemorragia	2	0,9
	Outras	11	5,7
Complicações tardias	Não	193	90,1
	IRC	11	5,1
	Suboclusão intestinal	1	0,5
	Hernia incisional	2	0,9
	HAS	2	1,0
	Outras	5	2,4
Total	-	220	100,0

Tabela 4 - Variáveis anatopatológicas dos pacientes portadores de CCR (n=220).

Variável	Categoria	N	%
Tipo histológico	Células claras	176	80,0
	Papilífero tipo 1	6	2,7
	Papilífero tipo 2	15	6,8
	Cromóforo	15	6,8
	Inclassificável	4	1,8
	Sarcomatóide	3	1,4
	Ductos coletores	1	0,5
Grau de Fuhrman	1	3	1,6
	2	38	20,4
	3	107	57,5
	4	38	19,9
Acometimento linfonodal *	Sim	18	8,2
	Não	202	91,8
Necrose tumoral	Sim	93	42,3
	Não	127	57,7
Invasão da gordura e/ou seio renal	Sim	57	26,0
	Não	163	74,0
Invasão da pelve e/ou ureter	Sim	16	7,3
	Não	204	92,7
Invasão de adrenal	Sim	14	6,4
	Não	206	93,6
Invasão venosa microscópica (IVM)	Sim	33	20,8
	Não	126	79,2
Invasão linfática microscópica (ILM)	Sim	17	10,7
	Não	142	89,3
Invasão da veia renal	Sim	24	10,8
	Não	198	89,2
Invasão da veia cava inferior	Sim	5	2,3
	Não	215	97,7
Total	-	220	100,0

* Pacientes submetidos à nefrectomia parcial considerados como N0.

Tabela 5 - Variáveis relacionadas do estadiamento dos pacientes portadores de CCR (n=220).

Variável	Categoria	N	%
Estadiamento patológico (T)	pT1a	38	17,5
	pT1b	54	24,9
	pT2a	32	14,7
	pT2b	18	8,3
	pT3a	55	25,3
	pT3b	4	1,8
	pT3c	0	0,0
	pT4	16	7,4
Estadiamento patológico (N)	pNx	57	26,3
	pN0	142	65,4
	pN1	18	8,3
Agrupamento por estádios	I	95	43,2
	II	41	18,6
	III	46	21
	IV	38	17,2
Total	-	220	100,0

Tabela 6 - Desfechos clínicos após o tratamento do tumor primário e situação clínica aos 10 anos do estudo dos pacientes portadores de CCR (n=220).

Variável	Categoria	N	%
Falhas*	Não	153	79,0
	Sim	40	21,0
Situação clínica ao término do estudo	Vivos sem doença	128	58,2
	Vivos com doença	22	10,0
	Morte por CCR	41	18,6
	Morte por outras causas	17	7,7
	Perda de seguimento	12	5,5
Total	-	220	100,0

* excluídos os pacientes com metástase ao diagnóstico

4 RESULTADOS

4.1 REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS DA EPO

A avaliação da média do escore de expressão da EPO nos casos de CCR e nos tecidos benignos (não neoplásicos) adjacentes revelou maior grau de expressão nos tecidos benignos ($p < 0,001$). A média de expressão de EPO nos casos de CCR foi de 2,01 (dp=1,64 e mediana=2,0). Nos tecidos benignos, a média foi de 3,65 (dp=1,35 e mediana de 4,0) (**Figura 4**).

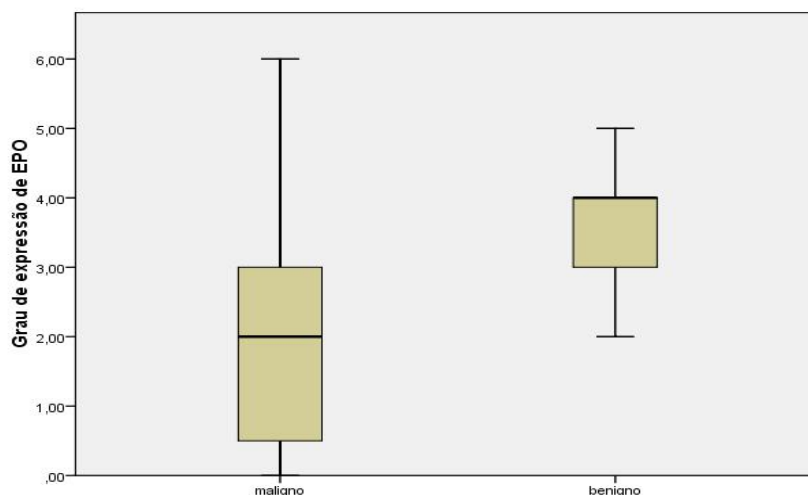


Figura 4 - Gráfico descritivo de Boxplot demonstrando grau de expressão de EPO em tecido não neoplásico (n=51) e em CCR (n=220). $p < 0,001$

Dos 220 pacientes portadores de CCR avaliados por imunohistoquímica, 77 (35%) apresentaram baixa expressão de EPO e 143 (65%) pacientes apresentaram alta expressão. A EPO apresentou um padrão de expressão citoplasmático predominantemente homogêneo.

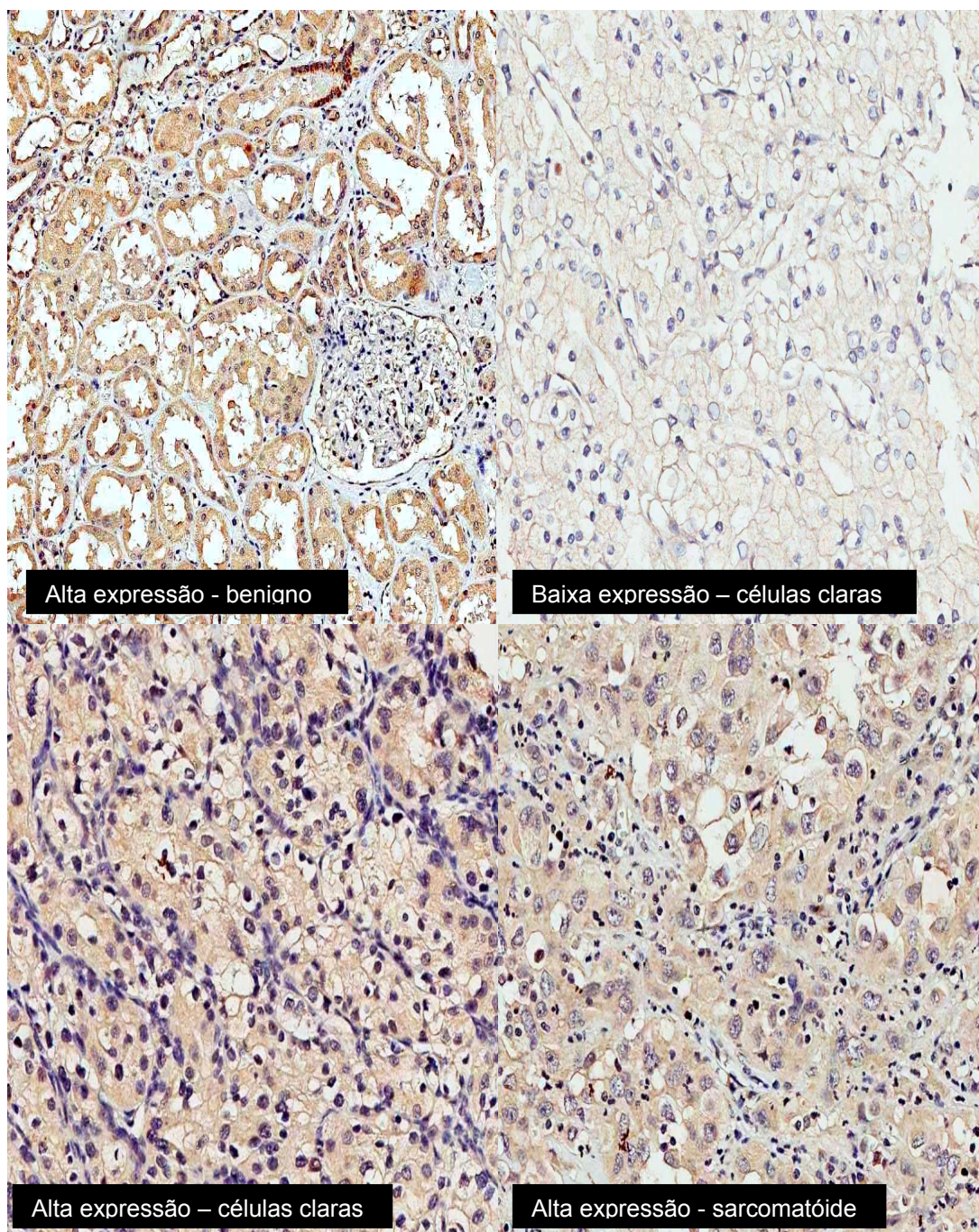


Figura 5 - Fotomicrografias dos padrões de expressão imuno-histoquímica de EPO nos diferentes tecidos considerados (aumento original 400x).

As associações dos graus de expressão imuno-histoquímica de EPO e as principais variáveis clínicas e demográficas foram avaliadas, conforme descrito na **Tabela 7**. A idade ao diagnóstico categorizada, a necessidade de transfusão sanguínea, a presença de sintomas ao diagnóstico e o tabagismo estavam associados ao grau de expressão de EPO. Quanto menor a idade ao diagnóstico, maior foi o grau de expressão de EPO. A alta expressão de EPO foi proporcionalmente maior entre os pacientes assintomáticos ao diagnóstico quando comparados aos indivíduos sintomáticos, 72,4% versus 57,7%. Dos 118 pacientes não fumantes, a maioria (78%) apresentava alta expressão de EPO. Quanto à transfusão sanguínea durante o tratamento do CCR, a alta expressão de EPO foi observada em 25 (53,2%) dos pacientes transfundidos e em 123 (71%) daqueles não transfundidos.

Tabela 7 - Expressão quantitativa de EPO segundo variáveis clínicas e demográficas de 220 pacientes portadores de CCR.

Variável	Categoria	Baixa expressão n (%)	Alta expressão n (%)	p
Idade	14 a 38 anos	4 (22,2)	14 (77,8)	0,039
	39 a 62 anos	39 (31,5)	85 (68,5)	
	63 a 86 anos	35 (44,9)	43 (55,1)	
Sexo	Masculino	43 (32,1)	91 (67,9)	0,259
	Feminino	34 (39,5)	52 (60,5)	
Raça	Branco	70 (35)	130 (65)	0,589
	Não brancos	7 (35)	13 (65)	
Sintomas ao diagnóstico	Sim	44 (42,3)	60 (57,7)	0,010
	Não	32 (27,5)	84 (72,4)	
Tabagismo	Sim	33 (42,9)	44 (57,1)	0,002
	Não	26 (22)	92 (78)	
	<i>Missing=25</i>			
Metástase ao ao diagnóstico	Sim	12 (44,4)	15 (55,6)	0,289
	Não	66 (34,1)	127 (65,9)	
KPS	<80	4 (36,4)	7 (62,6)	0,121
	≥80	25 (17,1)	121 (82,9)	
	<i>Missing=63</i>			
ECOG <i>Performance Status</i>	0	20 (19)	85 (81)	0,751
	1+2	9 (17)	44 (83)	
	<i>Missing=62</i>			
ASA	1	4 (15,4)	22 (84,6)	0,079
	2	55 (39)	86 (61)	
	3	18 (35,3)	33 (64,7)	
	4	0 (0)	2 (100)	
Hemoglobina (pré-operatório)	<12	27 (41,5)	38 (58,5)	0,216
	≥12	50 (32,3)	105 (67,7)	
Transfusão sanguínea	Sim	22 (46,8)	25 (53,2)	0,016
	Não	50(29)	123 (71)	

Na avaliação das variáveis anatomopatológicas, foi observada associação entre o grau de expressão de EPO e o tipo histológico ($p=0,001$), o grau de Fuhrman ($p=0,006$) e a presença de acometimento da adrenal ($p=0,023$). A alta expressão de EPO foi proporcionalmente menor nos tumores de células claras quando comparado aos outros tipos histológicos, 58% versus 93,2%. Dos 38 pacientes com grau de Fuhrman 4, 81,6% apresentaram alta expressão de EPO. Quanto ao acometimento da adrenal, a baixa expressão foi observada em 7,1% dos pacientes e a grande maioria (92,9%) apresentava alta expressão de EPO (**Tabela 8**).

Tabela 8 - Expressão quantitativa de EPO segundo variáveis anatomopatológicas dos 220 pacientes portadores de CCR.

Variável	Categoria	Baixa expressão n (%)	Alta expressão n (%)	p
Tipo histológico	Células claras	74 (42)	102 (58)	0,001
	Papilífero tipo 1	0 (0)	6 (100)	
	Papilífero tipo 2	1 (6,7)	14 (93,3)	
	Cromóforo	2 (13,3)	13 (86,7)	
	Inclassificável	0 (0)	4 (100)	
	Sarcomatóide	0 (0)	3 (100)	
	Ductos coletores	0 (0)	1 (100)	
Tipo histológico	Células claras	74 (42)	102 (58)	<0,001
	Não Células claras	3 (6,8)	41 (93,2)	
Grau de Fuhrman	1	1 (33)	2 (67)	0,006
	2	14 (36,8)	24 (63,2)	
	3	52 (48,6)	55 (51,4)	
	4	7 (18,4)	31 (81,6)	
Necrose tumoral	Sim	34 (36,6)	59 (63,4)	0,669
	Não	43 (33,8)	84 (66,2)	
Invasão da gordura e/ou seio renal	Sim	25 (43,9)	32 (56,1)	0,110
	Não	53 (32,5)	110 (67,5)	
Invasão da pelve e/ou ureter	Sim	4 (25)	12 (75)	0,430
	Não	74 (36,2)	130 (63,8)	
Invasão de adrenal	Sim	1 (7,1)	13 (92,9)	0,023
	Não	77 (37,1)	129 (62,9)	
Invasão venosa microscópica (IVM)	Sim	7 (21,2)	26 (78,8)	0,622
	Não	22 (17,7)	102 (82,3)	
	Missing=63			
Acometimento linfonodal*	Sim	5 (27,8)	13 (72,2)	0,449
	Não	75 (37,1)	127 (62,9)	
Estadiamento patológico (pT)	pT1a	9 (24,3)	28 (75,7)	0,072
	pT1b	15 (28,3)	38 (33,9)	
	pT2a	13 (40,6)	19 (59,4)	
	pT2b	8 (47,1)	9 (52,9)	
	pT3a	27 (49,1)	28 (50,9)	
	pT3b	2 (50)	2 (50)	
	pT3c	0 (0)	0	
	pT4	3 (18,8)	13 (81,3)	
Estadiamento patológico (pN)	Nx	14 (25,5)	41 (74,5)	0,097
	N0	58 (41,1)	83 (58,9)	
	N1	5 (27,8)	13 (72,2)	

* Pacientes submetidos à nefrectomia parcial considerados como N0

4.1.1 Análise qualitativa da expressão de EPO

Em nossa casuística, dos 220 pacientes portadores de CCR avaliados por imuno-histoquímica, 49 (22,3%) não expressaram EPO e 171 (76,7%) apresentaram algum grau de expressão desse marcador, sendo considerados positivos.

Da mesma forma, foram avaliadas as associações com as principais variáveis clínicas e demográficas (**Tabela 9**). A presença de expressão de EPO foi proporcionalmente maior entre os pacientes mais jovens. Além disso, entre os pacientes assintomáticos ao diagnóstico, a expressão de EPO foi de 91,4% versus 86,9% entre os pacientes com sintomas. Do mesmo modo, a presença de expressão de EPO foi proporcionalmente maior entre os pacientes não transfundidos. Outras variáveis como KPS ≥ 80 e valor de hemoglobina no pré-operatório ≥ 12 também estavam associadas à presença de expressão de EPO. Dos pacientes classificados como KPS ≥ 80 , a grande maioria (95,2%) expressaram EPO. De forma semelhante, 82,6% dos pacientes com hemoglobina no pré-operatório ≥ 12 também expressaram EPO.

No estudo das associações com as variáveis anatomopatológicas foi também observado que a expressão de EPO foi proporcionalmente menor entre os tumores de células claras quando comparados aos outros tipos histológicos, 73,3% versus 95,5%. O grau de Fuhrman não se associou à presença de expressão de EPO nessa nova análise ($p=0,177$). Dos 14 pacientes com acometimento da adrenal, 100% expressaram EPO. (**Tabela 10**).

Tabela 9 - Expressão qualitativa de EPO segundo variáveis clínicas e demográficas dos 220 pacientes portadores de CCR.

Variável	Categoria	Ausente n (%)	Presente n (%)	p
Idade	14 a 38 anos	2 (11,1)	16 (88,9)	0,003
	39 a 62 anos	19 (15,3)	105 (84,7)	
	63 a 86 anos	27 (34,6)	51 (65,4)	
Sexo	Masculino	27 (20,1)	107 (79,9)	0,345
	Feminino	22 (25,6)	64 (74,4)	
Raça	Branços	46 (23)	154 (77)	0,576
	Não brancos	3 (15)	17 (85)	
Sintomas ao diagnóstico	Sim	29 (13,1)	75 (86,9)	0,013
	Não	19 (8,6)	97 (91,4)	
Tabagismo	Sim	18 (23,4)	59 (76,6)	0,077
	Não	16 (13,6)	102 (86,4)	
	<i>Missing=25</i>			
Metástase ao ao diagnóstico	Sim	8 (29,6)	19 (70,4)	0,334
	Não	41 (21,4)	152 (78,6)	
KPS	<80	3 (27,3)	8 (72,7)	0,024
	≥80	7 (4,8)	139 (95,2)	
	<i>Missing=63</i>			
ECOG <i>Performance Status</i>	0	4 (3,8)	101 (96,2)	0,086
	1+2	6 (11,3)	47(88,7)	
	<i>Missing=62</i>			
ASA	1	2 (7,7)	24 (92,3)	0,152
	2	32 (22,7)	109 (77,3)	
	3	15 (29,4)	36 (70,2)	
	4	0 (0)	2 (100)	
Hemoglobina (pré-operatório)	<12	22 (33,8)	43 (66,2)	0,008
	≥12	27 (17,4)	128 (82,6)	
Transfusão sanguínea	Sim	17 (36,2)	30 (63,8)	0,003
	Não	32 (14,5)	141 (85,4)	

Tabela 10 - Expressão qualitativa de EPO segundo variáveis anatomopatológicas dos 220 pacientes portadores de CCR.

Variável	Categoria	Ausente n (%)	Presente n (%)	p
Tipo histológico	Células claras	47 (26,7)	129 (73,3)	0,090
	Papilífero tipo 1	0 (0)	6 (100)	
	Papilífero tipo 2	0 (0)	15 (100)	
	Cromóforo	2 (13,3)	13 (86,7)	
	Inclassificável	0 (0)	4 (100)	
	Sarcomatóide	0 (0)	3 (100)	
	Ductos coletores	0 (0)	1 (100)	
Tipo histológico	Células claras	47 (26,7)	129 (73,3)	0,002
	Não células claras	2 (4,5)	42 (95,5)	
Grau de Fuhrman	1	1 (33,3)	2 (66,7)	0,177
	2	9 (23,7)	29 (76,3)	
	3	32 (29,9)	75 (70,1)	
	4	5 (13,2)	33 (86,8)	
Necrose tumoral	Sim	23 (24,7)	70 (75,3)	0,404
	Não	25 (20)	102 (80)	
Invasão da gordura e/ou seio renal	Sim	17 (29,8)	40 (70,2)	0,117
	Não	32 (19,9)	130 (80,2)	
Invasão da pelve e/ou ureter	Sim	3 (18,8)	13 (81,3)	0,773
	Não	46 (22,7)	157 (77,3)	
Invasão de adrenal	Sim	0 (0)	14 (100)	0,038
	Não	49 (23,9)	157 (76,1)	
Invasão venosa microscópica (IVM)	Sim	2 (6,1)	31 (93,9)	0,935
	Não	8 (6,5)	116 (5)	
<i>Missing=63</i>				
Acometimento linfonodal*	Sim	5 (27,8)	13 (72,2)	0,568
	Não	47 (23,2)	155 (76,7)	
Estadiamento patológico (pT)	pT1a	5 (13,5)	32 (86,5)	0,133
	pT1b	10 (18,9)	43 (81,1)	
	pT2a	6 (18,8)	26 (81,3)	
	pT2b	7 (41,2)	10 (58,8)	
	pT3a	18 (32,7)	37 (67,3)	
	pT3b	1 (25)	3 (75)	
	pT3c	0 (0)	0 (0)	
	pT4	2 (12,5)	14 (87,5)	
Estadiamento patológico (pN)	Nx	4 (7,3)	51 (92,7)	0,006
	N0	40 (28,4)	101 (71,6)	
	N1	5 (27,8)	13 (72,2)	

* Pacientes submetidos à nefrectomia parcial considerados como N0

4.2 REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS DO EPO-R

Na comparação das médias do grau de expressão de EPO-R dos casos de CCR e dos tecidos benignos adjacentes (não neoplásicos) foi observado menor expressão nos tecidos malignos ($p=0,002$). A média de expressão imuno-histoquímica no CCR foi de 1,03 ($dp=1,16$ e mediana=1,0). Nos tecidos benignos, a média de expressão foi de 1,42 ($dp=0,83$ e mediana=1,75).

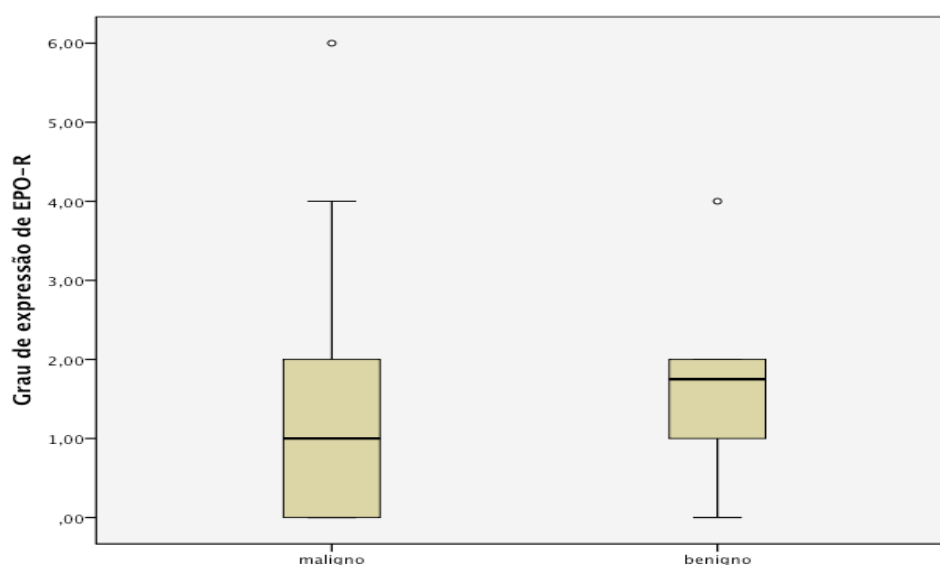


Figura 6 – Gráfico descritivo de Boxplot demonstrando o grau de expressão de EPO-R em tecido não neoplásico ($n=50$) e em CCR ($n=213$).

Dos pacientes portadores de CCR submetidos à imunohistoquímica para EPO-R, 132 (62%) apresentaram baixo grau de expressão e 81 (38%) alto grau. O EPO-R também apresentou padrão de expressão citoplasmático predominante. A **Figura 7** representa os padrões de expressão imuno-histoquímica de EPO-R nos diferentes tecidos considerados.

