

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE BETA
CATENINA, E-CADERINA E N-CADERINA EM
CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS
METASTÁTICO**

ALINE FUSCO FARES

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

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Isabela Werneck da Cunha

São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Fares, Aline Fusco

Análise da expressão de beta catenina, e-caderina e n-caderina em carcinoma de células renais metastático / Aline Fusco Fares – São Paulo, 2018.

84p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Dra. Isabela Werneck da Cunha

Descritores: 1. Neoplasias Renais/Kidney Neoplasms. 2. Metástase Neoplásica/Neoplasm Metastasis. 3. Caderinas/Cadherins. 4. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 5. Análise Serial de Tecidos/ Tissue Array Analysis

DEDICATORIA

Aos queridos e amados pais, Jorge e Gislaine, meus grandes exemplos, que iluminam todos os meus passos e são a base e o corpo da minha trajetória.

A Larissa, minha irmã de corpo e alma, pelo companheirismo e amor imensuráveis.

Aos meus avós, Alli, David (in memorian), Neid (in memorian), Mathilde e Edisan, pelo exemplo de esforço e trabalho árduos, que sempre me foram inspiração.

A Daniel, minha melhor companhia e amor da minha vida. Pela paciência e pelo sorriso nos momentos difíceis. Pelo incentivo, apoio e amor incondicionais.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Isabela Werneck da Cunha, minha orientadora e principal incentivadora do meu trabalho, pelo apoio, incentivo, paciência e ensinamentos. Grande médica e pesquisadora, que sempre terei como modelo a ser seguido.

Ao Dr. Walter Henriques da Costa, pelo apoio e incentivo de sempre. Médico e ser humano exemplar que vou levar sempre como exemplo.

A Dra. Maria Nirvana Formiga, pelo apoio durante a minha formação como oncologista clínica e pelo incentivo e orientações para o trabalho de conclusão de residência.

A todos os meus mestres oncologistas clínicos do A.C.Camargo Cancer Center, pela dedicação, competência e ensinamentos durante a minha formação e pelo contínuo incentivo desde então.

A equipe de Urologia do A.C.Camargo Cancer Center, pois foram fundamentais incentivadores no meu encontro com a pesquisa acadêmica.

A equipe de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center, pela receptividade, apoio e paciência, durante a execução deste estudo.

Ao Vinicius Calsavara, estatístico responsável por este estudo, pela competência, profissionalismo e brilhantismo.

À Sra. Suely Francisco, bibliotecária do A.C.Camargo Cancer Center, pelo apoio e atenção durante o decorrer de todo o processo de levantamento bibliográfico e revisão deste estudo.

Aos meus amigos Dr. Augusto Saito, Dra. Caroline Nadai, Dr. Daniel Garcia, Dr. Daniel Brito, Dra. Daniela Lacerda, Dra. Eliza Ricardo, Dr. Leonardo Boente, Dr. Marcos Camandaroba, Dr. Ronaldo Souza, Dra. Sheila Ferreira,

Dra. Talita Gonzaga, Dra. Taynan Ribeiro e Dra. Thais Brilhante, pela amizade e companheirismo que me acompanham desde o início da residência médica no A.C.Camargo Cancer Center.

A instituição Faculdade de Medicina de Catanduva, pela minha formação e possibilidade de aprendizado inestimável proporcionada pelos seus professores e, principalmente, seus pacientes.

A instituição Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pelos meus primeiros passos na pesquisa acadêmica e pela minha formação de medicina intensiva.

Ao Hospital de Base de São José do Rio Preto, pelas portas abertas e pelo incentivo ao meu trabalho como oncologista clínica e tutora dos residentes, talvez a maior experiência profissional até hoje vivida por mim.

A Equipe de Oncologia Clínica do Hospital de Base de São José do Rio Preto, por acreditarem em mim e pelo estímulo positivo na busca por novos desafios.