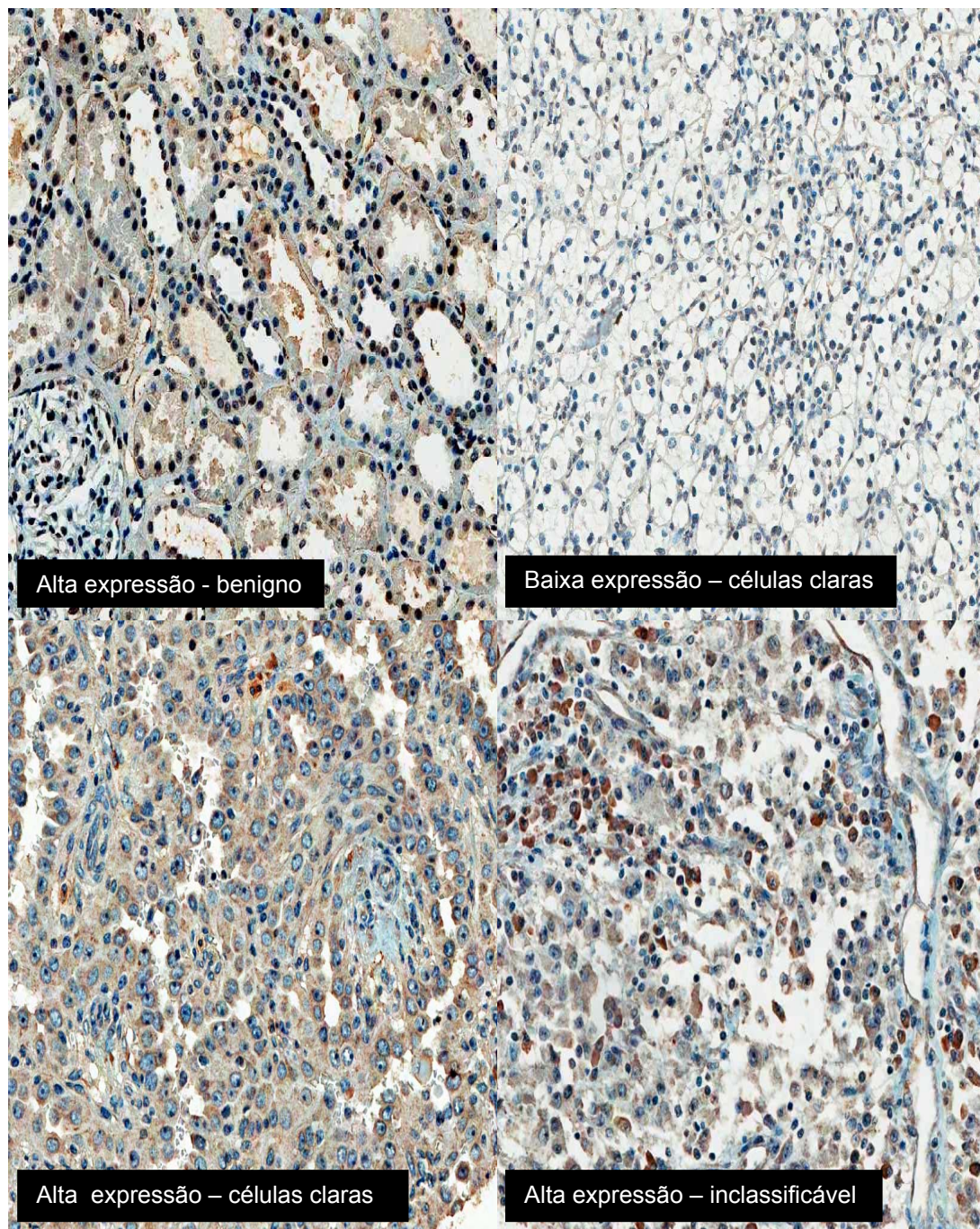


Figura 7 - Fotomicrografias dos padrões de expressão imuno-histoquímica de EPO-R nos diferentes tecidos considerados (aumento original 400x).

Observou-se associação estatisticamente significativa entre a idade categorizada e o grau de expressão de EPO-R ($p=0,050$). Dos 77 pacientes com idade de 63 a 86 anos, 71,4% apresentavam baixo grau de expressão e

28,6% alto grau. Não foram observadas outras associações do grau de expressão de EPO-R com as demais variáveis clínicas e demográficas (Tabela 11).

Tabela 11 - Expressão quantitativa de EPO-R segundo variáveis clínicas e demográficas de 213 pacientes portadores de CCR.

Variável	Categoria	Baixa expressão n (%)	Alta expressão n (%)	p
Idade	14 a 38 anos	8 (43,8)	10 (56,2)	0,050
	39 a 62 anos	69 (58,4)	49 (41,6)	
	63 a 86 anos	55 (71,4)	22 (28,6)	
Sexo	Masculino	81 (63,3)	47 (36,7)	0,629
	Feminino	51 (60)	34 (40)	
Raça	Branços	117 (60,9)	75(39,1)	0,347
	Não brancos	15 (71,4)	6 (28,6)	
Sintomas ao diagnóstico	Sim	62 (63,9)	35 (36,1)	0,567
	Não	68 (58,6)	48 (41,7)	
Tabagismo	Sim	43 (59,7)	29 (40,3)	0,535
	Não	71 (60,2)	47 (39,8)	
	<i>Missing=23</i>			
Metástase ao ao diagnóstico	Sim	16 (59,3)	11 (40,7)	0,730
	Não	116 (62,7)	69 (37,3)	
KPS	<80	4 (36,4)	7 (63,6)	0,164
	≥80	84 (57,9)	61 (42,1)	
	<i>Missing=57</i>			
ECOG <i>Performance Status</i>	0	58 (55,2)	47 (44,8)	0,771
	1+2	30 (57,7)	22 (42,3)	
	<i>Missing=56</i>			
ASA	1	13 (50)	13 (50)	0,146
	2	88 (65,2)	47 (51,3)	
	3	31 (62)	19 (38)	
	4	0 (0)	2 (100)	
Hemoglobina (pré-operatório)	<12	37 (61,7)	23 (38,3)	0,537
	≥12	95 (62,1)	58 (37,9)	
Transfusão sanguínea	Sim	31 (67,4)	15 (32,6)	0,210
	Não	98 (58,6)	69 (41,4)	

Na análise das variáveis anatomopatológicas foi observada associação entre o grau de expressão de EPO-R e o tipo histológico estratificado ($p=0,023$), o grau de Fuhrman ($p=0,003$), a presença de acometimento da pelve e/ou ureter ($p=0,034$) e a presença de invasão venosa microscópica (IVM) ($p=0,026$). Da mesma forma que a EPO, a alta expressão de EPO-R foi proporcionalmente menor nos tumores de células claras quando comparado aos outros tipos histológicos agrupados, 34,3% versus 52,3%. Quanto ao grau de Fuhrman, os tumores classificados como 1 a 3 apresentaram maior incidência de baixa expressão de EPO-R. Do contrário, a maioria dos tumores Fuhrman 4 (61,8%) apresentaram alta expressão de EPO-R. A alta expressão de EPO-R também foi proporcionalmente maior nos pacientes com acometimento da pelve e/ou ureter e naqueles com invasão venosa microscópica, 64,3% e 60,6%, respectivamente (**Tabela 12**).

Tabela 12 - Expressão quantitativa de EPO-R segundo variáveis anatomopatológicas dos 213 pacientes portadores de CCR.

Variável	Categoria	Baixa expressão n (%)	Alta expressão n (%)	p
Tipo histológico	Células claras	111 (65,7)	58 (34,3)	0,058
	Papilífero tipo 1	2 (33,3)	4 (66,7)	
	Papilífero tipo 2	6 (40)	9 (60)	
	Cromóforo	10 (62,5)	6 (37,5)	
	Inclassificável	3 (75)	1 (25)	
	Sarcomatóide	0 (0)	2 (100)	
	Ductos coletores	0 (0)	1 (100)	
Tipo histológico	Células claras	111 (65,7)	58 (34,3)	0,023
	Não Células claras	21 (47,7)	23 (52,3)	
Grau de Fuhrman	1	2 (66,7)	1 (33,3)	0,003
	2	27 (71,1)	11 (28,9)	
	3	74 (71,8)	29 (28,2)	
	4	13 (38,2)	21 (61,8)	
Necrose tumoral	Sim	53 (60,9)	34 (39,1)	0,770
	Não	79 (62,3)	47 (37,7)	
Invasão da gordura e/ou seio renal	Sim	36 (65,5)	19 (34,5)	0,571
	Não	97 (61,4)	61 (38,6)	
Invasão da pelve e/ou ureter	Sim	5 (35,7)	9 (64,3)	0,034
	Não	128 (64,3)	71 (35,7)	
Invasão de adrenal	Sim	9 (64,3)	5 (35,7)	0,872
	Não	124 (62,3)	75 (37,7)	
Invasão venosa microscópica (IVM)	Sim	13 (39,4)	20 (60,6)	0,026
	Não	75 (61)	48 (39)	
	Missing=57			
Acometimento linfonodal*	Sim	9 (52,9)	8 (47,1)	0,405
	Não	123 (62,7)	73 (37,3)	
Estadiamento patológico (pT)	pT1a	23 (52,2)	21 (47,8)	0,493
	pT1b	29 (55,8)	23 (44,2)	
	pT2a	19 (70,4)	8 (29,6)	
	pT2b	12 (70,6)	5 (29,4)	
	pT3a	37 (69,8)	16 (30,2)	
	pT3b	3 (75)	1 (25)	
	pT3c	0 (0)	0 (0)	
	pT4	9 (56,3)	7 (43,8)	
Estadiamento patológico (pN)	Nx	36 (64,3)	20 (35,7)	0,692
	N0	87 (62,1)	53 (37,9)	
	N1	9 (52,9)	8 (47,1)	

* Pacientes submetidos à nefrectomia parcial considerados como N0

4.2.1 Análise qualitativa da expressão de EPO-R

Considerando a nova estratificação conforme descrito anteriormente, um total de 90 pacientes (42,3%) não expressaram EPO-R e 123 (57,7%) expressaram esse marcador.

Das variáveis clínicas analisadas, a EPO-R se associou com a idade categorizada ($p=0,015$) e necessidade de transfusão sanguínea ($p=0,004$). Do mesmo modo, a presença de expressão de EPO-R foi proporcionalmente maior entre os pacientes mais jovens. Além disso, a presença de expressão de EPO-R foi maior entre os pacientes não transfundidos quando comparados aos transfundidos, 65,2% versus 41,3%. **(Tabela 13).**

Na avaliação das variáveis anatomopatológicas foi observado associação de EPO-R com o tipo histológico estratificado ($p=0,024$) e a presença de acometimento da pelve e/ou ureter ($p=0,027$). Os pacientes portadores de CCR tipo células claras apresentaram expressão de EPO-R em 53,8% dos casos, enquanto que nos portadores de outros tipos histológicos agrupados a expressão de EPO-R foi de 72,7% dos casos. Dos pacientes com invasão da pelve e/ou ureter, a maioria (85,7%) apresentou expressão de EPO-R. A expressão de EPO-R não se associou com o grau de Fuhrman nessa nova estratificação ($p=0,129$), bem como não se associou com a presença de invasão venosa microscópica (IVM) ($p=0,616$) **(Tabela 14).**

Tabela 13 - Expressão qualitativa de EPO-R segundo variáveis clínicas e demográficas de 213 pacientes portadores de CCR.

Variável	Categoria	Ausente n (%)	Presente n (%)	p
Idade	14 a 38 anos	5 (25)	13 (75)	0,015
	39 a 62 anos	43 (36,4)	75 (63,6)	
	63 a 86 anos	42 (54,5)	35 (45,5)	
Sexo	Masculino	53 (41,4)	75 (58,6)	0,759
	Feminino	37 (43,5)	48 (56,5)	
Raça	Branços	81 (42,2)	111 (57,8)	0,953
	Não brancos	9 (42,9)	12 (57,1)	
Sintomas ao diagnóstico	Sim	45 (46,4)	52 (53,6)	0,165
	Não	44 (37,9)	72 (62,1)	
Tabagismo	Sim	25 (34,7)	47 (65,3)	0,413
	Não	48 (40,7)	70 (59,3)	
	<i>Missing=23</i>			
Metástase ao ao diagnóstico	Sim	8 (29,6)	19 (70,4)	0,149
	Não	82 (44,3)	103 (55,7)	
KPS	<80	4 (36,4)	7 (63,6)	0,862
	≥80	49 (33,8)	96 (66,2)	
	<i>Missing=57</i>			
ECOG <i>Performance Status</i>	0	35 (33,3)	70 (66,7)	0,873
	1+2	18 (34,6)	34 (65,4)	
	<i>Missing=56</i>			
ASA	1	8 (30,8)	18 (69,2)	0,339
	2	62(45,9)	73 (54,1)	
	3	20 (40)	30 (60)	
	4	0 (0)	2 (100)	
Hemoglobina (pré-operatório)	<12	25 (41,7)	35 (58,3)	0,914
	≥12	65 (42,5)	88 (57,5)	
Transfusão sanguínea	Sim	27 (58,7)	19 (41,3)	0,004
	Não	60 (35,9)	107 (64,1)	

Tabela 14 - Expressão qualitativa de EPO-R segundo variáveis anatomopatológicas de 213 pacientes portadores de CCR.

Variável	Categoria	Ausente n (%)	Presente n (%)	p
Tipo histológico	Células claras	78 (46,2)	91 (53,8)	0,062
	Papilífero tipo 1	0 (0)	6 (100)	
	Papilífero tipo 2	3 (20)	12 (80)	
	Cromóforo	7 (43,8)	9 (56,3)	
	Inclassificável	2 (50)	2 (50)	
	Sarcomatóide	0 (0)	2 (100)	
	Ductos coletores	0 (0)	1 (100)	
Tipo histológico	Células claras	78 (46,2)	91 (53,8)	0,024
	Não Células claras	12 (27,3)	32 (72,7)	
Grau de Fuhrman	1	1 (33,3)	2 (66,7)	0,129
	2	18 (47,4)	20 (52,6)	
	3	53 (51,5)	50 (48,5)	
	4	10 (29,4)	24 (70,6)	
Necrose tumoral	Sim	34 (39,1)	53 (60,9)	0,445
	Não	55 (44,4)	69 (55,6)	
Invasão da gordura e/ou seio renal	Sim	27 (49,1)	28 (50,9)	0,247
	Não	63 (40,1)	94 (59,)	
Invasão da pelve e/ou ureter	Sim	2 (14,3)	12 (85,7)	0,027
	Não	88 (44,4)	110 (55,6)	
Invasão de adrenal	Sim	6 (42,9)	8 (57,1)	0,975
	Não	84 (93,3)	115 (57,7)	
Invasão venosa microscópica (IVM)	Sim	10 (30,3)	23 (69,7)	0,616
	Não	43 (35)	80 (65)	
	Missing=57			
Acometimento linfonodal*	Sim	6 (35,3)	11 (64,7)	0,503
	Não	86 (43,8)	110 (56,1)	
Estadiamento patológico (pT)	pT1a	15 (33,3)	29 (66,7)	0,363
	pT1b	19 (36,5)	33 (63,5)	
	pT2a	13 (48,1)	14 (51,9)	
	pT2b	8 (47,1)	9 (52,9)	
	pT3a	29 (54,7)	24 (45,3)	
	pT3b	2 (50)	2 (50)	
	pT3c	0 (0)	0 (0)	
	pT4	6 (37,5)	10 (62,5)	
Estadiamento patológico (pN)	Nx	19 (33,9)	37 (66,1)	0,171
	N0	64 (47,8)	70 (52,2)	
	N1	6 (35,3)	11 (54,7)	

* Pacientes submetidos à nefrectomia parcial considerados como N0

4.3 ANÁLISE DE SOBREVIDA

4.3.1 Sobrevida global (SG)

Durante o seguimento, ocorreram 56 óbitos entre os pacientes analisados. A taxa de SG em 5 anos e 10 anos foi de 77,5% e 74,8%, respectivamente (Figura 12).

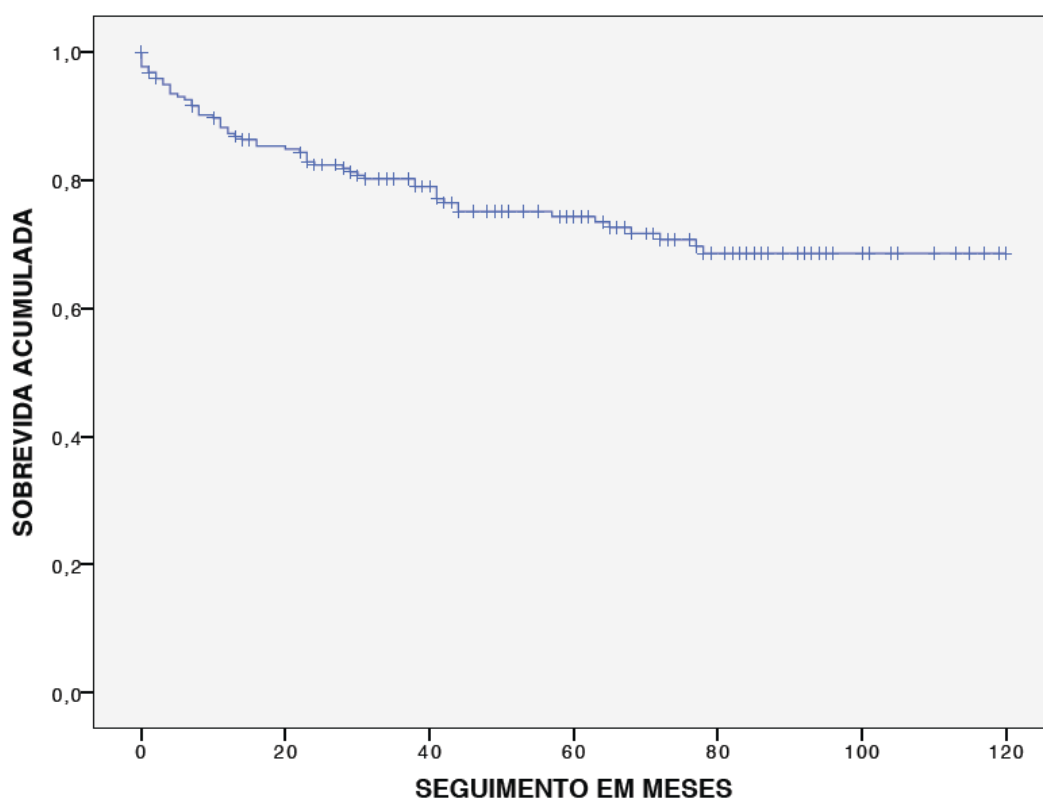


Figura 8 - Curva de sobrevida global aos 120 meses para os 220 pacientes portadores de CCR.

A análise univariada de SG foi realizada considerando apenas os pacientes válidos do TMA. As variáveis clínicas e demográficas que influenciaram a SG foram idade categorizada ($p=0,011$), sintomas ao diagnóstico ($p<0,001$), metástase ao diagnóstico ($p<0,001$), KPS ($p<0,001$), ECOG (0,002), ASA ($<0,001$), hemoglobina no pré-operatório ($<0,001$), transfusão sanguínea ($p<0,001$) e estadió clínico ($p<0,001$), como demonstrado na **Tabela 15**.

Aos 10 anos de seguimento, a maioria das variáveis patológicas avaliadas apresentaram impacto estatisticamente significativo na SG (**Tabela 16**). Em análise univariada dos marcadores estudados, os pacientes com baixa expressão de EPO apresentaram pior taxa de SG quando comparado aos pacientes com alta expressão, com quase o dobro de chance de morrer aos 120 meses (HR 1,95; IC 95% 1,15-3,30; $p=0,010$). O grau de expressão de EPO-R não influenciou a SG em 5 e 10 anos ($p=0,951$) (**Tabela 17**).

Tabela 15 - Probabilidade acumulada de SG de portadores de CCR aos 5 anos e 10 anos de seguimento de acordo com variáveis clínicas.

Variável	Categoria	SG 5 anos n (%)	p	SG 10 anos n (%)	p
Idade (anos)	14 a 38	14 (82,4)	0,027	14 (82,4)	0,030
	39 a 62	103 (82,4)		102 (81,6)	
	63 a 86	53 (67,9)		48 (61,5)	
Sexo	Masculino	102 (76,6)	0,594	96 (72,1)	0,302
	Feminino	70 (80,4)		67 (77)	
Raça	Branco	155 (77,5)	0,719	149 (74,5)	0,579
	Não brancos	17 (85)		17 (85)	
Sintomas ao diagnóstico	Sim	69 (63,8)	<0,001	67 (62)	<0,001
	Não	97 (86,6)		93 (83)	
Tabagismo	Sim	63 (72,4)	0,444	58 (66,6)	0,969
	Não	92 (69,1)		91 (68,4)	
Metástase ao diagnóstico	Sim	8 (28,6)	<0,001	8 (28,6)	<0,001
	Não	163 (84,8)		157 (81,7)	
KPS	<80	5 (45,5)	<0,001	5 (45,5)	<0,001
	≥80	122 (82,4)		120 (81,1)	
ECOG <i>Performance Status</i>	0	93 (86,9)	<0,001	91 (85)	0,001
	1+2	35 (66)		35 (66)	
ASA agrupado	1 ou 2	136 (80)	0,024	133 (78,2)	0,004
	3 ou 4	36 (69,2)		33 (63,5)	
Hemoglobina (pré-operatório)	<12	38 (59,4)	<0,001	38 (59,4)	<0,001
	≥12	134 (84,8)		128 (81)	
Transfusão sanguínea	Sim	26 (49)	<0,001	26 (49)	<0,001
	Não	139 (82,3)		133 (79,6)	
Agrupamento por estádios	I	82 (90,1)		79 (86,8)	<0,001
	II	33 (80,5)		32 (78)	
	III	35 (76,1)		33 (71,7)	
	IV	16 (42,1)		16 (42,1)	

Tabela 16 - Probabilidade acumulada de SG de portadores de CCR aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo com variáveis anatomopatológicas.

Variável	Categoria	SG 5 anos n (%)	p	SG 10 anos n (%)	p
Tipo histológico	Células claras	137 (78,2)		133 (76)	
	Papilífero tipo 1	5 (83,3)		4 (66,7)	
	Papilífero tipo 2	12 (80)		11 (73,3)	
	Cromóforo	15 (93,8)		15 (93,8)	
	Inclassificável	1 (25)		1 (25)	
	TTE gene	0 (0)		0 (0)	
	Sarcomatóide	2 (66,7)		2 (66,7)	
	Ductos coletores	0 (0)	<0,001	0 (0)	<0,001
Grau de Fuhrman	1 ou 2	32 (78)		30 (73,2)	
	3 ou 4	111 (76)	0,544	109 (74,7)	0,811
Necrose tumoral	Sim	64 (68,8)		62 (66,7)	
	Não	107 (84,3)	0,002	103 (81,1)	0,004
Invasão da gordura e/ou seio renal	Sim	35 (61,4)		33 (57,9)	
	Não	136 (83,4)	<0,001	132 (81)	<0,001
Invasão da pelve e/ou ureter	Sim	8 (50)		8 (80)	
	Não	163 (80)	<0,001	157 (76,9)	0,001
Invasão de adrenal	Sim	9 (64,3)		9 (64,3)	
	Não	162 (78,6)	0,151	156 (75,7)	0,209
Invasão venosa microscópica (IVM)	Sim	20 (60,6)		20 (60,6)	
	Não	107 (84,9)	<0,001	105 (83,3)	0,001
Invasão linfática microscópica (ILM)	Sim	7 (41,2)		7 (41,2)	
	Não	120 (84,5)	<0,001	118 (83,1)	<0,001
Acometimento lindnodal *	Sim	8 (44,4)		8 (44,4)	
	Não	158 (78,2)	<0,001	152 (75,2)	<0,001
Diâmetro tumoral	< 4 cm	53 (84,12)		49 (77,7)	
	> 4,1 a 7 cm	65 (90,2)		64 (88,8)	
	> 7,1 cm	49 (57,5)	<0,001	48 (56,4)	<0,001
Estadiamento patológico (pT)	pT1	82 (90,1)		79 (86,8)	
	pT2	39 (78)		38 (76)	
	pT3	36 (61)		34 (57,6)	
	pT4	9 (56,3)	<0,001	9 (56,3)	<0,001
Estadiamento patológico (pN)	Nx	47 (82,5)		46 (80,7)	
	N0	111 (78,7)		106 (75,2)	
	N1	8 (44,4)	<0,001	8 (44,4)	<0,001

* Pacientes submetidos à nefrectomia parcial considerados como

Tabela 17 - Probabilidade acumulada de SG de portadores de CCR aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo o grau de expressão de EPO e EPO-R.

Variável	Categoria	SG 5 anos n (%)	p (log rank)	SG 10 anos n (%)	p (log rank)
EPO	Baixa expressão	53 (68,4)	0,016	49 (64,5)	0,010
	Alta expressão	117 (81,8)		114 (79,7)	
EPO-R	Baixa expressão	99 (75,6)	0,966	95 (72,5)	0,951
	Alta expressão	63 (77,8)		61 (75,3)	

As curvas de sobrevida global para EPO e EPO-R estão representadas nas **Figuras 9 e 10**,

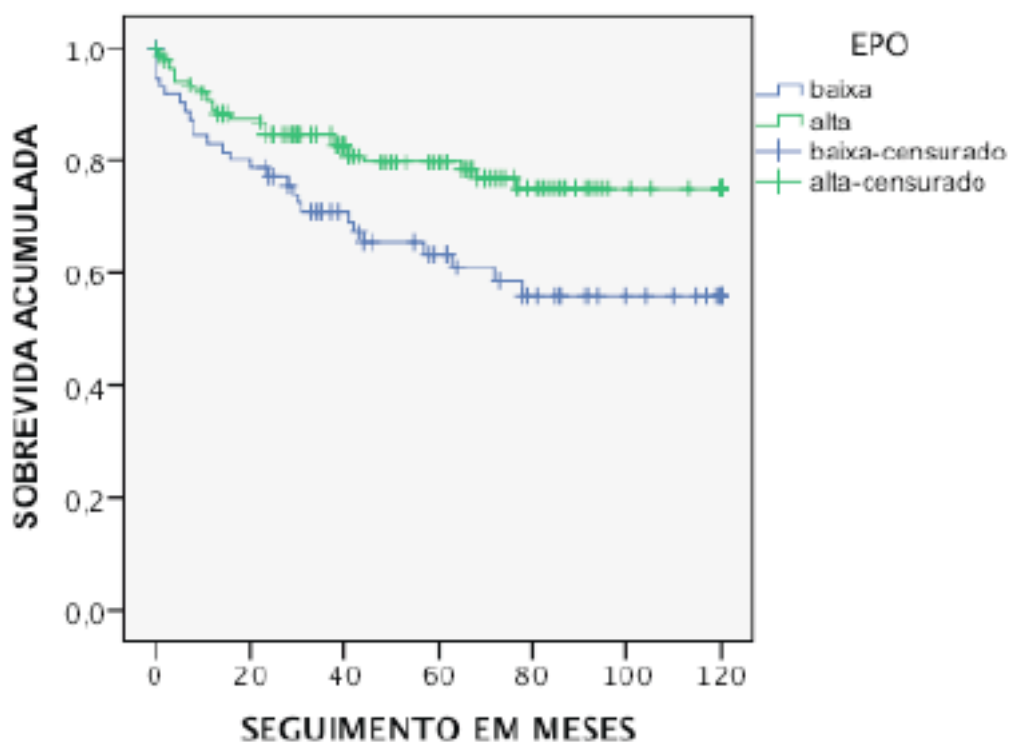


Figura 9 - Curva de sobrevida global em 120 meses para os pacientes portadores de CCR estratificados em baixo e alto grau de expressão de EPO ($p=0,010$).

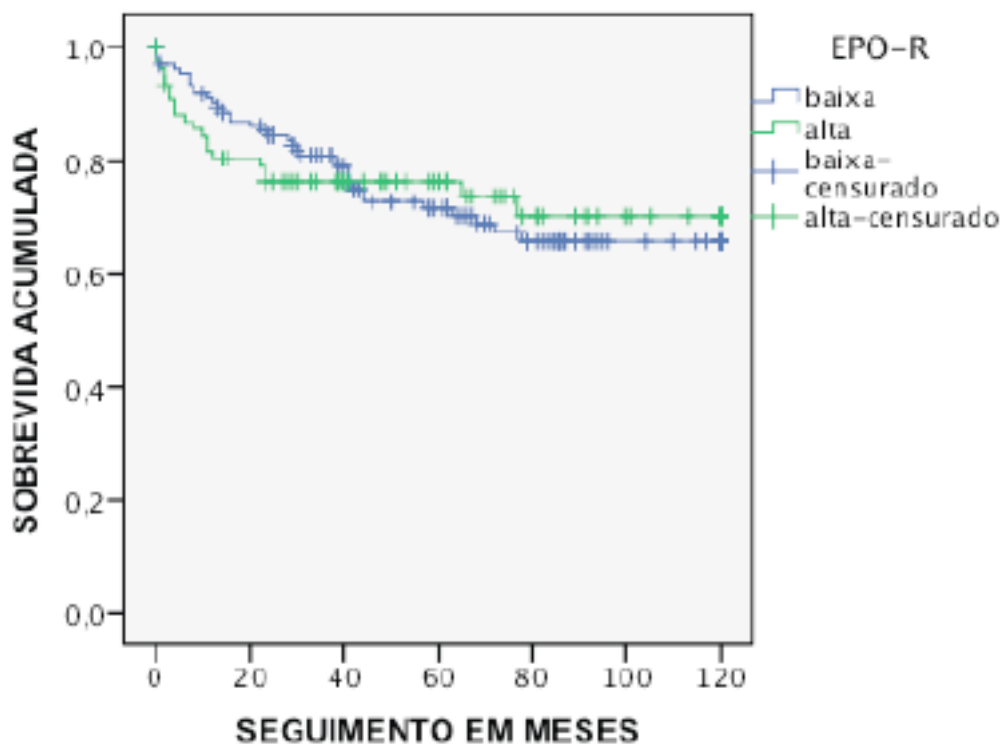


Figura 10 - Curva de sobrevida global em 120 meses para os pacientes portadores de CCR estratificados em baixo e alto grau de expressão de EPO-R ($p=0,951$).

Análise multivariada

Após análise multivariada pela *regressão logística de Cox* (backward), as variáveis que permaneceram como preditores independentes para o risco de óbito global foram: presença de metástase ao diagnóstico ($p<0,001$), classificação de ASA ($p=0,006$), presença de sintomas ao diagnóstico ($p=0,030$), transfusão sanguínea ($p=0,017$) e presença de invasão linfática microscópica (ILM) ($p=0,009$) (**Tabela 18**).

Tabela 18 - Análise multivariada do risco de óbito por variáveis selecionadas em portadores de CCR.

Variável	Categoria	RR	IC 95%	p
Metástase	Não	1	Referência 2,790 - 15,125	<0,001
	Sim	6,426		
ASA	1 ou 2	1	Referência 1,339 - 5,915	0,006
	3 ou 4	2,814		
Transfusão sanguínea	Não	1	Referência 1,177 - 5,139	0,017
	Sim	2,459		
Sintomas ao diagnóstico	Não	1	Referência 1,094 - 5,892	0,030
	Sim	2,538		
Invasão linfática microscópica (ILM)	Não	1	Referência 1,325 - 7,317	0,009
	Sim	3,114		

4.3.2 Análise de SG com estratificação qualitativa de EPO e EPO-R

A avaliação da SG também foi realizada estratificando os pacientes como expressão ausentes ou presente de EPO e EPO-R, conforme justificado anteriormente. Em análise univariada, a expressão de EPO influenciou positivamente a SG ($p>0,001$). As taxas de SG ao final do seguimento dos pacientes que expressaram e não expressaram EPO foram respectivamente, 79,5% e 56,3%. A presença de expressão de EPO-R também não influenciou a SG em 5 e 10 anos ($p=0,222$) (**Tabela 19**).

Tabela 19 - Probabilidade acumulada de SG de portadores de CCR aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo com a expressão qualitativa de EPO e EPO-R.

Variável	Categoria	SG 5 anos n (%)	p (log rank)	SG 10 anos n (%)	p (log rank)
EPO	Ausente	29 (60,4)	<0,001	27 (56,3)	<0,001
	Presente	140 (81,9)		136 (79,5)	
EPO-R	Ausente	63 (70,8)	0,148	61 (68,5)	0,222
	Presente	99 (80,5)		95 (77,2)	

A curva de sobrevida global para EPO de acordo com estratificação qualitativa está representada na **Figura 11**.

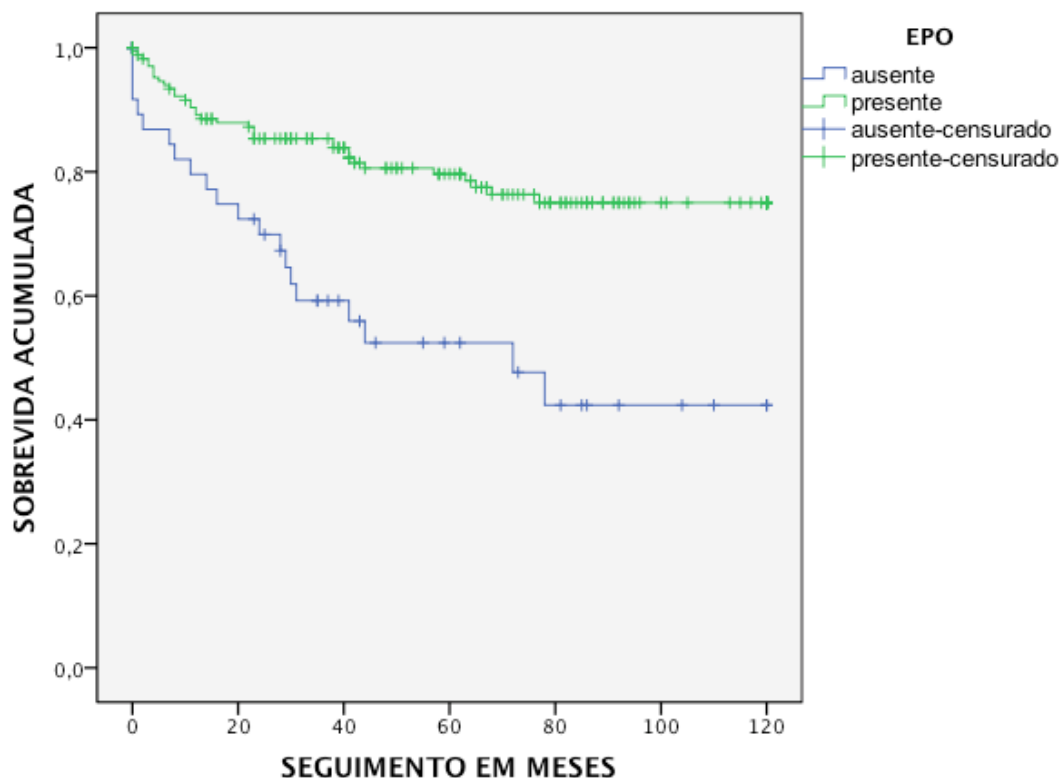


Figura 11 - Curva de sobrevida global em 120 meses para os pacientes portadores de CCR de acordo com estratificação qualitativa da expressão de EPO.

Análise multivariada

Após análise multivariada pela *regressão logística de Cox* (backward) e considerando a expressão qualitativa de EPO, as variáveis que permaneceram como preditores independentes para o risco de óbito global foram: presença de metástase ao diagnóstico ($p < 0,001$), classificação de ASA agrupada ($p = 0,029$), estadiamento clínico agrupado ($p = 0,011$) e expressão de EPO qualitativa ($p = 0,001$). O risco de óbito na ausência de

expressão de EPO foi um pouco mais que quatro vezes maior se comparado aos pacientes que expressaram EPO (HR 4,143; IC 95% 1,536-11,170) **(Tabela 20)**.

Tabela 20 - Análise multivariada do risco de óbito por variáveis selecionadas em portadores de CCR.

Variável	Categoria	RR	IC 95%	p
Metástase	Não	1	Referência	
	Sim	4,014	1,405-11,469	<0,001
ASA agrupado	1 e 2	1	Referência	
	3 e 4	2,309	1,090-4,893	0,029
Estadiamento clínico agrupado	I e II	1	Referência	
	III e IV	3,305	1,315-8,312	0,011
Expressão de EPO qualitativa	Presente	1	Referência	
	Ausente	4,143	1,536-11,170	0,001

4.3.3 Sobrevida câncer específica (SCE)

A SCE dos pacientes estudados em 5 anos foi de 82,4% e em 10 anos foi de 81,5%. Ao final do seguimento ocorreram 41 mortes por CCR. A curva de SCE para todos os casos está representada na **Figura 12**.

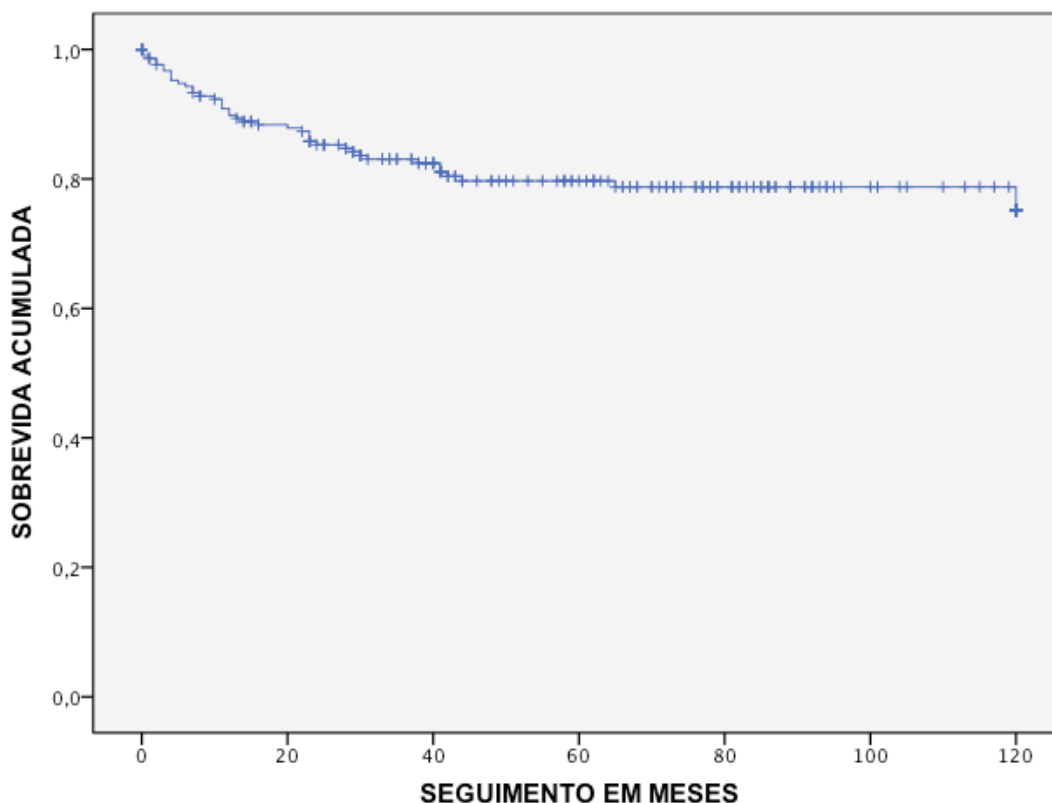


Figura 12 - Curva de sobrevida câncer específica em 120 meses para os 220 pacientes portadores de CCR.

Em análise univariada, as variáveis clínicas e demográficas que influenciaram a SCE aos 120 meses de seguimento foram: sintomas ao diagnóstico, ($p < 0,001$), KPS ($p = 0,029$), metástase ao diagnóstico ($p < 0,001$), ECOG ($p = 0,005$), ASA agrupado ($p = 0,012$), valor de hemoglobina no pré-operatório ($p < 0,001$), transfusão sanguínea ($p < 0,001$) e estadio clínico ($p < 0,001$) (**Tabela 21**).

Tabela 21 – Probabilidade acumulada de sobrevida SCE de portadores de CCR aos 5 anos e 10 anos de seguimento de acordo com variáveis clínicas.

Variável	Categoria	SCE 5 anos n (%)	p	SCE 10 anos n (%)	p
Idade (anos)	14 a 38	14 (82,4)	0,320	14 (82,4)	0,245
	39 a 62	106 (84,8)		105 (84)	
	63 a 86	61 (78,2)		60 (76,9)	
Sexo	Masculino	110 (82,1)	0,880	108 (80,6)	0,675
	Feminino	73 (83)		73 (83)	
Raça	Branco	166 (82,6)	0,872	164 (81,6)	0,969
	Não brancos	17 (81)		17 (81)	
Sintomas ao diagnóstico	Sim	77 (73,3)	<0,001	75 (69,4)	<0,001
	Não	99 (92,5)		99 (88,4)	
Tabagismo	Sim	66 (85,7)	0,500	65 (74,7)	0,514
	Não	98 (81,7)		97 (72,9)	
Metástase ao diagnóstico	Sim	9 (32,1)	<0,001	9 (32,1)	<0,001
	Não	173 (89,6)		171 (88,6)	
KPS	<80	7 (63,6)	0,011	7 (63,6)	0,014
	≥80	124 (83,8)		122 (82,4)	
ECOG <i>Performance Status</i>	0	94 (87,9)	0,003	92 (86)	0,006
	1+2	38 (71,7)		38 (71,7)	
ASA agrupado	1 ou 2	143 (84,1)	0,073	142 (83,5)	0,042
	3 ou 4	40 (76,9)		39 (75)	
Hemoglobina (pré-operatório)	<12	41 (64,1)	<0,001	40 (62,5)	<0,001
	≥12	142 (89,9)		141 (89,2)	
Transfusão sanguínea	Sim	27 (57,4)	<0,001	27 (51)	<0,001
	Não	148 (91,4)		146 (87,4)	
Agrupamento por estádios	I	89 (97,8)	<0,001	88 (96,7)	<0,001
	II	34 (82,9)		34 (82,9)	
	III	36 (76,1)		35 (76,1)	
	IV	18 (47,4)		18 (47,4)	

Na avaliação do impacto das variáveis anatomopatológicas, observou-se que quase todas as variáveis estudadas influenciaram a SCE. Variáveis prognósticas clássicas como presença de necrose tumoral ($p < 0,001$), invasão vascular microscópica (IVM) ($p < 0,001$), presença de acometimento linfonodal ($p < 0,001$) e estadiamento patológico (pT) ($p < 0,001$) foram estatisticamente significantes em análise univariada (**Tabela 22**).

O grau de expressão de EPO não influenciou a SCE aos 10 anos de seguimento, com taxas de sobrevida para baixa expressão e alta expressão de 78,9% e 82,5%, respectivamente ($p = 0,334$). Da mesma forma, o grau de expressão de EPO-R também não influenciou a SCE em 5 e 10 anos de seguimento, conforme ilustrado na **Tabela 23**.

Tabela 22 - Probabilidade acumulada de SCE de portadores de CCR aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo com variáveis anatomopatológicas.

Variável	Categoria	SG 5 anos n (%)	p	SG 10 anos n (%)	p
Tipo histológico	Células claras	147 (83,1)		147 (83,1)	
	Papilífero tipo 1	5 (83,3)		4 (66,7)	
	Papilífero tipo 2	13 (86,7)		12 (80)	
	Cromóforo	15 (93,8)		15 (93,8)	
	Inclassificável	1 (25)		1 (25)	
	TTE gene	0 (0)		0 (0)	
	Sarcomatóide	2 (66,7)		2 (66,7)	
	Ductos coletores	0 (0)	<0,001	0 (0)	<0,001
Grau de Fuhrman	1 ou 2	37 (90,2)		37 (90,2)	
	3 ou 4	116 (79,5)	0,088	116 (81,8)	0,088
Necrose tumoral	Sim	67 (72)		66 (71)	
	Não	114 (89,8)	<0,001	113 (89)	<0,001
Invasão da gordura e/ou seio renal	Sim	37 (64,9)		37 (64,9)	
	Não	145 (88,4)	<0,001	143 (87,2)	<0,001
Invasão da pelve e/ou ureter	Sim	9 (56,3)		9 (56,3)	
	Não	173 (84,4)	<0,001	171 (83,4)	<0,001
Invasão de adrenal	Sim	9 (64,3)		9 (64,3)	
	Não	173 (83,6)	0,043	171 (82,6)	0,054
Invasão venosa microscópica (IVM)	Sim	20 (60,6)		20 (60,6)	
	Não	111 (88,1)	<0,001	109 (86,5)	<0,001
Invasão linfática microscópica (ILM)	Sim	7 (41,2)		7 (41,2)	
	Não	124 (87,3)	<0,001	122 (85,9)	<0,001
Acometimento linfonodal *	Sim	8 (44,4)		7 (38,9)	
	Não	169 (83,66)	<0,001	168 (83,1)	<0,001
Diâmetro tumoral	< 4 cm	60 (95,2)		59 (93,6)	
	> 4,1 a 7 cm	66 (91,6)		66 (91,6)	
	> 7,1 cm	52 (61,1)	<0,001	51 (60)	<0,001
Estadiamento patológico (pT)	pT1	89 (97,8)		88 (96,7)	
	pT2	40 (80)		39 (78)	
	pT3	38 (64,4)		38 (64,4)	
	pT4	10 (62,5)	<0,001	10 (62,5)	<0,001
Estadiamento patológico (pN)	Nx	49 (86)		48 (84,2)	
	N0	120 (85,1)		120 (85,1)	
	N1	8 (44,4)	<0,001	7 (38,9)	<0,001

* Pacientes submetidos à nefrectomia parcial considerados como N0

Tabela 23 - Probabilidade acumulada de SCE de portadores de CCR aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo o grau de expressão de EPO e EPO-R.

Variável	Categoria	SCE 5 anos n (%)	p (log rank)	SCE 10 anos n (%)	p (log rank)
EPO	Baixa expressão	60 (78,9)	0,228	60 (78,9)	0,334
	Alta expressão	120 (83,9)		118 (82,5)	
EPO-R	Baixa expressão	107 (81,7)	0,766	106 (80,9)	0,707
	Alta expressão	66 (81,5)		65 (80,2)	

As curvas de SCE para EPO e EPO-R de acordo com o grau de expressão imuno-histoquímica desses marcadores estão representados nas **Figuras 13 e 14**.