Aos residentes de oncologia clínica do Hospital de Base de São José do Rio Preto, por me acolherem como professora e amiga, por me permitirem passar a minha pequena bagagem e me transmitirem muito mais, possibilitando que essa relação tenha sido a maior experiência profissional até hoje vivida por mim.

As minhas futuras mentoras, Dra. Natasha Leighl e Dra. Frances Shepherd, por fazerem meu sonho profissional se tornar realidade.

Às Sras. Ana Maria Kuninari e Karla de Barros da Pós- Graduação do Hospital A.C.Camargo pela ajuda e orientação.

RESUMO

Fares AF. **Análise da expressão de beta catenina, E-caderina e N-caderina em carcinoma de células renais metastático**. São Paulo; 2018. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: Apesar dos crescentes avanços em torno das vias de carcinogênese e mecanismos tumorais e de metástases, ainda se desconhecem biomarcadores moleculares que guiem o prognóstico e a conduta terapêutica no CCRm. O objetivo desse estudo foi avaliar a expressão imunohistoquímica na metástase de CCRm de proteínas relacionadas a via de carcinogênese da transição epitélio-mesênquima.

Materiais e métodos: Dos 129 pacientes com CCRm tratados no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2007 a março de 2016 que tiveram o tecido metastático analisado, coletamos dados epidemiológicos, clínicos e patológico. Foram avaliados os graus de expressão imunohistoquímica dos marcadores N-caderina, E-caderina e Beta-catenina, utilizando-se do método de tissue microarray. **Resultados:** No modelo de Cox simples, observamos positividade da N-caderina e da beta-catenina nuclear, estando relacionadas tanto com SG ($p=0.01$, $p=0.004$, respectivamente) quanto com SLP ($p=0.001$, $p=0.018$, respectivamente). Com relação ao modelo de Cox múltiplo, observamos positividade da beta-catenina nuclear (RR = 0.40, IC 95% 0.18 – 0.87) e da Classificação do IMDC (RR = 0.18, IC 95% 0.043 – 0.74) para SG enquanto observamos apenas positividade da Classificação IMDC para SLP (RR = 0.12, IC: 0.02 – 0.53, $p = 0.005$). Realizado análise de Kaplan Meier estratificada criando-se a variável N-caderina positiva / Beta-catenina positiva, onde notamos que se ambos os marcadores positivos, a SG mediana não foi atingida, enquanto que se ambos negativos, SG mediana era de 43.33 meses ($p = 0.004$, IC 20.7 – 62.8). Referente a SLP, temos que se ambos os marcadores positivos, SLPm foi 125.5 enquanto se ambos negativos, foi 51.9m ($p = 0.004$ IC 18.9

– 45.04). **Conclusão:** corroborando a teoria da necessidade de transição mesênquima-epitélio na metástase para que a colonização do novo sítio seja eficaz, observamos SG e SLP superior nos pacientes com fenótipo mesenquimal na metástase.

Descritores: Neoplasias Renais. Metástase Neoplásica. Caderinas. Imuno-Histoquímica. Análise Serial de Tecidos.

SUMMARY

Fares AF. [Evaluation of Beta-catenin, E-cadherin and N-cadherin in metastatic renal cell carcinoma]. São Paulo; 2018. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Background: Despite oncologic community effort towards metastasis pathways and carcinogenesis studying, a lot is yet unknown regarding metastatic renal cell carcinoma (mCCR) prognostic and predictive biomarkers. We aimed to evaluate immunohistochemical staining of mCCR metastatic tissue **Materials and Methods:** A hundred and twenty nine patients with mCCR treated at A.C.Camargo Cancer Center between January 2007 and March 2016 had their clinical and pathological data retrospectively collected. A Tissue Microarray (TMA) was constructed and evaluation of E-cadherin, N-cadherin and Beta-catenin was performed. **Results:** In a simple Cox analysis, N-cadherin and nuclear-Beta-catenin were prognostic for overall survival (OS) ($p=0.01$, $p=0.001$, respectively) and progression free survival (PFS) ($