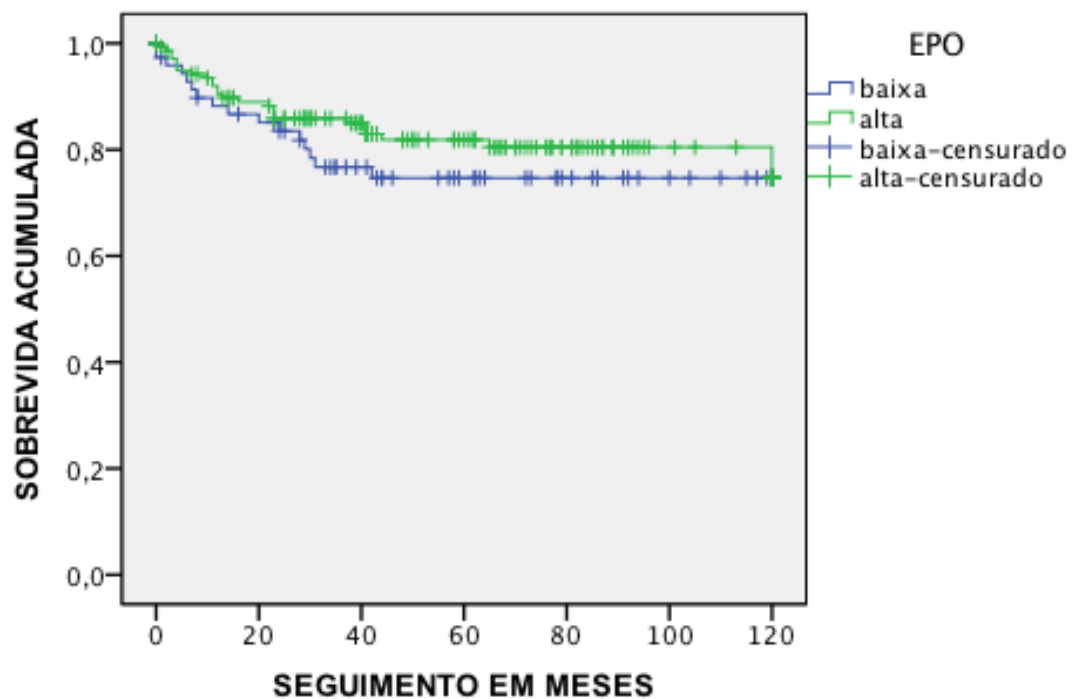


Figura 13 - Curva de sobrevivência câncer específica em 120 meses para os pacientes portadores de CCR estratificados em baixo e alto grau de expressão de EPO ($p=0,334$).

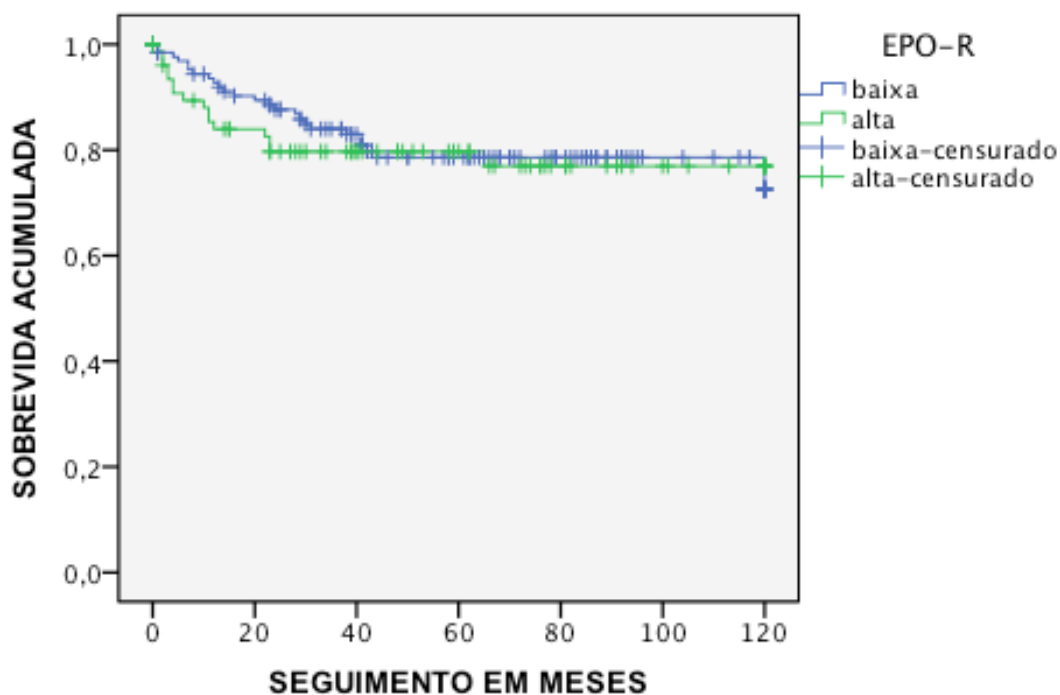


Figura 14 - Curva de sobrevida câncer específica em 120 meses para os pacientes portadores de CCR estratificados em baixo e alto grau de expressão de EPO-R ($p=0,707$).

Análise multivariada

Na análise multivariada com as variáveis selecionadas, a presença de metástase ao diagnóstico ($p<0,001$), o estadiamento clínico agrupado ($p=0,006$), a presença e necrose tumoral ($p=0,044$) e a necessidade de transfusão sanguínea ($p=0,040$) foram considerados fatores de risco independentes de óbito específico (**Tabela 24**).

Tabela 24 - Análise multivariada do risco de óbito específico por variáveis selecionadas em portadores de CCR.

Variável	Categoria	RR	IC 95%	p
Metástase	Não	1,000	Referência	<0,001
	Sim	8,576	3,549 - 20,720	
Necrose	Não	1,000	Referência	0,044
	Sim	2,371	1,025 - 5,484	
Estadiamento clínico agrupado	I e II	1	Referência	0,006
	III e IV	5,505	1,646-18.415	
Transfusão	Não	1	Referência	0,040
	Sim	2,228	1,039-4,778	

4.3.4 Análise de SCE com estratificação qualitativa de EPO e EPO-R

De acordo com a estratificação qualitativa foi observado que a presença de expressão de EPO influenciou de forma positiva a SCE ($p=0,048$). As taxas de SCE para expressão ausente e presente de EPO aos 10 anos de seguimento foram de 75% e 83%, respectivamente. A expressão de EPO-R não apresentou impacto nas taxas de SCE em análise univariada ($p=0,765$) (**Tabela 25**).

Tabela 25 - Probabilidade acumulada de SCE de portadores de CCR aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo com a expressão qualitativa de EPO e EPO-R.

Variável	Categoria	SCE 5 anos n (%)	p (log rank)	SCE 10 anos n (%)	p (log rank)
EPO	Ausente	36 (75)	0,034	36 (75)	0,048
	Presente	144 (84,2)		142 (83)	
EPO-R	Ausente	71 (79,8)	0,589	71 (79,8)	0,765
	Presente	102 (82,9)		100 (81,3)	

A curva de SCE para EPO de acordo com a expressão imunohistoquímica qualitativa está representada na **Figura 15**.

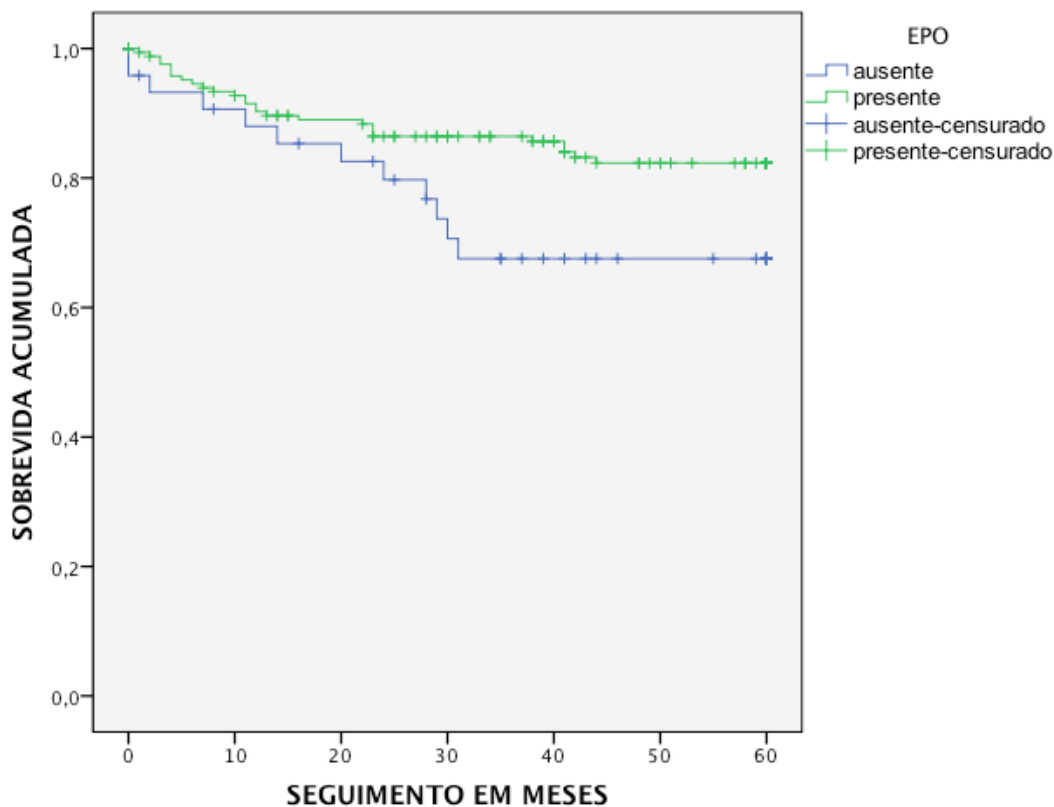


Figura 15 - Curva de sobrevida câncer específica em 120 meses para os pacientes portadores de CCR de acordo com estratificação qualitativa da expressão de EPO ($p=0,048$)

Análise multivariada

Na análise multivariada com as variáveis selecionadas, a presença de metástase ao diagnóstico ($p<0,001$), o estadiamento clínico ($p=0,050$), a presença e necrose tumoral ($p=0,010$) e a expressão qualitativa de EPO ($p=0,001$) foram considerados fatores de risco independentes de óbito específico. Pacientes que não expressavam EPO tinham um risco quase 5,5

vezes maior de morrer pela doença se comparado aos que expressavam EPO (HR 5,410; IC 95% 2,073-14,118) (**Tabela 26**).

Tabela 26 - Análise multivariada do risco de óbito específico por variáveis selecionadas em portadores de CCR.

Variável	Categoria	RR	IC 95%	p
Metástase	Não	1	Referência	<0,001
	Sim	12,114	4,374-33,552	
Necrose	Não	1	Referência	0,010
	Sim	3,115	1,311-7,400	
Estadiamento clínico agrupado	I e II	1	Referência	0,050
	III e IV	3,865	1,010-14,977	
Expressão de EPO qualitativa	Presente	1	Referência	0,001
	Ausente	5,410	2,073-14,118	

4.3.5 Sobrevida livre de doença (SLD)

A análise de sobrevida livre de doença foi realizada apenas com os casos de tumores não metastáticos (n=193). Ao todo, foram excluídos 27 pacientes com doença metastática ao diagnóstico. Ao final do seguimento, 40 pacientes recidivaram e a SLD em 10 anos foi de 79,3% (**Figura 16**).

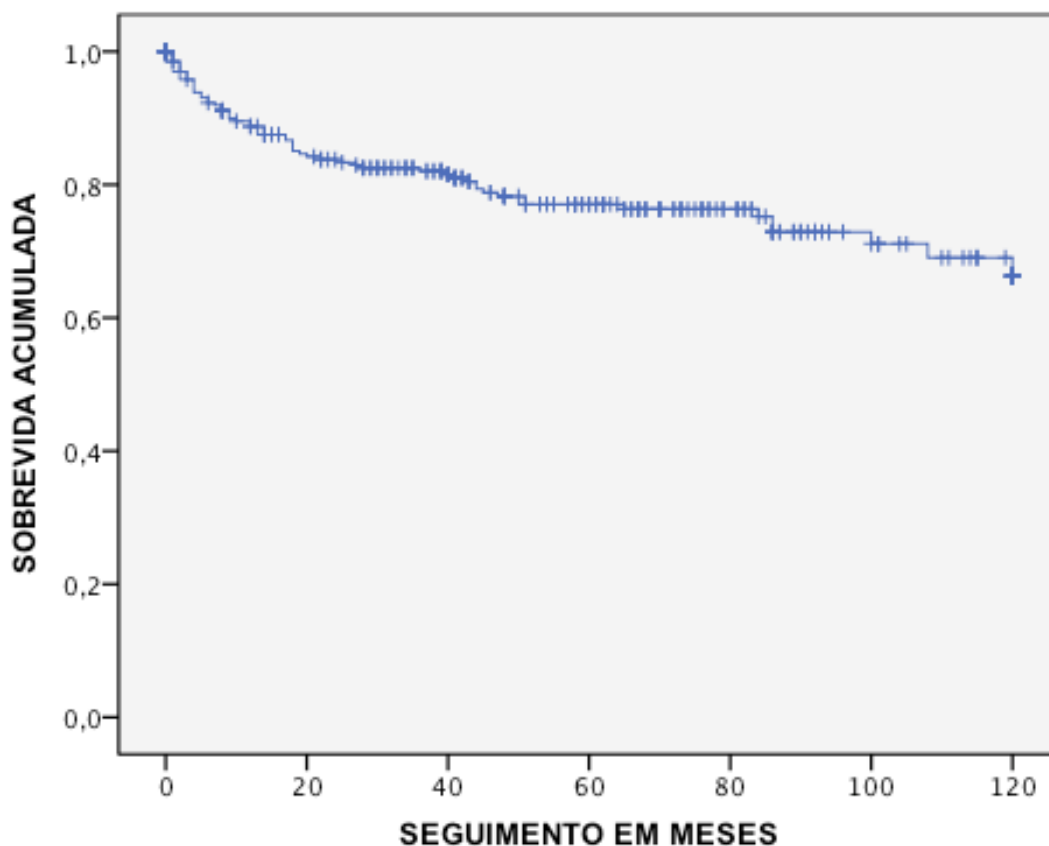


Figura 16 - Curva de sobrevida livre de doença em 120 meses (n=193).

Em análise univariada, as variáveis clínicas e demográficas que influenciaram a SLD foram a presença de sintomas ao diagnóstico ($p < 0,001$), a hemoglobina no pré-operatório ($p = 0,004$), a transfusão sanguínea ($p = 0,001$) e o estadió clínico ($p < 0,001$) (**Tabela 27**).

Tabela 27 - Probabilidade acumulada de SLD de portadores de CCR aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo com variáveis clínicas e demográficas.

Variável	Categoria	SLD 5 anos n (%)	p	SLD 10 anos n (%)	p
Idade (anos)	14 a 38	12 (70,6)	0,718	12 (70,6)	0,667
	39 a 62	89 (82,4)		87 (80,6)	
	63 a 86	56 (83,6)		53 (79,1)	
Sexo	Masculino	97 (85,1)	0,182	94 (82,5)	0,219
	Feminino	61 (77,2)		59 (74,7)	
Raça	Branços	142 (81,1)	0,381	137 (78,3)	0,269
	Não brancos	16 (88,9)		16 (88,9)	
Sintomas ao diagnóstico	Sim	63 (75,9)	0,007	59 (71,1)	0,003
	Não	91 (89,2)		90 (88,2)	
Tabagismo	Sim	52 (83)	0,503	85 (80,2)	0,772
	Não	65 (80)		51 (78,5)	
KPS	<80	5 (71,4)	0,377	5 (71,4)	0,417
	≥80	106 (80,9)		102 (77,9)	
ECOG <i>Performance Status</i>	0	81 (81,8)	0,268	78 (78,8)	0,207
	1+2	31 (77,5)		30 (75)	
ASA agrupado	1 ou 2	127 (82,5)	0,351	122 (79,2)	0,545
	3 ou 4	31 (79,5)		31 (79,5)	
Hemoglobina (pré-operatório)	<12	32 (68,1)	0,001	31 (66)	0,004
	≥12	126 (86,3)		122 (83,6)	
Transfusão sanguínea	Sim	19 (57,6)	<0,001	17 (51,5)	<0,001
	Não	131 (87,9)		128 (85,9)	
Agrupamento por estádios	I	82 (90,1)	0,002	82 (90,1)	<0,001
	II	32 (78)		31 (75,)	
	III	31 (67,4)		27 (58,7)	
	IV	8 (80)		8 (80)	

Dentre as variáveis anatomopatológicas que influenciaram a SLD ao final do seguimento, destacam-se a invasão da gordura e/ou seio renal ($p < 0,001$), a invasão venosa microscópica ($p < 0,001$), a invasão linfática microscópica ($p = 0,016$), a presença de acometimento linfonodal ($p < 0,001$), o diâmetro tumoral categorizado ($p < 0,001$), o estadiamento patológico (pT) ($p < 0,001$) e o estadiamento patológico (pN) ($p < 0,004$) (**Tabela 28**).

Não houve diferença estatisticamente significativa das taxas de SLD aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo com o grau de expressão de EPO e EPO-R. Ao final do estudo, 48 (75%) pacientes com baixa expressão de EPO e 103 (81,1%) pacientes com alta expressão estavam vivos ($p = 0,228$). As taxas de SLD para baixo e alto grau de expressão de EPO-R foram de 77,4% e 79,7%, respectivamente ($p = 0,849$) (**Tabela 29**).

Tabela 28 - Probabilidade acumulada de SLD de portadores de CCR aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo com variáveis anatomopatológicas.

Variável	Categoria	SLD 5 anos n (%)	p	SLD 10 anos n (%)	p
Tipo histológico	Células claras	125 (81,2)	0,554	121 (78,6)	0,514
	Não Células claras	33 (84,5)		32 (82,1)	
Grau de Fuhrman	1 ou 2	33 (82,5)	0,564	32 (80)	0,689
	3 ou 4	97 (79,5)		94 (77)	
Necrose tumoral	Sim	58 (80,6)	0,573	98 (82,4)	0,117
	Não	98 (82,4)		53 (73,6)	
Invasão da gordura e/ou seio renal	Sim	29 (67,4)	<0,001	26 (60,5)	<0,001
	Não	128 (85,9)		126 (84,6)	
Invasão da pelve e/ou ureter	Sim	8 (80)	0,675	8 (80)	0,789
	Não	149 (81,9)		144 (79,1)	
Invasão de adrenal	Sim	6 (75)	0,568	6 (75)	0,696
	Não	151 (82,1)		146 (79,3)	
Invasão venosa microscópica (IVM)	Sim	13 (56,5)	0,001	10 (43,5)	<0,001
	Não	98 (85,2)		97 (84,3)	
Invasão linfática microscópica (ILM)	Sim	3 (42,9)	0,006	3 (42,9)	0,016
	Não	108 (82,4)		104 (79,4)	
Acometimento linfonodal*	Sim	4 (50)	0,003	3 (37,5)	0,001
	Não	149 (82,8)		145 (80,6)	
Diâmetro tumoral	< 4 cm	56 (94,9)	<0,001	56 (94,9)	<0,001
	> 4,1 a 7 cm	60 (88,2)		59 (86,8)	
	> 7,1 cm	38 (61,3)		34 (54,8)	
Estadiamento Patológico (pT)	pT1	82 (90,1)	0,001	82 (90,1)	<0,001
	pT2	34 (79,1)		32 (74,4)	
	pT3	29 (65,9)		26 (59,1)	
	pT4	8 (80)		8 (80)	
Estadiamento patológico (pN)	Nx	43 (82,7)	0,011	42 (80,8)	0,004
	N0	106 (82,8)		103 (80,5)	
	N1	4 (50)		3 (37,5)	

* Pacientes submetidos à nefrectomia parcial considerados como N0

Tabela 29 - Probabilidade acumulada de SLD de portadores de CCR aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo o grau de expressão de EPO e EPO-R.

Variável	Categoria	SCE 5 anos n (%)	p (log rank)	SCE 10 anos n (%)	p (log rank)
EPO	Baixa expressão	50 (78,1)	0,203	48 (75)	0,228
	Alta expressão	106 (83,5)		103 (81,1)	
EPO-R	Baixa expressão	94 (81,7)	0,692	89 (77,4)	0,849
	Alta expressão	55 (79,7)		55 (79,7)	

As **Figuras 17 e 18** representam as respectivas curvas de SLD de acordo com o grau de expressão de EPO e EPO-R.

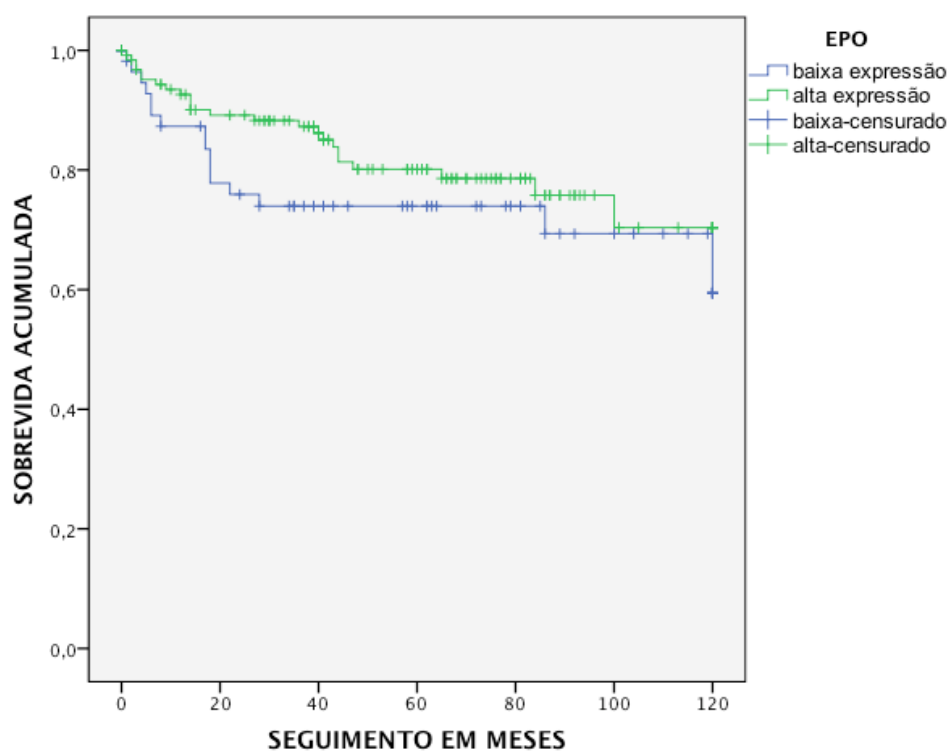


Figura 17 - Curva de sobrevida livre de doença em 120 meses para os pacientes portadores de CCR estratificados em baixo e alto grau de expressão de EPO ($p=0,228$).

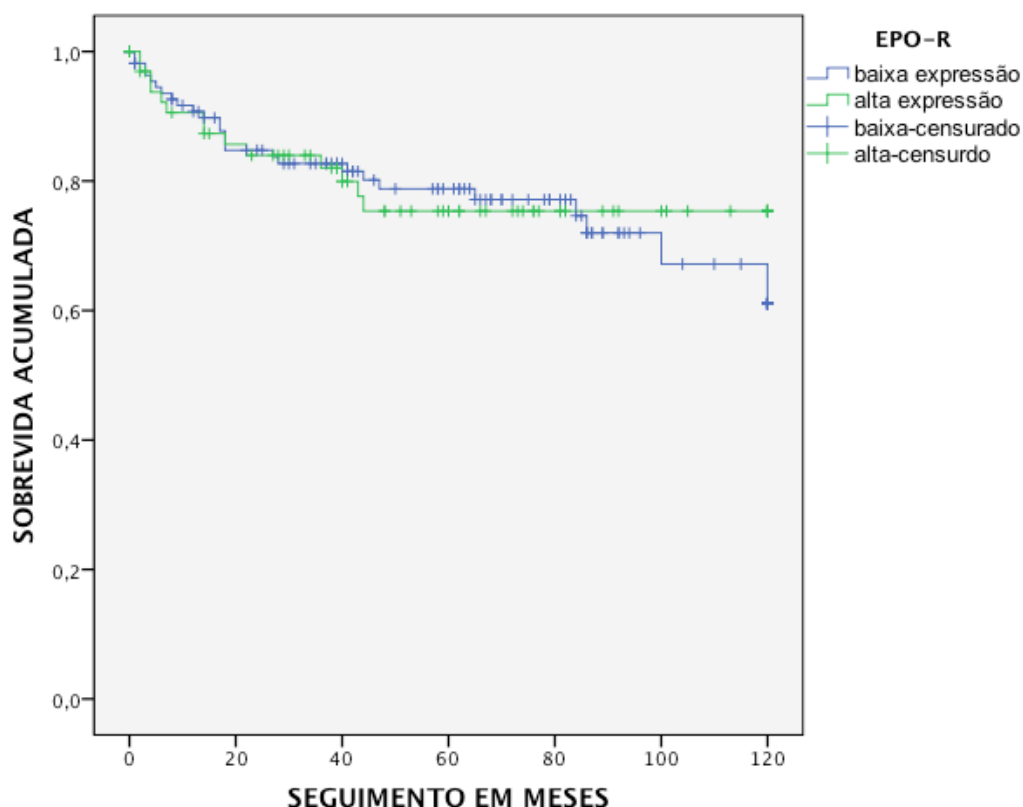


Figura 18 - Curva de sobrevida livre de doença em 120 meses para os pacientes portadores de CCR estratificados em baixo e alto grau de expressão de EPO-R ($p=0,849$).

Análise multivariada

Após análise multivariada pela *regressão logística de Cox (backward)*, as variáveis consideradas como fatores de risco independentes para recidiva da doença foram invasão da gordura e/ou seio renal ($p<0,001$) e o diâmetro tumoral categorizado ($p=0,001$), com maior risco para tumores $> 7,1$ cm (RR 8,863; IC 95% 2,457 – 31,969) (**Tabela 30**).

Tabela 30 - Análise multivariada do risco de recidiva por variáveis selecionadas em portadores de CCR não metastático

Variável	Categoria	RR	IC 95%	p
Invasão da gordura e/ou seio renal	Não	1	Referência	<0001
	Sim	3,722	1,795-7,719	
Diâmetro tumoral categorizado	< 4 cm	1	Referência	0,001
	> 4,1 a 7 cm	1,775	0,439 - 7,184	
	> 7,1 cm	8,863	2,457 - 31,968	

4.3.6 Análise de SLD com estratificação qualitativa de EPO e EPO-R

Os pacientes com doença metastática também foram excluídos nessa nova análise com estratificação qualitativa. A presença de expressão de EPO não apresentou impacto nas taxas de SLD aos 5 e 10 anos de seguimento ($p=0,291$). As taxas SLD para pacientes que expressaram e não expressaram EPO-R foram de 83,5,% e 71,6%, respectivamente ($p=0,052$).

(Tabela 31).

Tabela 31 - Probabilidade acumulada de SLD de portadores de CCR aos 5 e 10 anos de seguimento de acordo com a expressão qualitativa de EPO e EPO-R.

Variável	Categoria	SLD 5 anos n (%)	p (log rank)	SLD 10 anos n (%)	p (log rank)
EPO	Ausente	31 (77,5)	0,147	31 (77,5)	0,291
	Presente	125 (82,8)		120 (79,5)	
EPO-R	Ausente	62 (76,5)	0,137	58 (71,6)	0,052
	Presente	87 (84,5)		86 (83,5)	

As curvas de SLD para EPO e EPO-R de acordo com a expressão imuno-histoquímica qualitativa estão representadas na **Figuras 19 e 20**.

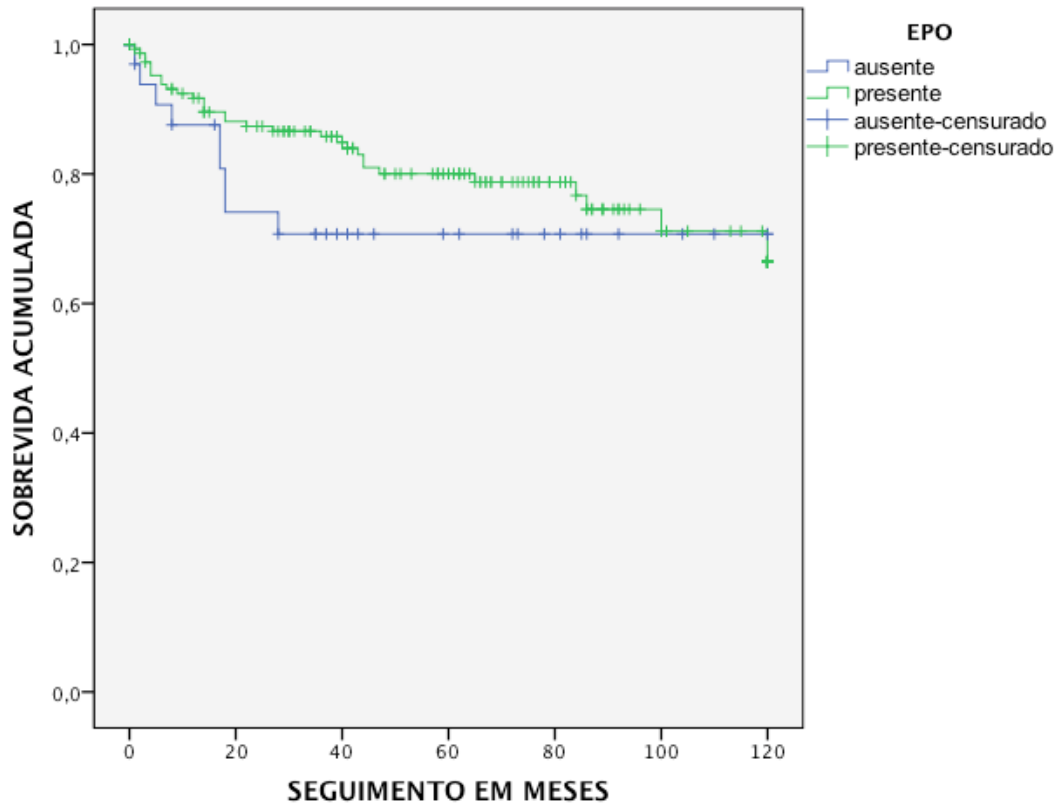


Figura 19 - Curva de sobrevida livre de doença em 120 meses para os pacientes portadores de CCR de acordo com a expressão de EPO ($p=0,291$).

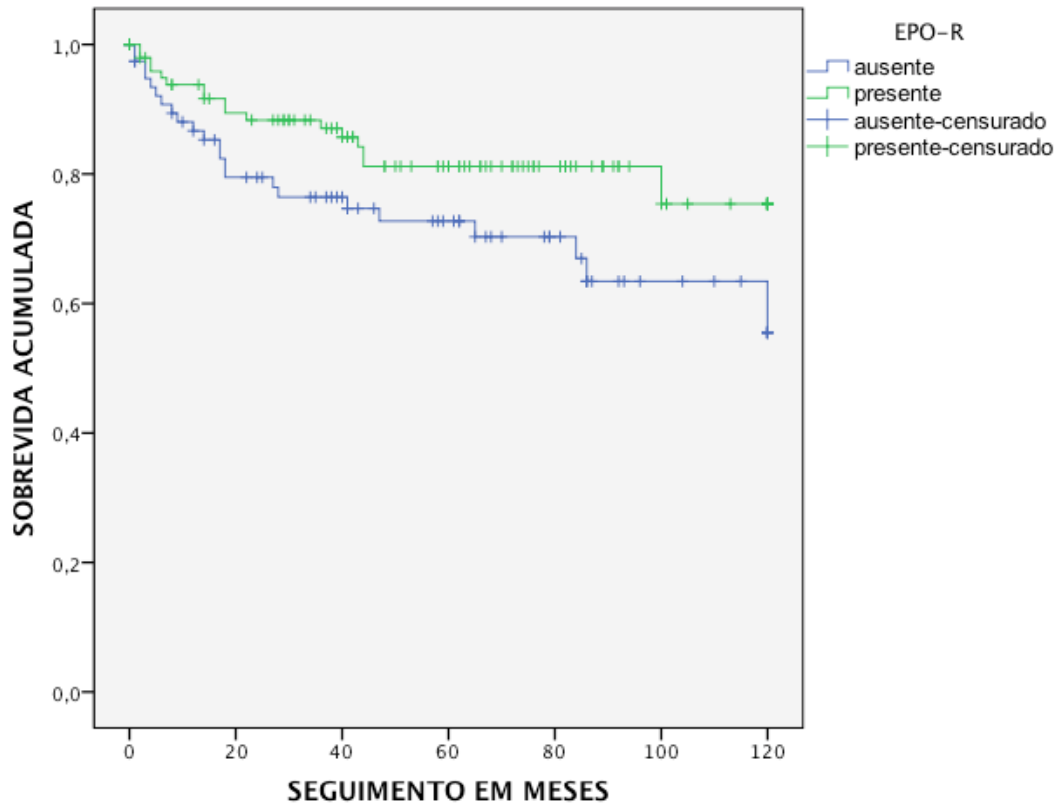


Figura 20 - Curva de sobrevida livre de doença em 120 meses para os pacientes portadores de CCR de acordo com estratificação qualitativa da expressão de EPO-R ($p=0,052$).

Análise multivariada

Após análise multivariada, a invasão da gordura e/ou seio renal ($p<0,001$) e o diâmetro tumoral categorizado ($p=0,001$), permaneceram como fatores de risco independentes para recidiva da doença (**Tabela 32**).

Tabela 32 - Análise multivariada do risco de recidiva por variáveis selecionadas em portadores de CCR não metastático.

Variável	Categoria	RR	IC 95%	p
Invasão da gordura e/ou seio renal	Não	1	Referência	0,001
	Sim	3,460	1,663-7,200	
Diâmetro tumoral categorizado	< 4 cm	1	Referência	<0,001
	> 4,1 a 7 cm	1,740	0,435 – 6,966	
	> 7,1 cm	7,422	2,184-25,360	

5 DISCUSSÃO

5.1 ASPECTOS GERAIS

A incidência e mortalidade de CCR nas últimas décadas tem aumentado progressivamente e mesmo com as melhorias dos métodos de diagnóstico e tratamento, a abordagem desses tumores se torna um desafio, principalmente devido à apresentação heterogênea e evolução imprevisível (WALLEN et al. 2007; GARCIA et al. 2009).

Em tese, o prognóstico do CCR é baseado notadamente em variáveis clínicas e patológicas, no entanto, tumores com as mesmas características podem apresentar evoluções distintas (UNO et al. 2004). Nos últimos anos, muitos estudos estão avaliando o papel de marcadores biomoleculares no planejamento terapêutico e prognóstico de portadores de CCR (NOGUEIRA e KIM 2008; VICKERS e HENG 2010).

Em nossa casuística final, mais da metade dos pacientes (56,4%) tinham entre 39 e 62 anos ao diagnóstico e 8,2% se apresentaram com menos de 38 anos. O diagnóstico incidental ocorreu em 116 pacientes (50,5%) e quando apresentavam sintomas, dor lombar e hematúria foram os mais comuns. Em nossa série, a tríade clássica (hematúria, dor lombar e massa palpável) esteve presente em apenas 0,9% pacientes e cerca de 12% tinham metástase ao diagnóstico.

A incidência de portadores de CCR com menos de 40 anos descrito na literatura variou de 3,4% a 6% (ABOU EL FETTHOUH et al. 2002; VERHOEST et al. 2007). Estudo epidemiológico recente com mais de 500 pacientes demonstrou que a tríade clássica estava presente em 4,5% dos indivíduos e doença metastática ao diagnóstico foi encontrada em 9,5% dos casos (NARDI et al. 2010).

Nosso estudo demonstrou, em análise univariada, que os principais fatores clínicos clássicos já relatados em estudos anteriores como metástase ao diagnóstico (FLANIGAN et al. 2004), ECOG (PATARD et al. 2004a; MOTZER et al. 2008), ASA (DE CÁSSIO ZEQUI et al. 2010), sintomas ao diagnóstico (DALL'OGGIO et al. 2007) e KPS (KARNOFSKY e BURCHENAL 1950) se confirmaram como fatores prognósticos de SG e SCE. Outros fatores que influenciaram as taxas de SG e SCE foram o valor da hemoglobina no pré-operatório (MANOLA et al. 2011) e a necessidade de transfusão sanguínea. Dos 48 pacientes transfundidos, 75% tinham tumores > 7,1 cm de maior diâmetro e 90,5% eram tumores de alto grau, podendo explicar a necessidade de transfusão devido a maior complexidade da cirurgia.

A idade categorizada apresentou impacto somente na avaliação de SG. Em nossa série, os pacientes com idade entre 63 a 86 apresentaram as piores taxas de SG e ao final do seguimento 61,5% desses pacientes estavam vivos. KUTIKOV et al. (2010) demonstraram que a idade avançada de portadores de CCR localizado constitui um fator preditivo importante de morte por outras causas. Dos pacientes com idade entre 63 e 86 anos de

nosso estudo, 64,4% foram classificados como ECOG 1+2 e 43% eram ASA 3-4. Assim, a menor SG de pacientes mais idosos quando comparado aos mais jovens pode ser resultado da presença de mais comorbidades associadas e maior impacto no seu *performance status* causado pela neoplasia.

Em estudo recente de nosso grupo foram avaliados, retrospectivamente, 318 pacientes portadores de CCR submetidos à tratamento cirúrgico e estratificados segundo a classificação de ASA.. Pacientes ASA 3 apresentavam tumores mais agressivos, maior risco de complicações perioperatórias e piores taxas de SG em análise univariada e multivariada (FERREIRA et al. 2013).

As principais variáveis patológicas que influenciaram a SG e SCE em análise univariada foram subtipo histológico, presença de necrose tumoral, invasão da gordura e/ou seio renal, invasão da pelve e/ou ureter, invasão vascular microscópica, invasão linfática microscópica, estadiamento patológico (pN), estadiamento patológico (pT), diâmetro tumoral categorizado, presença de acometimento linfonodal e estadiamento clínico.

Na análise univariada de SLD, foram excluídos 27 pacientes com metástases ao diagnóstico, vistos que estes jamais estariam livre de doença após a nefrectomia. Nossos resultados reproduziram a maioria dos achados da literatura. Os fatores clínicos e demográficos que influenciaram significativamente a SLD foram representados pela presença de sintomas ao diagnóstico (BROOKMAN-AMISSAH et al. 2009), menores valores de hemoglobina pré-operatória (DU et al. 2012) e a necessidade de transfusão

sanguínea. Dentre as variáveis anatomopatológicas com valor prognóstico na SLD podemos destacar a invasão da gordura e/ou seio renal, a invasão venosa microscópica, a invasão linfática microscópica, a presença de acometimento linfonodal, o diâmetro tumoral categorizado, o estadiamento patológico T e o estadiamento patológico N (PANTUCK et al. 2003).

Em nosso estudo, cerca de 80% dos tumores eram carcinoma de células claras, 9,5% foram classificados como papilíferos tipo 1 ou 2, 6,8% cromófbos e outras variantes sabidamente de pior prognóstico representavam 8 casos (3,6%) do total. Dessa forma, para análise de SG e SCE foi optado por agrupar os tumores papilíferos 1 e 2 e os tumores raros e de pior prognóstico (inclassificáveis, carcinoma de ductos coletores e sarcomatóide) em categorias distintas. No entanto, quando analisado as curvas de SG e SCE por estratos foi observado que apenas a categoria caracterizada por tumores de pior prognóstico (inclassificáveis, carcinoma de ductos coletores e sarcomatóide) influenciava as taxas de sobrevida quando comparada às outras categorias histológicas. A análise do impacto do subtipo histológico na literatura claramente é fator de confusão, principalmente devido à grande heterogeneidade dos tumores renais, com características genéticas distintas e variadas (KÜMMERLIN et al. 2008). FICARRA et al. (2007) demonstraram melhor prognóstico dos subtipos papilíferos e cromófbos se comparado aos tumores de células claras, resultados esses não reproduzidos em nossa série ($p=0,614$).

A necrose tumoral influenciou negativamente a SG e SCE em análise univariada, resultado não observado na SLD. É importante lembrar que a

exclusão dos casos inicialmente metastáticos da análise de SLD pode ter influenciado os nossos achados, fato já relatado previamente por FRANK et al. (2002).

Outro fator prognóstico de grande importância no CCR é a presença de invasão venosa microscópica (IVM), presente em 20,8% da nossa casuística e com impacto tanto na SG como na SCE ($P < 0,001$). GONÇALVES et al. (2004) descreveram a presença de IVM em 25% dos pacientes avaliados e esse achado estava associado com a presença de fatores de pior prognóstico conferindo impacto negativo na SCE e aumento do risco de recorrência. Em 2007, MADBOULY et al. estudaram pacientes com CCR localizado (T1-T2N0M0) evidenciando IVM em 16,7% dos casos. Destes pacientes, cerca da metade desenvolveram metástases à distância caracterizando a IVM como fator prognóstico independente para tumores de rim localizados. De modo semelhante, KIM et al. (2010) avaliaram o impacto dos fatores prognósticos clássicos de 93 pacientes portadores de CCR localizado (pT1aN0M0) submetidos à tratamento cirúrgico. Nesse estudo, somente a IVM e necrose tumoral permaneceram como fatores preditivos independentes de SCE. Nossos resultados reproduziram os achados presentes na maioria dos estudos da literatura em análise univariada, conferindo à IVM poder prognóstico de extrema relevância. Em nosso grupo, em dissertação de mestrado avaliando 55 pacientes portadores de CCR, a presença de IVM se associava com importante redução de SCE (46,2%) em comparação aos casos sem IVM (82,9%, $p = 0,009$) (ZEQUI 2000).

No estadiamento do CCR (TNM 2010), a invasão da gordura perirrenal ou do seio renal são classificados como pT3a. No entanto, diferenças prognósticas de acometimento dessas localizações têm sido relatadas. POON et al. (2009) demonstraram em análise univariada que a invasão da gordura do seio renal estava associado à piores taxas de SCE quando comparado à invasão da gordura perirrenal, 62,5% versus 75% ($p=0,022$). No entanto, esses achados não se confirmaram no modelo multivariado.

Em estudo recente, JEON et al. (2009) avaliaram retrospectivamente o impacto da invasão da gordura perirrenal na SCE e SLD de 946 pacientes portadores de CCR (pT1-pT3bN0M0) submetidos à tratamento definitivo. Os pacientes com invasão da gordura perirrenal foram estratificados em dois grupos de acordo com o tamanho da lesão. Os achados demonstraram que a invasão da gordura perirrenal foi considerado fator independente de SCE e SLD apenas para pacientes com lesões acima de 7,0 cm. Estudo prospectivo envolvendo 106 pacientes realizado por BEDKE et al. (2009), demonstrou que a combinação de invasão da gordura perirrenal etambém do seio renal se revelou fator prognóstico independente com taxa de SCE aos 5 anos de 31% (HR 2,75, $p=0,007$). Em nosso estudo, as taxas de SG e SCE na presença de invasão da gordura perirrenal e/ou do seio renal foram de 57,9% e 64,9%, respectivamente. Em contrapartida, a presença de se achado não permaneceu como fator prognóstico independente nas análises multivariadas.

Ainda em nosso estudo, foi observado impacto negativo da presença de invasão linfática microscópica (ILM) com taxas de SG e SCE aos 10 anos de seguimento de 41,2% em ambos os casos ($p < 0,001$). Após análise multivariada, a ILM permaneceu como fator prognóstico independente somente na SG (HR 3,114; IC 95% 1,325-7,317; $p = 0,009$). O papel da ILM como fator prognóstico de CCR ainda é incerto. KATZ et al. (2011) avaliaram o papel da ILM em 841 pacientes portadores de CCR e embora esse fator tenha influenciado negativamente as taxas de sobrevida em análise univariada, esses resultados não se mantiveram após análise multivariada. No entanto, em análise posterior promovida por BELSANTE et al. (2014), a presença de ILM foi considerada fator preditor independente de SCE e SLD para pacientes portadores de CCR localizado tipo células claras.

Quanto ao estadiamento patológico (pT) em nossa série, a incidência de tumores pT1a, pT1b, pT2a, pT2b, pT3a, pT3b e T4 foram respectivamente de 17,5%, 24,9%, 14,7%, 8,3%, 25,3%, 1,8% e 7,4%. A baixa frequência de tumores pT3b e pT3c se justifica baixa incidência desse tipo de apresentação e predomínio dos tumores localizados. A SCE aos 10 anos de seguimento dos pacientes agrupados como pT1-pT2 e pT3-pT4 foi de 87,5% e 64%, respectivamente ($p < 0,001$). Analisando as curvas de sobrevida por estrato foi observado que não houve diferença significativa de sobrevida câncer específica daqueles classificados como pT2b e pT3a ($p = 0,0994$). Esses dados refletem que os tumores maiores do que 10 cm (pT2b) se comportam, do ponto de vista prognóstico, como os tumores pT3a revelando um provável subestadiamento. BONSIB et al. (2005) descreveram

que a presença de invasão do seio renal (pT3a) de tumores de 4,1 a 7 cm era de 68% podendo chegar até 97% em tumores maiores que 7 cm. Esses achados revelam a importância do tamanho tumoral no risco de invasão e justifica os nossos achados.

Em nossa caústica, 65,4% dos pacientes eram pN0, 82,3% pNx e apenas 18 pacientes (8,3%) pN1. A incidência de pN1 na literatura pode variar de 2% a 9%, o que corrobora os nossos achados (VOLPE e PATARD 2010). Em estudo epidemiológico brasileiro recente o acometimento linfonodal, presença de metástases, necrose tumoral e subtipo histológico foram fatores de risco independentes para recorrência (NARDI et al. 2010).

5.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA DE EPO E EPO-R

Como descrito anteriormente, a hipoxemia tecidual é uma condição presente no microambiente de grande parte dos tumores e no CCR atua como condição reguladora de determinados genes principalmente por meio da via VHL / HIF / EPO (MORAIS et al. 2013). O acúmulo de HIF-1 α intracitoplasmático mediado pela hipóxia ativa inúmeros genes, principalmente relacionados à angiogênese e proliferação celular, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento transformador alfa (TGF- α) e a eritropoetina (EPO) (OHH 2006). Além da hipóxia, outro mecanismo que leva à estabilização do HIF-1 α no citoplasma e ativação de toda a cascata com maior produção desses fatores angiogênicos ocorre por

deleções e metilações do gene VHL. Essas alterações do gene VHL ocorrem quase que exclusivamente em CCR do tipo células claras (KIM e KAELIN 2004).

A EPO é uma glicoproteína da família das citocinas de classe I produzida pelas células endoteliais peritubulares do córtex renal em adultos e cuja principal função, é o controle da eritropoiese na medula óssea (WEN et al. 1994). O efeito sinalizador da EPO ocorre pela interação com o seu receptor de membrana, o EPO-R, uma proteína glicosilada de cadeia simples também membro das citocinas de classe I (LAPPIN 2003).

Além dos tecidos hematopoiéticos, aEPO e o seu receptor (EPO-R) foram localizados em inúmeros outros tecidos e tumores sólidos inclusive em CCR (WESTENFELDER e BARANOWSKI 2000). Esses achados despertaram grande interesse pelo estudo dos efeitos da EPO nesses tecidos, principalmente devido ao uso de eritropoetina recombinante humana (rhEPO) no tratamento da anemia presente em muitas neoplasias. A sinalização promovida pelo complexo EPO/EPO-R pode estar relacionada ao aumento da proliferação celular, angiogênese e invasão tecidual (HARDEE et al. 2006).

Os possíveis efeitos adversos da administração exógena de EPO no crescimento e proliferação celular do CCR foram pouco explorados e se resumem à poucos estudos na literatura. No estudo de MORERE et al. (1997), foram avaliados 20 pacientes portadores de CCR metastático comprovados histologicamente submetidos à esquemas de tratamento com

rhEPO, um total de seis pacientes apresentaram progressão da doença em resposta ao tratamento.

HENKE et al. (2006), avaliaram 157 pacientes portadores de tumores avançados de cabeça e pescoço (T3, T4 ou invasão linfonodal) em tratamento radioterápico e anêmicos. Esses pacientes foram randomizados em dois grupos para tratamento com rhEPO e placebo e os tecidos foram analisados por imuno-histoquímica quanto a expressão de EPO-R. Desse modo, foi observado que a sobrevida livre de progressão foi significativamente pior nos pacientes tratados com EPO que expressavam receptores de eritropoetina (EPO-R) quando comparado ao placebo (HR, 2,07; IC 95%, 1,27-3,36; $p < 0,01$). Do contrário, a administração de EPO não impactou a sobrevida dos pacientes que não expressavam EPO-R (HR, 0,94; IC 95%, 0,47-1,90; $p = 0,86$).

LI et al. (2007) estudaram, em experimento "in vitro", a influência da rhEPO na capacidade de indução de apoptose pela cisplatina em duas linhagens de células de CCR. As células foram tratadas com 50 μ M de cisplatina com e sem administração de rhEPO na dose de 200 UI/ml. Como objetivo, foram comparados os grupos e as taxas de apoptose, mitoses, a expressão de EPO-R e de proteína quinase C (PKC). Dessa forma, os resultados revelaram que a administração de rhEPO pode reduzir a apoptose induzida por cisplatina no CCR promovendo a progressão tumoral por meio da via PKC dependente.

MIYAKE et al. (2013), avaliaram a resposta *in vitro* e *in vivo* as modificações de diferentes linhagens celulares de CCR humano (RPTEC,

Caki-1, 786-O e 769-P) após administração de EPO em condições de hipóxia e normóxia. Nesse estudo, foi observado que a proliferação celular após administração de EPO nas linhagens celulares estudadas foi significativamente aumentada em ambiente com baixas concentrações de oxigênio.

A expressão de EPO e EPO-R foi descrita em diversos estudos em CCR, embora com resultados conflitantes, não homogêneos e com casuísticas variáveis (MORAIS et al. 2013). Além disso, a avaliação da expressão imuno-histoquímica e a correlação da EPO e EPO-R nos tecidos neoplásicos e normais, a avaliação das associações com as principais variáveis clínicas e patológicas e principalmente o impacto desses achados na sobrevida foram pouco explorados na literatura.

Em 1998, CLARK et al. demonstraram, em estudo inédito, a viabilidade da análise imuno-histoquímica da expressão de EPO em CCR em tecidos fixados em formalina a 10% e processados em parafina. Ao todo, 19 produtos de nefrectomia por CCR foram avaliados e 17 áreas normais adjacentes ao tumor. Como controle positivo das reações, foi utilizado fígado fetal obtido de necrópsia. Nessa série histórica, o padrão de reação foi granular e citoplasmático, não sendo observada expressão glomerular. A reação e expressão em células musculares foi reconhecida frequentemente. A expressão imuno-histoquímica de EPO foi identificada em 74% das amostras de CCR.

LEE et al. (2005) investigaram a expressão imuno-histoquímica (IHQ) de EPO e EPO-R em neoplasias associadas à mutação do VHL. Nesse

estudo, foram avaliados 11 casos de CCR e tecidos adjacentes e 16 cistos renais. As reações e presença dos marcadores nos tecidos foram confirmadas com análise de Western Blot. Os autores descreveram a coexpressão citoplasmática de EPO e EPO-R em todos os tumores renais avaliados (11 casos) e em 62,5% dos cistos renais. Em 2006, BUTNOR et al. avaliaram expressão imuno-histoquímica de EPO em 20 metástases pulmonares de CCR e todos os casos foram positivos para EPO.

Nosso estudo avaliou a expressão imuno-histoquímica da EPO e EPO-R no CCR e no tecido benigno adjacente (tecido não neoplásico). Os resultados demonstram maior grau de expressão de EPO ($p < 0,001$) e EPO-R ($p = 0,002$) no tecido benigno quando comparado ao CCR, considerando todos os tipos histológicos. De forma semelhante, quando considerados apenas os tumores de células claras, a média do grau de expressão de EPO ($p < 0,001$) e EPO-R ($p = 0,003$) nos tecidos benignos foi significativamente maior em comparação ao CCR.

Recentemente, MIYAKE et al. (2013) abordaram o tema avaliando a expressão imuno-histoquímica de EPO e EPO-R em uma variedade de tumores malignos e tecidos benignos por meio de TMA. Assim, nesse estudo, a expressão imuno-histoquímica de EPO foi significativamente maior no linfoma ($p = 0,018$) e no câncer de pulmão ($p = 0,003$) quando comparado aos tecidos benignos correspondentes. Da mesma forma, a expressão de EPO-R foi comparativamente maior no carcinoma de tireóide ($p = 0,032$), linfoma ($p = 0,007$), câncer de pulmão ($p = 0,011$), câncer de útero ($p = 0,038$) e próstata ($p = 0,011$). Interessante observar que do contrário ao encontrado

em nosso presente estudo, não houve diferença estatisticamente significativa da expressão de EPO ($p=0,91$) e EPO-R ($p=0,017$) no CCR e no tecido renal benigno, embora a expressão desses marcadores também tenha sido maior nos tecidos renais benignos.

Vale ressaltar que na série de MIYAKE et al. (2013), os tecidos renais ditos benignos não eram adjacentes ao tumor primário como em nosso estudo (1,0 cm de distância). Assim, a influência do microambiente tumoral e das citocinas no tecido benigno adjacente poderia ativar de forma mais exacerbada os mecanismos adaptativos à hipóxia e a expressão de EPO/EPO-R no tecido com fenótipo normal (benigno) quando comparado ao CCR. Como descrito por ECKARDT (1996), as células endoteliais peritubulares do córtex renal se tornam o principal sítio de produção de EPO nos adultos, o que poderia explicar o maior grau de expressão de EPO e EPO-R no rim normal. Além disso estudos anteriores de modelos de lesão isquêmica aguda, a EPO confere efeito protetor e inibe a apoptose celular (VESEY et al. 2004).

Em nosso estudo, foi observado associação significativa da expressão de EPO e EPO-R em CCR ($p<0,001$). Dos casos de CCR estratificados como baixa expressão de EPO, 80,3% também apresentavam baixa expressão de EPO-R. A alta expressão de EPO-R foi observada em 19,7% dos pacientes com baixa expressão de EPO e 46,8% dos pacientes com alta expressão de EPO. PAPWORTH et al. (2009), também observaram correlação positiva na expressão de EPO e EPO-R ($p=0,028$). A produção de EPO é estimulada pela hipoxemia tecidual e mediada pelo acúmulo do

HIF-1 α intracitoplasmático (HÖCKEL e VAUPEL 2001). Nossos resultados demonstram que a baixa expressão de EPO pode revelar um ambiente com concentrações adequadas de oxigênio e portanto, sem necessidade de ativação dos mecanismos contra a hipóxia mediados pela interação da EPO com o seu receptor de membrana, o EPO-R. No entanto, em condições de hipoxemia tecidual a via VHL / HIF / EPO é ativada, explicando a maior expressão de EPO-R (*upregulation*) de nossa série.

As associações dos principais fatores prognósticos do CCR e o grau de expressão de EPO também foram avaliadas em nosso estudo. Dos 220 pacientes portadores de CCR avaliados, 77 (35%) apresentaram baixa expressão de EPO e 143 (65%) pacientes apresentaram alta expressão. O grau de expressão de EPO foi proporcionalmente maior entre os pacientes mais jovens ($p=0,039$) e nos assintomáticos ao diagnóstico ($p=0,010$). Além disso, a alta expressão de EPO foi maior entre os não fumantes ($p=0,002$) e naqueles que não foram transfundidos na ocasião da nefrectomia ($p=0,016$).

Os pacientes classificados como baixa expressão em nosso estudo consideravam os pacientes com expressão ausente ou mínima expressão tanto para EPO como EPO-R. Expressão realmente ausente de EPO e EPO-R estavam presentes em 21,8% e 41,7% dos casos, respectivamente. Como citado anteriormente na padronização das reações e considerando a dificuldade e subjetividade de leitura e interpretação inerente ao método, foi optado pela realização de análise complementar qualitativa, estratificando os casos como expressão ausente ou presente de EPO. Nessa nova análise qualitativa, outras variáveis como KPS ≥ 80 e valor de hemoglobina no pré-

operatório ≥ 12 também estavam associadas à presença de expressão de EPO. Nossos achados revelam que a presença de expressão de EPO se associa de forma significativa com fatores paciente dependentes conhecidos e de bom prognóstico.

Quanto às variáveis anatomopatológicas, o grau de expressão de EPO estava associado ao tipo histológico ($p < 0,001$), o grau de Fuhrman ($p = 0,006$) e a presença de acometimento da adrenal ($p = 0,023$). Comparativamente, a alta expressão de EPO nos tumores de células claras foi menor que os outros tipos histológicos agrupados, 58% versus 93,2% ($p < 0,001$). Nos tumores papilíferos tipo 1 e tipo 2 e tumores cromófbos, usualmente de bom prognóstico, a alta expressão foi encontrada em 95,2% e 86,7%, respectivamente. Além disso, notamos que entre os tumores sabidamente de pior prognóstico (inclassificáveis, ductos coletores e sarcomatóides) a alta expressão de EPO ocorreu em 100% dos casos. Isto pode decorrer do fato destes tumores mais agressivos apresentarem um elevado *turnover* celular, com altos índices de necrose e isquemia tissular, o que sabemos estimula a produção da eritropoietina. Entretanto, esses achados devem ser analisados de forma criteriosa devido a baixa incidência desses tumores em nossa casuística, correspondendo a apenas 3,6% do total.

A alta expressão de EPO foi proporcionalmente maior nos pacientes Fuhrman 4 e correspondeu a 92,9% daqueles com acometimento da adrenal. Esses achados revelam que a alta expressão de EPO pode estar relacionada com critérios de pior prognóstico anatomopatológicos.

Na avaliação da EPO-R e das variáveis clinicopatológicas foi demonstrado associação com a idade categorizada ($p=0,052$) e grau de Fuhrman ($p=0,003$) de forma semelhante que a EPO. A alta expressão de EPO-R também foi proporcionalmente maior nos pacientes com acometimento da pelve e/ou ureter ($p=0,034$) e naqueles com invasão venosa microscópica ($p=0,026$), 64,3% e 60,6%, respectivamente. Do mesmo modo que a EPO, a alta expressão de EPO-R foi proporcionalmente menor nos tumores de células claras quando comparado aos outros tipos histológicos agrupados, 34,3% versus 52,3%. Na avaliação qualitativa das reações, a expressão de EPO-R não se associou com o grau de Fuhrman ($p=0,129$), bem como não se associou com a presença de invasão venosa microscópica (IVM) ($p=0,616$)

PAPWORTH (2011) avaliaram inúmeros fatores prognósticos moleculares em pacientes portadores de CCR, dentre eles, a expressão imuno-histoquímica da EPO, EPO-R e a concentração sérica de EPO. O padrão de expressão dos marcadores foi predominantemente citoplasmático e a forte expressão de EPO e EPO-R foi observada em 83% e 56% dos casos, respectivamente. A forte expressão de EPO foi significativamente mais frequente no CCR do tipo células claras (86%) quando comparado aos tumores papilíferos (64%). Do contrário, a forte expressão de EPO-R foi proporcionalmente maior nos tumores papilíferos (81%) do que no carcinoma de células claras (54%). Nesse estudo houve associação da expressão de EPO-R e estadiamento TNM apenas. Outras associações de EPO e EPO-R com idade, sexo, grau ou EPO sérico não foram observadas.

Em nossa série, contrariando ao achados de PAPWORTH (2011), a alta expressão de EPO foi proporcionalmente menor nos tumores de células claras comparados aos papilíferos. Resultados similares ao nosso foram descritos por CLARK et al. (1998), embora em uma casuística pequena. Nossos achados revelaram que alta expressão de EPO estava fortemente associada aos tumores inclassificáveis, de ductos coletores e sarcomatóides, sabidamente de pior prognóstico (AMIN et al. 2002).

ITO et al. (2012) estudaram o valor prognóstico da expressão imunohistoquímica de EPO-R e da concentração sérica de EPO em portadores de CCR. Nesse estudo, foram comparados os fatores clinicopatológicos de 41 pacientes com baixa expressão de EPO-R e 15 pacientes com alta expressão. Os pacientes com alta expressão de EPO-R estavam associados com pior estadiamento patológico (pT) ($p=0,022$), maior tamanho tumoral ($p=0,0012$), pior graduação de Fuhrman ($p=0,001$), maiores incidências de invasão microvascular ($p=0,002$) e doença metastática ($p=0,020$).

De forma semelhante, a alta expressão de EPO-R em nosso estudo estava associada a pior grau nuclear de Fuhrman, maior acometimento da pelve e/ou ureter e presença invasão venosa microscópica. Em estudo recente, FENG et al. (2013) avaliaram 249 pacientes com CCR tipo células claras e demonstraram que a expressão de EPO estava associada aos tumores de alto grau.

A dúvida em questão é se as elevadas taxas de expressões imunohistoquímicas de EPO e EPO-R realmente colaboram para a ocorrência de fatores de mau prognóstico e impactam negativamente as taxas de

sobrevida, ou contrariamente, apenas são resultantes da presença de tumores mais agressivos.

GONG et al. (2006) avaliaram 82 pacientes portadores de CCR tipo células claras submetidos a nefrectomia no período de 2000 a 2005. Nesse estudo, foram avaliadas a expressão imuno-histoquímica de EPO, sua correlação com as mutações do VHL por PCR e também as expressões de HIF-1 α e HIF-2 α nos tumores e nos tecidos normais correspondentes. A expressão de EPO foi positiva em 72 (87,8%) casos de CCR e apenas 7,3% dos tecidos renais normais correspondentes. A expressão de EPO estava associada à mutações do gene VHL. Dos pacientes portadores de mutações do gene VHL, 95,6% expressaram EPO versus 78,3% quando o gene VHL estava normal. A expressão de EPO se associou significativamente com o grau nuclear ($p < 0,005$).

A correlação desses marcadores e o impacto na sobrevida de portadores de CCR ainda é uma questão não muito bem elucidada. A grande maioria dos estudos não demonstrou influência do grau de expressão de EPO e EPO-R nas taxas de sobrevida.

Em nosso estudo, 77 (35%) apresentaram baixa expressão de EPO e 143 (65%) pacientes apresentaram alta expressão. Nas análises de sobrevida, o grau de expressão de EPO influenciou apenas a SG em análise univariada ($p = 0,010$). Os pacientes com baixa expressão de EPO tinham quase o dobro de chance de morrer quando comparado aos pacientes com alta expressão (HR 1,95; IC 95% 1,15-3,30; $p = 0,010$). Como vimos em nossa caústica, pacientes em melhores condições gerais (mais jovens, não

fumantes, com tumores assintomáticos e não transfundidos) tinham maiores níveis de expressão de EPO, o que pode ter indiretamente, concorrido para suas melhores taxas de SG. A SCE e a SLD não apresentaram impacto do grau de expressão de EPO.

Considerando a estratificação qualitativa da EPO, 49 (22,3%) não expressaram esse marcador e 171 (76,7%) apresentaram algum grau de expressão desse marcador. A análise univariada de sobrevida de acordo com a expressão qualitativa demonstrou impacto da presença de expressão de EPO tanto na SG ($p < 0,001$) como na SCE ($p = 0,048$). As taxas de SG e SCE ao final do seguimento dos pacientes que expressaram EPO foram de 79,5% e 83%, respectivamente. Em análise multivariada, a ausência de expressão de EPO se demonstrou fator preditivo independente para piores taxas de SG (HR 4,143; IC 95% 1,536-11,170; $p = 0,001$) e de SCE (HR 5,410; IC 95% 2,073-14,118; $p = 0,001$). As outras taxas de sobrevida, bem como para EPO-R em análise univariada e multivariada não se alteraram.

Talvez o mais importante estudo sobre o impacto da expressão desses marcadores na sobrevida foi realizado por MICHAEL et al. (2007). Nesse estudo, os autores investigaram retrospectivamente a expressão imuno-histoquímica de EPO e o impacto na sobrevida de 113 pacientes portadores de CCR tipo células claras submetidos a nefrectomia radical. Ao todo, 37 pacientes (33%) foram considerados positivos para expressão citoplasmática de EPO e 67% negativos. Ainda nesse estudo, a expressão de EPO estava associada ao sexo masculino e o ao maior grau nuclear do tumor. Na análise univariada de SG fatores clássicos como estadió clínico,

invasão venosa macroscópica e microscópica, invasão capsular, grau nuclear e tamanho tumoral influenciaram negativamente as taxas de sobrevida. Além disso, o risco de óbito em pacientes com expressão positiva de EPO foi duas vezes maior do que os pacientes que não expressaram EPO (HR 2,34; IC 95% 1,27-4,3; $p=0,006$). Nessa série a intensidade de expressão não se correlacionou com a sobrevida. Em análise multivariada, no entanto, apenas a presença de invasão capsular macroscópica permaneceu como fator independente de sobrevida ($p=0,03$).

ITO et al. (2012) descreveram que pacientes com alta expressão de EPO-R e concentrações séricas aumentadas de EPO apresentaram menores taxas de SCE quando comparados com pacientes de baixa expressão. Esses achados não se repetiram em análise multivariada.

Em nossa casuística, dos 56 pacientes que morreram, 73% morreram em decorrência da doença. Ao contrário de MICHAEL et al. (2007), pacientes com alta expressão de EPO apresentaram melhor prognóstico (SG) e 79,7% estavam vivos em 10 anos. Na análise qualitativa, a presença de expressão de EPO influenciou positivamente também a SCE e 83% dos pacientes estavam vivos ao final do seguimento. Temos que mencionar que a nossa casuística foi quase o dobro da utilizada por MICHAEL et al. (2007).

É importante lembrar que, no nosso estudo, a expressão de EPO estava associada a fatores de pior prognóstico como tipo histológico, invasão da adrenal e presença de acometimento da pelve e/ou ureter. No entanto, pacientes que expressaram EPO apresentaram melhores taxas SG e SCE, representando um fator protetor. Talvez a EPO seja um marcador

mais sensível aos fatores paciente dependentes do que aos fatores relacionados a doença. As associações com critérios de melhor prognóstico e *performance status* como pacientes mais jovens, ausência de sintomas, não fumantes, pacientes não transfundidos, KPS ≥ 80 e hemoglobina ≥ 12 podem ter contribuído para as melhores taxas de SG e SCE de nosso estudo.

As divergências pontuais com a literatura podem ser explicadas pelos diferentes anticorpos empregados, pelas diferentes técnicas de leitura e especificidade inerentes à todos os estudos que utilizam TMA e imunohistoquímica, pelo tamanho da amostra utilizada e por divergências inter examinadores. A especificidade dos anticorpos de EPO-R tem sido questionada na literatura (ELLIOTT et al. 2011).

Em nosso estudo, outras adversidades devem ser relatadas por serem marcadores de pouco uso em pesquisas clínicas. Dificuldades na padronização da técnica, no bloqueio da biotina endógena, perda de antigenicidade do material, fixação inadequada no formol e dificuldades na interpretação dos achados e resultados.

Um fator que não pode ser ignorado é que em nosso estudo, apenas avaliamos as expressões da EPO e EPOR intratumoral e peritumoral, por conveniência metodológica e investigacional. Devemos lembrar que, a doença em foco, decorre de um processo dinâmico, multifatorial, muitas vezes não completamente mensurado. Por exemplo, não podemos nos esquecer de que a EPO é produzida no rim contralateral e que seu níveis séricos (não aferidos em nosso estudo) provavelmente exercem alguma

influência na EPO/EPOR intra tumoral e /ou peritumoral. Dietas restritivas, abusivas ou copiosas em ferro e proteína, medicações (corticóides, vitaminas, suplementos), hábitos (tabagismo, etilismo), doenças associadas, síndromes anêmicas, doenças hemorrágicas crônicas (gastrointestinais, ginecológicas) diversas, doenças respiratórias obstrutivas crônicas, verminose e insuficiência renal crônica podem influenciar níveis hematimétricos individuais bem produção sistêmica de EPO. Seria muito difícil, num estudo ideal, controlar todas essas variáveis. Lembremos também que inúmeros fatores genômicos, proteômicos, transcricionais, pós transcricionais, metabolômicos e epigenéticos influenciam as expressões imuno-histoquímicas..

Em conclusão, a expressão imuno-histoquímica de EPO e de EPO-R estão associadas a fatores de pior prognóstico no CCR e a fatores de melhor prognóstico específicos do paciente. A expressão imuno-histoquímica de EPO e EPO-R foi maior no tecido renal não neoplásico (benigno) em comparação ao CCR. Diferenças de expressão entre os subtipos histológicos foram relatadas. Em estudo inédito na literatura, nossos resultados revelam que a perda de expressão de EPO constitui fator prognóstico independente para piores taxas de SG e SCE. Futuros estudos talvez devam avaliar em associação a expressão sérica, imuno-histoquímica e biomolecular destes marcadores.

6 CONCLUSÕES

- 1 A expressão imuno-histoquímica de EPO e EPO-R foi maior no tecido renal não neoplásico (benigno) em comparação ao CCR.
- 2 A alta expressão de EPO e EPO-R foi proporcionalmente menor nos tumores de células claras quando comparado aos outros tipos histológicos.
- 3 A alta expressão de EPO esteve associada e foi proporcionalmente maior nos pacientes mais jovens, nos pacientes assintomáticos ao diagnóstico, nos não tabagistas, nos pacientes não transfundidos, naqueles com presença de invasão da adrenal e ainda na ocorrência de tumores de alto grau histológico de Fuhrman.
- 4 A perda de expressão de EPO pela análise qualitativa, foi fator prognóstico independente desfavorável para SG e SCE.
- 5 A alta expressão de EPO-R também foi proporcionalmente maior nos pacientes mais jovens, nos pacientes com acometimento da pelve e/ou ureter e naqueles com invasão venosa microscópica. No entanto, a presença de expressão de EPO-R não influenciou as taxas de sobrevida estudadas (SG, SCE e SLD) nas análises univariadas e multivariadas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ACS] American Cancer Society. **Cancer facts and figures 2013**. Available from: <URL:http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiology_surveillance/documents/document/acspc-036845.pdf> [2014 jan 12]

Abou El Fettouh HI, Cherullo EE, El-Jack M, Al Maslamani Y, Novick AC. Sporadic renal cell carcinoma in young adults: presentation, treatment, and outcome. **Urology** 2002; 60:806-10.

Acs G, Acs P, Beckwith SM, et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. **Cancer Res** 2001; 61:3561-5.

Amin MB, Amin MB, Tamboli P, et al. Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases. **Am J Surg Pathol** 2002; 26:281-91.

Ather MH, Nazim SM. Impact of Charlson's comorbidity index on overall survival following tumor nephrectomy for renal cell carcinoma. **Int Urol Nephrol** 2010; 42:299-303.

Baldewijns MM, van Vlodrop IJ, Smits KM, et al. Different angiogenic potential in low and high grade sporadic clear cell renal cell carcinoma is not related to alterations in the von Hippel-Lindau gene. **Cell Oncol** 2009; 31:371-82.

Bao H, Jacobs-Helber SM, Lawson AE, Penta K, Wickrema A, Sawyer ST. Protein kinase B (c-Akt), phosphatidylinositol 3-kinase, and STAT5 are activated by erythropoietin (EPO) in HCD57 erythroid cells but are constitutively active in an EPO-independent, apoptosis-resistant subclone (HCD57-SREI cells). **Blood** 1999; 93:3757-73.

Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. **Lab Invest** 1986; 55:244-8.

Becker F, Siemer S, Hack M, Humke U, Ziegler M, Stöckle M. Excellent long-term cancer control with elective nephron-sparing surgery for selected renal cell carcinomas measuring more than 4 cm. **Eur Urol** 2006; 49:1058-63; discussion 1063-4.

Bedke J, Buse S, Pritsch M, et al. Perinephric and renal sinus fat infiltration in pT3a renal cell carcinoma: possible prognostic differences. **BJU Int** 2009; 103:1349-54.

Belsante M, Darwish O, Youssef R, et al. Lymphovascular invasion in clear cell renal cell carcinoma--association with disease-free and cancer-specific survival. **Urol Oncol** 2014; 32:30.e23-8.

Berdel WE, Oberberg D, Reufi B, Thiel E. Studies on the role of recombinant human erythropoietin in the growth regulation of human nonhematopoietic tumor cells in vitro. **Ann Hematol** 1991; 63:5-8.

Bonsib SM. T2 clear cell renal cell carcinoma is a rare entity: a study of 120 clear cell renal cell carcinomas. **J Urol** 2005; 174:1199-202; discussion 1202.

Bosniak MA. The use of the Bosniak classification system for renal cysts and cystic tumors. **J Urol** 1997; 157:1852-3.

Bretheau D, Lechevallier E, de Fromont M, Sault MC, Rampal M, Coulange C. Prognostic value of nuclear grade of renal cell carcinoma. **Cancer** 1995; 76:2543-9.

Brookman-Amisshah S, Kendel F, Spivak I, et al. Impact of clinical variables on predicting disease-free survival of patients with surgically resected renal cell carcinoma. **BJU Int** 2009; 103:1375-80.

Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. **Science** 2001; 294:1337-40.

Butnor KJ, Nicholson AG, Allred DC, et al. Expression of renal cell carcinoma-associated markers erythropoietin, CD10, and renal cell carcinoma marker in diffuse malignant mesothelioma and metastatic renal cell carcinoma. **Arch Pathol Lab Med** 2006; 130:823-7.

Capitanio U, Becker F, Blute ML, et al. Lymph node dissection in renal cell carcinoma. **Eur Urol** 2011; 60:1212-20.

Caro JJ, Salas M, Ward A, Goss G. Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: a systemic, quantitative review. **Cancer** 2001; 91:2214-21.

Charboneau JW, Hattery RR, Ernst EC 3rd, James EM, Williamson B Jr, Hartman GW. Spectrum of sonographic findings in 125 renal masses other than benign simple cyst. **AJR Am J Roentgenol** 1983; 140:87-94.

Chawla SN, Crispen PL, Hanlon AL, Greenberg RE, Chen DY, Uzzo RG. The natural history of observed enhancing renal masses: meta-analysis and review of the world literature. **J Urol** 2006; 175:425-31.

Chisholm GD. Nephrogenic ridge tumors and their syndromes. **Ann N Y Acad Sci** 1974; 230:403-23.

Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. **Nat Rev Urol** 2010; 7:245-57.

Cindolo L, Patard JJ, Chiodini P et al. Comparison of predictive accuracy of four prognostic models for nonmetastatic renal cell carcinoma after nephrectomy: a multicenter European study. **Cancer** 2005; 104:1362-71.

Clark D, Kersting R, Rojiani AM. Erythropoietin immunolocalization in renal cell carcinoma. **Mod Pathol** 1998; 11:24-8.

Coppin C, Porzsolt F, Autenrieth M, Kumpf J, Coldman A, Wilt T. Immunotherapy for advanced renal cell cancer. **Cochrane Database Syst Rev** 2005; (1):CD001425.

Cox DR. Regression models and life tables. **J Royal Stat Soc Ser B** 1972; 34:187-220.

Dall'Oglio MF, Arap MA, Antunes AA, Cury J, Leite KR, Srougi M. Impact of clinicopathological parameters in patients treated for renal cell carcinoma. **J Urol** 2007; 177:1687-91.

de Cássio Zequi S, de Campos EC, Guimarães GC, Bachega W Jr, da Fonseca FP, Lopes A. The use of the American Society of Anesthesiology classification as a prognostic factor in patients with renal cell carcinoma. **Urol Int** 2010; 84:67-72.

de Peralta-Venturina M, Moch H, Amin M, et al. Sarcomatoid differentiation in renal cell carcinoma: a study of 101 cases. **Am J Surg Pathol** 2001; 25:275-84.

Delahunt B, Eble JN, McCredie MR, Bethwaite PB, Stewart JH, Bilous AM. Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases. **Hum Pathol** 2001; 32:590-5.

Delahunt B, Cheville JC, Martignoni G, et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for renal cell carcinoma and other prognostic parameters. **Am J Surg Pathol** 2013; 37:1490-504.

Desai J, Demetri GD. Recombinant human erythropoietin in cancer-related anemia: an evidence-based review. **Best Pract Res Clin Haematol** 2005; 18:389-406.

Du J, Zheng JH, Chen XS, et al. High preoperative plasma fibrinogen is an independent predictor of distant metastasis and poor prognosis in renal cell carcinoma. **Int J Clin Oncol** 2013; 18:517-23.

Eckardt KU. Erythropoietin production in liver and kidneys. **Curr Opin Nephrol Hypertens** 1996; 5:28-34.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7th ed. New York: Springer; 2009. Kidney; p.479-89.

Elliott S, Busse L, Bass MB, et al. Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression. **Blood** 2006; 107:1892-5. Epub 2005 Oct 25. Erratum in: **Blood** 2006; 107:3454.

Farrell F, Lee A. The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. **Oncologist** 2004; 9:18–30.

Feng CC, Ding GX, Song NH, et al. Paraneoplastic hormones: parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and erythropoietin (EPO) are related to vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in clear cell renal cell carcinoma. **Tumour Biol** 2013; 34:3471-6.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer** 2010; 127:2893-917.

Ferreira DB, Zequi SC, Costa WD, et al. Use of the American Society of Anesthesiologists classification as an additional planning tool for renal cell carcinoma assessment. **J Cancer Ther** 2013; 4:7-14.

Ficarra V, Galfano A, Mancini M, et al. TNM staging system for renal cell carcinoma: current status and future perspectives. **Lancet Oncol** 2007; 8:554–8.

Ficarra V, Prayer-Galetti T, Novara G, et al. Tumor-size breakpoint for prognostic stratification of localized renal cell carcinoma. **Urology** 2004; 63:235-9; discussion 239-40.

Flanigan RC, Mickisch G, Sylvester R, et al. Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis. **J Urol** 2004; 171:1071-6.

Flanigan RC, Salmon SE, Blumenstein BA, et al. Nephrectomy followed by interferon alfa-2b compared with interferon alfa-2b alone for metastatic renal-cell cancer. **N Engl J Med** 2001; 345:1655-9.

Frank I, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score. **J Urol** 2002; 168:2395-400.

Frank SJ Receptor dimerization in GH and erythropoietin action—it takes two to tango, but how? **Endocrinology** 2002; 143:2–10.

Garcia JA, Cowey CL, Godley PA. Renal cell carcinoma. **Curr Opin Oncol** 2009; 21:266-71.

Gelb AB. Renal cell carcinoma: current prognostic factors. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). **Cancer** 1997; 80:981-6.

Gonçalves PD, Srougi M, Dall'lio MF, Leite KR, Ortiz V, Hering F. Low clinical stage renal cell carcinoma: relevance of microvascular tumor invasion as a prognostic parameter. **J Urol** 2004; 172:470-4.

Gong K, Zhang N, Zhang Z, Na Y. Coexpression of erythropoietin and erythropoietin receptor in sporadic clear cell renal cell carcinoma. **Cancer Biol Ther** 2006; 5:582-5.

Gross AJ, Wolff M, Fandrey J, Miersch WD, Dieckmann KP, Jelkmann W. Prevalence of paraneoplastic erythropoietin production by renal cell carcinomas. **Clin Investig** 1994; 72:337-40.

Hardee ME, Arcasoy MO, Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Dewhirst MW. Erythropoietin biology in cancer. **Clin Cancer Res** 2006; 12:332-9.

Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:38-47.

Henke M, Laszig R, Rube C, et al. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet** 2003; 362:1255-60.

Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. **J Natl Cancer Inst** 2001; 93:266-76.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009**. based on November 2012 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2013. Available from: <URL:http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010> [2014 jan 12]

Huang WC, Elkin EB, Levey AS, Jang TL, Russo P. Partial nephrectomy versus radical nephrectomy in patients with small renal tumors--is there a difference in mortality and cardiovascular outcomes? **J Urol** 2009; 181:55-61; discussion 61-2.

Ito K, Yoshii H, Asano T, et al. Impact of increased erythropoietin receptor expression and elevated serum erythropoietin levels on clinicopathological features and prognosis in renal cell carcinoma. **Exp Ther Med** 2012; 3:937-44.

Jelkmann W, Wagner K. Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. **Ann Hematol** 2004; 83:673-86.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics, 2009. **CA Cancer J Clin** 2009; 59:225-49.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. **CA Cancer J Clin** 2007; 57:43-66.

Jeon HG, Jeong IG, Kwak C, Kim HH, Lee SE, Lee E. Reevaluation of renal cell carcinoma and perirenal fat invasion only. **J Urol** 2009; 182:2137-43.

Kaouk JH, Aron M, Rewcastle JC, Gill IS. Cryotherapy: clinical end points and their experimental foundations. **Urology** 2006; 68:38-44.

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

Karnofsky DA, Burchenal JH. Present status of clinical cancer chemotherapy. **Am J Med** 1950; 8:767-88.

Kattan MW, Reuter V, Motzer RJ, Katz J, Russo P. A postoperative prognostic nomogram for renal cell carcinoma. **J Urol** 2001; 166:63–7.

Katz MD, Serrano MF, Humphrey PA, et al. The role of lymphovascular space invasion in renal cell carcinoma as a prognostic marker of survival after curative resection. **Urol Oncol** 2011; 29:738-44.

Kim JM, Song PH, Kim HT, Park TC. The prognostic factors for patients with pT1a renal cell carcinoma. **Korean J Urol** 2010; 51:233-8.

Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. **J Clin Oncol** 2004; 22:4991-5004.

Klatte T, Patard JJ, Goel RH, et al. Prognostic impact of tumor size on pT2 renal cell carcinoma: an international multicenter experience. **J Urol** 2007; 178:35-40; discussion 40.

Klatte T, Rao PN, de Martino M, et al. Cytogenetic profile predicts prognosis of patients with clear cell renal cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2009; 27:746-53.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med** 1998; 4:844-7.

Kontak JA, Campbell SC. Prognostic factors in renal cell carcinoma. **Urol Clin North Am** 2003; 30:467-80.

Kroeger N, Rampersaud EN, Patard JJ, et al. Prognostic value of microvascular invasion in predicting the cancer specific survival and risk of metastatic disease in renal cell carcinoma: a multicenter investigation. **J Urol** 2012; 187:418-23.

Kümmerlin I, ten Kate F, Smedts F, et al. Core biopsies of renal tumors: a study on diagnostic accuracy, interobserver, and intraobserver variability. **Eur Urol** 2008; 53:1219-25.

Kutikov A, Egleston BL, Wong YN, Uzzo RG. Evaluating overall survival and competing risks of death in patients with localized renal cell carcinoma using a comprehensive nomogram. **J Clin Oncol** 2010; 28:311-7.

Lacombe C, Mayeux P. The molecular biology of erythropoietin. **Nephrol Dial Transplant** 1999; 2:22-8.

Lai SY, Childs EE, Xi S, et al. Erythropoietin-mediated activation of JAK-STAT signaling contributes to cellular invasion in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncogene** 2005; 24:4442-9. Erratum in: **Oncogene** 2005; 24:8216.

Lam JS, Shvarts O, Leppert JT, Figlin RA, Belldegrun AS. Renal cell carcinoma 2005: new frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy. **J Urol** 2005; 173:1853-62.

Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. **CA Cancer J Clin** 1999; 49:8-31.

Lappin T. The cellular biology of erythropoietin receptors. **Oncologist** 2003; 1:15-8.

Lee CT, Katz J, Fearn PA, Russo P. Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information. **Urol Oncol** 2002; 7:135-40.

Lee JE, Hunter DJ, Spiegelman D, et al. Erythropoietin reduces cisplatin-induced apoptosis in renal carcinoma cells via a PKC dependent pathway. **Cancer Biol Ther** 2007; 6:1944-50.

Lee YS, Vortmeyer AO, Lubensky IA, et al. Coexpression of erythropoietin and erythropoietin receptor in von Hippel-Lindau disease-associated renal cysts and renal cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2005; 11:1059-64.

Lipworth L, Tarone RE, McLaughlin JK. The epidemiology of renal cell carcinoma. **J Urol** 2006; 176:2353-8.

Littlewood TJ, Nortier J, Rapoport B, et al. Epoetin alfa corrects anemia and improves quality of life in patients with hematologic malignancies receiving non-platinum chemotherapy. **Hematol Oncol** 2003; 21:169-80.

Ljungberg B, Rasmuson T, Grankvist K. Erythropoietin in renal cell carcinoma: evaluation of its usefulness as a tumor marker. **Eur Urol** 1992; 21:160-3.

Lopez-Beltran A, Carrasco JC, Cheng L, Scarpelli M, Kirkali Z, Montironi R. 2009 update on the classification of renal epithelial tumors in adults. **Int J Urol** 2009; 16:432-43

Madbouly K, Al-Qahtani SM, Ghazwani Y, Al-Shaibani S, Mansi MK. Microvascular tumor invasion: prognostic significance in low-stage renal cell carcinoma. **Urology** 2007; 69:670-4.

Manola J, Royston P, Elson P, et al. Prognostic model for survival in patients with metastatic renal cell carcinoma: results from the international kidney cancer working group. **Clin Cancer Res** 2011; 17:5443-50.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. **Nature** 1999; 399:271-5.

McDermott DF, Regan MM, Clark JI, et al. Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2005; 23:133-41. Erratum in: **J Clin Oncol** 2005; 23:2877.

Michael A, Politi E, Havranek E, et al. Prognostic significance of erythropoietin expression in human renal cell carcinoma. **BJU Int** 2007; 100:291-4.

Miller DC, Hollingsworth JM, Hafez KS, Daignault S, Hollenbeck BK. Partial nephrectomy for small renal masses: an emerging quality of care concern? **J Urol** 2006; 175:853-7; discussion 858.

Miyake M, Goodison S, Lawton A, Zhang G, Gomes-Giacoia E, Rosser CJ. Erythropoietin is a JAK2 and ERK1/2 effector that can promote renal tumor cell proliferation under hypoxic conditions. **J Hematol Oncol** 2013; 6:65.

Moore SC, Chow WH, Schatzkin A, et al. Physical activity during adulthood and adolescence in relation to renal cell cancer. **Am J Epidemiol** 2008; 168:149-57.

Morais C, Johnson DW, Vesey DA, Gobe GC. Functional significance of erythropoietin in renal cell carcinoma. **BMC Cancer** 2013; 13:14.

Morere JF, Bouillet T, Piperno-Neumann S, et al. [Treatment of advanced kidney cancer using recombinant erythropoietin]. **Prog Urol** 1997; 7:399-402.

Morettin PA, Bussab WO. **Estatística básica**. 2ª ed. São Paulo: Atual; 2005.

Motzer RJ, Bacik J, Mazumdar M. Prognostic factors for survival of patients with stage IV renal cell carcinoma: memorial sloan-kettering cancer center experience. **Clin Cancer Res** 2004; 10:6302S-3S.

Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal-cell carcinoma. **N Engl J Med** 1996; 335:865-75.

Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. **Lancet** 2008; 372:449-56.

Nardi AC, Zequi Sde C, Clark OA, Almeida JC, Glina S. Epidemiologic characteristics of renal cell carcinoma in Brazil. **Int Braz J Urol** 2010; 36:151-7; discussion 158.

Négrier S, Escudier B, Gomez F, et al. Prognostic factors of survival and rapid progression in 782 patients with metastatic renal carcinomas treated by cytokines: a report from the Groupe Français d'Immunothérapie. **Ann Oncol** 2002; 13:1460-8.

Nogueira M, Kim HL. Molecular markers for predicting prognosis of renal cell carcinoma. **Urol Oncol** 2008; 26:113-24.

Nordsmark M, Overgaard M, Overgaard J. Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. **Radiother Oncol** 1996; 41:31-9.

Nseyo UO, Williams PD, Murphy GP. Clinical significance of erythropoietin levels in renal carcinoma. **Urology** 1986; 28:301-6.

Oakley NE, Hegarty NJ, McNeill A, Gill IS. Minimally invasive nephron-sparing surgery for renal cell cancer. **BJU Int** 2006; 98:278-84.

Ohh M, Park CW, Ivan M, et al. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. **Nat Cell Biol** 2000; 2:423-7.

Ohh M. Ubiquitin pathway in VHL cancer syndrome. **Neoplasia** 2006; 8:623-9.

Pantuck AJ, Zisman A, Belldegrun A. Biology of renal cell carcinoma: changing concepts in classification and staging. **Semin Urol Oncol** 2001; 19:72-9.

Pantuck AJ, Zisman A, Dorey F, et al. Renal cell carcinoma with retroperitoneal lymph nodes: role of lymph node dissection. **J Urol** 2003; 169:2076-83.

Papworth K, Bergh A, Grankvist K, Ljungberg B, Rasmuson T. Expression of erythropoietin and its receptor in human renal cell carcinoma. **Tumour Biol** 2009; 30:86-92.

Papworth K. **Prognostic factors in renal cell carcinoma [Elektronisk resurs]: evaluation of erythropoietin and its receptor, carbonic anhydrase IX, parathyroid hormone-related protein and osteopontin**, Umeå; 2011. [Doctoral thesis-Umeå University, Faculty of Medicine, Department of Radiation Sciences, Oncology]

Patard JJ, Leray E, Cindolo L, et al. Multi-institutional validation of a symptom based classification for renal cell carcinoma. **J Urol** 2004a; 172:858-62.

Patard JJ, Shvarts O, Lam JS, et al. Safety and efficacy of partial nephrectomy for all T1 tumors based on an international multicenter experience. **J Urol** 2004b; 171:2181-5.

Patard JJ, Fergelot P, Karakiewicz PI, et al. Low CAIX expression and absence of VHL gene mutation are associated with tumor aggressiveness and poor survival of clear cell renal cell carcinoma. **Int J Cancer** 2008; 123:395-400.

Pichler M, Hutterer GC, Chromecki TF, et al. Histologic tumor necrosis is an independent prognostic indicator for clear cell and papillary renal cell carcinoma. **Am J Clin Pathol** 2012; 137:283-9.

Pignot G, Elie C, Conquy S, et al. Survival analysis of 130 patients with papillary renal cell carcinoma: prognostic utility of type 1 and type 2 subclassification. **Urology** 2007; 69:230–5.

Pirrota MT, Bernardeschi P, Fiorentini G. Targeted-therapy in advanced renal cell carcinoma. **Curr Med Chem** 2011; 18:1651-7.

Poon SA, Gonzalez JR, Benson MC, McKiernan JM. Invasion of renal sinus fat is not an independent predictor of survival in pT3a renal cell carcinoma. **BJU Int** 2009; 103:1622-5.

Raj GV, Thompson RH, Leibovich BC, Blute ML, Russo P, Kattan MW. Preoperative nomogram predicting 12-year probability of metastatic renal cancer. **J Urol** 2008; 179:2146-51.

Ribatti D, Presta M, Vacca A, et al. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. **Blood** 1999; 93:2627-36.

Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Olsen DA, Provost E. Amplification of tissue by construction of tissue microarrays. **Exp Mol Pathol** 2001; 70:255-64.

Rini BI. Metastatic renal cell carcinoma: many treatment options, one patient. **J Clin Oncol** 2009; 27:3225-34.

Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. **J Urol** 1969; 101:297-301.

Ross H, Argani P. Xp11 translocation renal cell carcinoma. **Pathology** 2010; 42:369-73.

Russo P, Jang TL, Pettus JA, et al. Survival rates after resection for localized kidney cancer: 1989 to 2004. **Cancer** 2008; 113:84-96.

Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. **J Biol Chem** 1997; 272:22642-7.

Sasaki R, Masuda S, Nagao M. Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. **Biosci Biotechnol Biochem** 2000; 64:1775-93.

Sauter G, Simon R, Hillan K. Tissue microarrays in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov** 2003; 2:962-72.

Sheth S, Scatarige JC, Horton KM, Corl FM, Fishman EK. Current concepts in the diagnosis and management of renal cell carcinoma: role of multidetector ct and three-dimensional CT. **Radiographics** 2001; 21 Spec No:S237-54.

Shvarts O, Lam JS, Kim HL, Han KR, Figlin R, Belldegrun A. Eastern Cooperative Oncology Group performance status predicts bone metastasis in patients presenting with renal cell carcinoma: implication for preoperative bone scans. **J Urol** 2004; 172:867-70.

Sorbellini M, Kattan MW, Snyder ME, et al. A postoperative prognostic nomogram predicting recurrence for patients with conventional clear cell renal cell carcinoma. **J Urol** 2005; 173:48-51.

Suppiah R, Shaheen PE, Elson P, et al. Thrombocytosis as a prognostic factor for survival in patients with metastatic renal cell carcinoma. **Cancer** 2006; 107:1793-800.

Thompson RH, Leibovich BC, Cheville JC, et al. Is renal sinus fat invasion the same as perinephric fat invasion for pT3a renal cell carcinoma? **J Urol** 2005; 174:1218-21.

Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. **N Engl J Med** 2012; 366:2443-54.

Tóvári J, Pirker R, Tímár J, Ostoros G, Kovács G, Döme B. Erythropoietin in cancer: an update. **Curr Mol Med** 2008; 8:481-91.

Tsui KH, Shvarts O, Barbaric Z, Figlin R, de Kernion JB, Belldegrun A. Is adrenalectomy a necessary component of radical nephrectomy? UCLA experience with 511 radical nephrectomies. **J Urol** 2000; 163:437-41.

Uno M, Fujimoto Y, Takada T, et al. Prognostic factors for survival of patients after curative surgery for renal cell carcinoma: multivariate analysis of 482 cases. **Int J Clin Oncol** 2004; 9:510-4.

Vaupel P, Kelleher DK, Höckel M. Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. **Semin Oncol** 2001a; 28(2 Suppl 8):29-35.

Vaupel P, Thews O, Hoekel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. **Med Oncol** 2001b; 18:243-59.

Verhoest G, Veillard D, Guillé F, et al. Relationship between age at diagnosis and clinicopathologic features of renal cell carcinoma. **Eur Urol** 2007; 51:1298-304; discussion 1304-5.

Vesey DA, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobé G, Johnson DW. Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. **Nephrol Dial Transplant** 2004; 19:348-55.

Vickers MM, Heng DY. Prognostic and predictive biomarkers in renal cell carcinoma. **Target Oncol** 2010; 5:85-94.

Volpe A, Finelli A, Gill IS, et al. Rationale for percutaneous biopsy and histologic characterisation of renal tumours. **Eur Urol** 2012; 62:491-504.

Volpe A, Kachura JR, Geddie WR, et al. Techniques, safety and accuracy of sampling of renal tumors by fine needle aspiration and core biopsy. **J Urol** 2007; 178:379-86.

Wallen EM, Pruthi RS, Joyce GF, Wise M; Urologic Diseases in America Project. Kidney cancer. **J Urol** 2007; 177:2006-18; discussion 2018-9.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. **Proc Natl Acad Sci USA** 1995; 92:5510-4.

Warshauer DM, McCarthy SM, Street L, et al. Detection of renal masses: sensitivities and specificities of excretory urography/linear tomography, US, and CT. **Radiology** 1988; 169:363-5.

Wen D, Boissel JP, Showers M, Ruch BC, Bunn HF. Erythropoietin structure function relationships. Identification of functionally important domains. **J Biol Chem** 1994; 269:22839-46.

Westenfelder C, Baranowski RL. Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. **Kidney Int** 2000; 58:647-57.

Westenfelder C, Biddle DL, Baranowski RL. Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors. **Kidney Int** 1999; 55:808-20.

Wiesener MS, Münchenhagen P, Gläser M, et al. Erythropoietin gene expression in renal carcinoma is considerably more frequent than paraneoplastic polycythemia. **Int J Cancer** 2007; 121:2434-42.

Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. **Cell** 1993; 74:227-36.

Wojchowski DM, Gregory RC, Miller CP, Pandit AK, Pircher TJ. Signal transduction in the erythropoietin receptor system. **Exp Cell Res** 1999; 253:143-56.

Wünsch-Filho V. Insights on diagnosis, prognosis and screening of renal cell carcinoma. **Sao Paulo Med J** 2002; 120:163-4.

Zander R, Vaupel P. Proposal for using a standardized terminology on oxygen transport to tissue. **Adv Exp Med Biol** 1985; 191:965-70.

Zequi SC. **Correlação entre os fatores clínicos e anatomopatológicos associados aos índices de proliferação celular como prognósticos em portadores de câncer do rim tratados por cirurgia.** São Paulo; 2000. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente]

Zhang J, Pedrosa I, Rofsky NM. MR techniques for renal imaging. **Radiol Clin North Am** 2003; 41:877-907.

Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. **Cancer Res** 1999; 59:5830-5.

Anexo 1 - Classificação de performance/status de Karnofsky (KPS).

- 100 Normal, nenhuma queixa, nenhuma evidência de doença.
- 90 Capaz para continuar atividade normal; pequenos Sintomas ou sinais da doença.
- 80 Atividade normal com esforço; alguns sinais e sintomas.
- 70 Cuidados para si; incapaz para continuar suas atividades normais.
- 60 Requer ajuda ocasional; cuidados para a maioria das necessidades.
- 50 Requer ajuda considerável e cuidados médicos frequentes.
- 40 Incapacitado; requer cuidado especial e ajuda.
- 30 Severamente incapacitado; hospitalizado morte não iminente.
- 20 Muito doente; precisa de internação urgente e requer medidas de suporte ou tratamento.
- 10 Moribundo; processo de fatalidade rapidamente progredindo.
- 0 Morto.

Fonte: Karnofsky DA, Burchenal JH. The clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer. In: MacLeod CM, editor. **Evaluation of chemotherapeutic agents**. New York: Columbia Univ Press; 1949 p.196.

Anexo 2 - Classificação de performance/status do ECOG: Eastern Cooperative Oncologic Group Performance Status Classification.

- 0 Assintomático.
- 1 Sintomático, mas completamente ambulatorial.
- 2 Sintomático, permanece no leito <50% do dia.
- 3 Sintomático, permanece > 50% do dia no leito, mas não restrito ao leito.
- 4 Restrito ao leito.
- 5 Morto.

Fonte: Oken MM, Creech RH, Tormey DC, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. **Am J Clin Oncol** 1982; 5:649-55.

Anexo 3 - Ficha de levantamento de dados

Nome: _____

Registro: _____

Lâmina: _____

Data de admissão: _____

Idade (anos): _____

Raça: (1) Branco (2) Não branco

Sexo: (1) Masculino (2) Feminino

Tabagismo: (1) Fumante (2) Não fumante (9) Ignorado

“Packyear”: (0) Ignorado (1) 1-10 Packyears (2) 11-20 Packyears (3) >20 Packyears

ECOG: (0) 0 (1) 1(2) 2

ASA: (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4

Sintomas: (0) Ausência (1) Hematuria (2) Dor lombar (3) Emagrecimento (4) Febre (5) Outros (6) Massa palpável (9) Ignorado

Tempo de Evolução (meses): _____

Tumor incidental: (0) Sim (1) Não

Metástase ao diagnóstico: (0) Não (1) Sim

Tumor Familiar: (0) Não (1) Sim

Nº de Familiares: (0) 0 (1) 1 (2) 2

Hemoglobina: _____ Hematócrito: _____

Cirurgia: (1) Radical (2) Parcial

Incisão: (1) Abdominal (2) Lobotomia

Ressecção: (0) Irressecável (1) Ressecção total (2) Margem microscópica (3) Margem macroscópica

Tempo de Cirurgia: _____

Data da Cirurgia: _____

Transusão: (0) Não (1) Sim **Volume de transfusão:** _____

Complicações Precoces: (0) Não (1) Insuficiência renal aguda (2) Íleo paralítico (3) Infecção
(4) Cardiovascular (5) Tromboembolismo (6) Fistula urinaria (7) Hemorragia (9) Outras

Internação (dias): _____

Complicações Tardias: (0) Não (1) Insuficiência renal aguda (2) Suboclusão intestinal (3)
Parede abdominal (4) Hipertensão arterial sistêmica (6) Outras

Estádio T: (1) T1a (2) T1b (3) T2 (4) T3a (5) T3b(6) T3c (7) T4

Estádio N: (0) N0 (1) N1 (2) N2 (3) Nx

TNM: (1) TN0M0 (2)TN+M0 (3) TN0M+ (4) TN+M+

Nº de Linfonodos: _____ **Nº de Linfonodos +:** _____

Estádio Robson: (1) I (2) II (3) IIIa (4)IIIb (5) IIIc (6) IV

Estádio clínico: (1) I (2) II (3) III (4) IV

Grau de Fuhrman: (1) I (2) II (3) III (4) IV

Tipo Histológico: (1) Células claras (2) Papilífero (3) Cromóforo (4) TTE3 Gene (5) Ductos
coletores (6) Inclassificável (7) Outros

Diâmetro tumoral (cm): _____

Lateralidade: (1) Direito (2) Esquerdo (3) Bilateral

Tumor bilateral: (0) Não (1) Sincrônico (2) Metacrônico

Multifocal: (0) Não (1) Sim

Topografia: (1) Pólo superior (2) Pólo médio (3) Pólo inferior (4) Mais de um pólo

Invasão vascular: (0) Não (1) Sim

Invasão vascular linfática: (0) Não (1) Sim

Invasão de veia renal: (0) Não (1) Sim

Invasão de veia cava: (0) Não (1) Sim

Anexo 4 - Estadiamento clínico da “American Joint Committee on Cancer’s AJCC Cancer Staging”

Stage	T	N	M
I	T1	No	Mo
II	T2	No	Mo
III	T1 or T2	N1	Mo
	T3	No or N1	Mo
IV	T4	Any N	Mo
	Any T	Any N	M1

^aReprinted with permission from AJCC: Kidney. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 479-89.

Anexo 5 - Graduação histológica de Fuhrman

Grau I	Núcleo arredondado e uniforme, com cerca de 10µm de diâmetro e nucléolo ausente/pequeno.
Grau II	Núcleo levemente irregular, com diâmetro de 15µm e nucléolo visível, mas pequeno.
Grau III	Núcleo moderadamente irregular, com diâmetro de 20µm e nucléolo grande.
Grau IV	Núcleo acentuadamente irregular/ pleomórfico e formas multilobulares, com cromatina agrupada e diâmetro maior que 20µm.

Fonte: Fuhrman AS, Lasky LC, Limas C. prognostic significance of morphological parameters in renal cell carcinomas. **Am J Surg Pathol** 1982; 6:655-63.

**Anexo 6 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP do
A.C. Camargo Cancer Center**



**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 24 de Junho de 2011.

Ao
Dr. Stênio de Cássio Zequi

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1577/11
"Análise da expressão imuno-histoquímica e valor prognóstico da eritropoetina (EPO) e do seu receptor (EPO-R) em carcinoma de células renais".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 14/06/2011, **aprovaram** a realização do estudo em referência, datado de 20 de maio de 2011 e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de infraestrutura e instalações do Departamento de Cirurgia Pélvica – Núcleo de Urologia;
- Orçamento Financeiro detalhado;
- Lista de centros participantes da pesquisa;
- Declaração sobre aprovação por Comitê de Ética no país de origem;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Urologia do Hospital Pasteur, Montevideo - Uruguai;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência do Núcleo de Urologia.

Para iniciar o projeto, é necessário aguardar a aprovação da CONEP para este primeiro centro.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

PARECER CONSUBSTANCIADO

Projeto: 1577/11

Título: "Análise da expressão imuno-histoquímica e valor prognóstico da eritropoetina (EPO) e do seu receptor (EPO-R) em carcinoma de células renais".

Pesquisador Responsável: Dr. Stênio de Cássio Zequi

Aluno: Daniel Beltrame Ferreira (Mestrado)

Patrocinador: Será submetido à FAPESP.

Comentários gerais:

Os autores desse estudo propõem investigar a expressão imunohistoquímica da EPO e EPO-R nos diversos tipos histológicos de CCR, nos tecidos renais não neoplásicos e avaliar o valor prognóstico desse marcador com maior casuística e caráter internacional.

Inicialmente será estudado o banco de dados de portadores de CCR tratados por nefrectomia no Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital AC Camargo entre 1990 e 2008, constituídos por 140 casos já disponíveis em lâminas de tissue microarray (TMA) utilizados na dissertação de mestrado de Walter da Costa (2011). Outros 52 casos, desse mesmo período e local, serão revisados e preparados em TMA. A amostra final será contemplada com cerca de 80 casos gentilmente cedidos pelo Dr. Diego Abreu Clavijo, provenientes do Serviço de Urologia do Hospital Pasteur em Montevideo, Uruguai.

A partir dos Serviços de Arquivo Médico e Estatístico (SAME), todos os prontuários serão revisados. Os dados clínicos e epidemiológicos serão coletados.

Para a obtenção de dados patológicos, serão revisadas as lâminas por um único patologista. Todos os casos serão reclassificados de modo uniforme e serão selecionadas as áreas tumorais mais representativas de cada caso. A partir daí, serão resgatados os blocos de parafina correspondentes para confecção do *tissue microarray* (TMA). Todas as variáveis serão transcritas para um banco de dados específico.

Adequação do título: Adequado e pertinente aos objetivos propostos.

Adequação da revisão de literatura: Adequada.

Adequação dos objetivos frente à literatura: Adequados.

Critérios de inclusão:

- CCR comprovado histologicamente;
- Ausência de tratamentos neoadjuvantes à cirurgia
- Tratamento cirúrgico exclusivo;
- Ausência de comorbidades que reduzam a expectativa de vida a menos de seis meses.

Critérios de exclusão:

- Pacientes submetidos a outros tratamentos para o CCR além da cirurgia ou com comorbidades que possam comprometer a sobrevivência;
- Pacientes com sarcomas renais, neoplasias renais não corticais ou com tumor de Wilms;

- Prontuários com dados incompletos ou faltantes;
- Material arquivado em parafina em más condições para a elaboração de novos cortes para imunohistoquímica;
- Pacientes com tempo de seguimento inferior a seis 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.

Riscos e benefícios aos sujeitos: Nenhum benefício e/ou risco potencial.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Apresentou solicitação de dispensa por se tratar de projeto retrospectivo.

Análise crítica de riscos: Não há riscos.

Duração total da pesquisa: Vinte e um meses.

Explicitação das responsabilidades:

- **do pesquisador:** apresentou documentação pertinente.
- **do patrocinador:** não se aplica.

Explicitação dos critérios para suspender ou encerrar a pesquisa: Estudo retrospectivo. Não se aplica.

Local de pesquisa: Hospital A.C. Camargo: Departamento de Cirurgia Pélvica – Núcleo de Urologia e Anatomia Patológica.

Fonte financeira: Submetido à FAPESP.


Análise da Comissão de Pesquisa – COPE: Aprovado.

Comentários Finais:

Do ponto de vista ético não encontramos impedimentos para a realização do projeto apresentado.

Parecer Final:

Projeto Aprovado.


FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
Hospital do Câncer A. C. Camargo
Comitê de Ética em Pesquisa
Prof. Dr. Luiz Paulo Kowaleki
Coordenador

Anexo 7 - Carta de aprovação do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa- CONEP



CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER Nº 549/2011

Registro CONEP 16579 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Folha de Rosto – 431671

Processo nº 25000.117635/2011-37

Projeto de Pesquisa: “Análise da expressão imuno-histoquímica e valor prognóstico da eritropoetina (EPO) e do seu receptor (EPO-R) em carcinoma de células renais”. Projeto de Pesquisa datado de 20 de maio de 2011.

Pesquisador Responsável: Stênio de Cássio Zequi

Instituição: Fundação Antônio Prudente – Hospital do Câncer AC Camargo (**ÚNICO CENTRO BRASILEIRO**)

CEP de origem: Hospital do Câncer AC Camargo

Área Temática Especial: Pesquisa com cooperação estrangeira

Patrocinador: FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Sumário geral do protocolo

Introdução: O termo carcinoma de células renais (CCR) designa as neoplasias renais de origem epitelial com potencial maligno. O CCR é dividido em vários subtipos histológicos padronizados devido à diferenças citogenéticas, fenotípicas e clínicas. O CCR corresponde a 2-3% das neoplasias malignas em adultos e sua incidência está aumentando nos últimos 20 anos. Embora o diagnóstico incidental seja crescente, em todo o mundo, a mortalidade pela doença não se reduz. Cerca de 30% dos pacientes apresentam doença metastática ao diagnóstico e quase metade dos pacientes tratados por doença localizada podem apresentar recorrência após 5 anos da nefrectomia. Estima-se que sua incidência, no Brasil, varie de 7 a 10 casos por 100.000 habitantes/ano nas regiões mais industrializadas, com taxas menores em regiões menos desenvolvidas. Trata-se de tumor mais frequente em homens, sendo mais prevalente entre os 50 e 70 anos de idade.

O CCR pode apresentar incidência do tipo esporádica em até 95% dos casos ou estar associado a síndromes familiares de CCR (doença de Von-Hippel-Lindau). Os principais fatores de risco descritos para o desenvolvimento de CCR são história familiar, tabagismo, obesidade, hipertensão arterial, índice de massa corpórea elevado, uso de diuréticos e medicações anti-hipertensivas, esclerose tuberosa e insuficiência renal crônica em hemodiálise.

O rim pode ser considerado um órgão endócrino pela produção de eritropoetina (EPO). A principal função dessa citocina é o controle da proliferação celular e a diferenciação dos eritrócitos. Na prática clínica, manifestações como policitemia ou anemia estão associadas à grande parte dos tumores, muitas vezes, constituindo as síndromes paraneoplásicas. A maioria dos CCR é originária dos túbulos contorcidos proximais, local em que a maioria dos autores descreve como o sítio de produção desse hormônio. Portanto, entender o papel da EPO nessas neoplasias se constitui um tema importante.

Durante a embriogênese a EPO é produzida pelo fígado, mas após o nascimento a sua produção é realizada pelas células endoteliais peritubulares do córtex renal.

Notadamente, a anemia é uma complicação comum de muitos tumores com impacto negativo na qualidade de vida. Cerca de 35% dos pacientes com câncer renal se apresentam com anemia ao diagnóstico e somente 5% com policitemia. Está bem documentado que a anemia e a hipóxia tecidual influenciam de forma negativa a qualidade de vida dos pacientes portadores de câncer, bem como a resposta ao tratamento. Acredita-se que a presença de anemia em diversos tumores aumenta o risco de morte pela doença em até 65% e pode alterar, significativamente, a resposta à quimioterapia e radioterapia. Dessa forma, o controle da anemia e da hipoxemia tecidual são importantes para melhorar a qualidade de vida e a sobrevida dos pacientes, potencializando a resposta ao tratamento complementar.

Recentemente, a EPO e seu receptor (EPO-R) foram localizados em inúmeros tecidos não hematopoiéticos como fígado, útero, sistema nervoso central, células endoteliais e diversos tumores sólidos malignos. A maioria dos tumores renais é derivada de células dos túbulos proximais e expressam receptores funcionantes de EPO. O efeito sinalizador da EPO é fortemente reconhecido como um mecanismo relevante na biologia do tumor. No entanto, o significado prognóstico da expressão de EPO e EPO-R no câncer renal e seu o efeito no crescimento tumoral e angiogênese ainda é incerto.

Os autores desse estudo propõem investigar a expressão imunohistoquímica da EPO e EPO-R nos diversos tipos histológicos de CCR, nos tecidos renais não neoplásicos e avaliar o valor prognóstico desse marcador com maior casuística e caráter multicêntrico internacional.

Objetivos: Estudar a expressão de EPO e EPO-R através de imuno-histoquímica no tumor primário de pacientes portadores de CCR submetidos à nefrectomia nos diversos tipos histológicos. Estudar a expressão da EPO e EPO-R no tumor primário e comparar com a expressão de EPO e EPO-R no tecido renal não neoplásico. Analisar o impacto dos níveis de expressão da EPO e EPO-R nas taxas de sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD). Correlacionar a expressão de EPO e EPO-R com diversas variáveis demográficas, clínicas e anatomopatológicas.

Desenho do estudo: Inicialmente será estudado o banco de dados de portadores de CCR tratados por nefrectomia no Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital AC Camargo entre 1990 e 2008, constituídos por 140 casos já disponíveis em lâminas de tissue microarray (TMA) utilizados na dissertação de mestrado de Walter da Costa (2011). Outros 52 casos, desse mesmo período e local, serão revisados e preparados em TMA. A amostra final será contemplada com cerca de 80 casos gentilmente cedidos pelo Dr. Diego Abreu Clavijo, provenientes do Serviço de Urologia do Hospital Pasteur em Montevideo, Uruguai, como participante do estudo em caráter multicêntrico. A partir dos Serviços de Arquivo Médico e Estatístico (SAME), todos os prontuários serão revisados. Os dados clínicos e epidemiológicos serão coletados.

Para a obtenção de dados patológicos, serão revisadas as lâminas por um único patologista. Todos os casos serão reclassificados de modo uniforme e serão selecionadas as áreas tumorais mais representativas de cada caso. A partir daí, serão resgatados os blocos de parafina correspondentes para confecção do tissue microarray (TMA). Todas as variáveis serão transcritas para um banco de dados específico.

As variáveis consideradas serão: idade, sexo, cor, estado geral pela classificação de Karnofsky, sintomatologia, tempo de evolução, lateralidade de lesão, níveis de hemoglobina pré e pós-operatórios, tipo de cirurgia, data da cirurgia, complicações pré-operatórias precoces e tardias, estadiamento pelo TNM AJCC/UICC 2002, graduação de Furhman, tamanho da lesão em centímetros, topografia, tipo histológico pelo Consenso de 1997, arranjo arquitetural tissular, invasão de órgãos adjacentes, multifocalidade, invasão venosa microscópica, acometimento linfonodal, presença de trombos venosos microscópicos, evolução pós-operatória, tempo de seguimento presença de metástases e

data da detecção, tratamento das metástases, situação clínica ao final do estudo, realização de transfusão, além das análises da expressão de EPO e EPO-R.

Métodos: Para a realização das reações imuno-histoquímicas (técnica da streptavidina biotina peroxidase) será empregado o método de Tissue microarray (TMA). O TMA permite o estudo de um grande número de casos, com economia de reagentes, material de bancada e de material biológico arquivado em parafina, além de submeter todos os casos rigorosamente às mesmas condições técnicas de realização das reações. Os cortes serão montados em lâminas de vidro e secados por 30 min a 37°C. A seguir será realizada a desparafinação utilizando xilol e hidratação através de uma série de álcoois graduados.

Atividade da peroxidase endógena será bloqueada pela incubação e um banho de metanol contendo peróxido de hidrogênio 3% por 20 min, seguida de lavagem em água destilada. Todas as lâminas serão inicialmente submetidas ao calor induzida pela recuperação do epitopo usando tampão citrato (pH 9,0). Depois disso, os anticorpos primários serão aplicados e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. Os testes preliminares serão realizados no laboratório para identificar a melhor concentração de cada anticorpo e para escolher os controles positivos e negativos utilizando os dados de diluição fornecidos pelo fabricante como o ponto de partida. Depois de lavar o anticorpo primário com tampão fosfato (PBS), as lâminas serão incubadas com o sistema de visualização polimérico de biotina, DAKO™, por 30 minutos. Em seguida será utilizada solução DAB por 5 minutos em cada lâmina e depois removido por lavagem com água destilada. Todas as reações serão automatizadas no autostainer Ultra 48, DAKO, nas mesmas condições ambientais.

Critérios de inclusão/exclusão: Critérios de Inclusão: CCR comprovado histologicamente. Ausência de tratamentos neoadjuvantes à cirurgia. Tratamento cirúrgico exclusivo. Ausência de comorbidades que reduzam a expectativa de vida a menos de seis meses.

Critérios de Exclusão: Pacientes submetidos a outros tratamentos para o CCR além da cirurgia ou com comorbidades que possam comprometer a sobrevivência. Pacientes com sarcomas renais, neoplasias renais não corticais ou com tumor de Wilms. Prontuários com dados incompletos ou faltantes. Material arquivado em parafina em más condições para a elaboração de novos cortes para imunohistoquímica. Pacientes com tempo de seguimento inferior a seis 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.

Local de realização

Trata-se de um projeto nacional e multicêntrico, com cooperação estrangeira. Além do Brasil, o Uruguai (Hospital Pasteur/Montevidéu) participará do estudo. Ao todo se estima que serão envolvidos 272 sujeitos de pesquisa, sendo 192 recrutados no Brasil, todos no centro em tela.

Apresentação do protocolo

Os seguintes documentos foram apresentados no CD-ROM do protocolo em tela: Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, Projeto de Pesquisa datado de 20 de maio de 2011, Termo de Compromisso do Pesquisador com resoluções do Conselho Nacional de Saúde, Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido, Declaração sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos dados e Propriedade das Informações Geradas, Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas, Declaração de infraestrutura e instalações, Orçamento Financeiro detalhado, Lista de centros

Cont. Parecer CONEP nº. 548/2011

participantes da pesquisa, Declaração sobre aprovação por Comitê de Ética no país de origem, Declarações de Ciência e Comprometimento, Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Urologia do Hospital Pasteur, Montevideo – Uruguai, Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica, Declaração de Ciência do Núcleo de Urologia, Currículos dos Pesquisadores, Identificação dos Currículos dos Pesquisadores na Plataforma Lattes Parecer de Aprovação referente Reunião de 14/06/2011, Carta de Aprovação do projeto pelo CEP em reunião de 14/06/2011, Parecer Consubstanciado do CEP referente Aprovação do Projeto em reunião de 14/06/2011.

Comentários/Considerações

1. Trata-se de uma pesquisa acadêmica, que segundo o autor tem caráter retrospectivo - levantamento de dados junto a prontuários ou banco de materiais biológicos - em que solicita dispensa do TCLE ao CEP. O pesquisador apresenta Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido que segue com aprovação do referido CEP, em que compromete-se em: *"preservar a privacidade dos sujeitos de pesquisa cujos dados serão coletados; que as informações serão utilizadas única e exclusivamente para a execução do projeto em questão; que as informações somente serão divulgadas de forma anônima, não sendo usadas iniciais ou quaisquer outras indicações que possam identificar o sujeito de pesquisa"*.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Brasília, 30 de agosto de 2011.


Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS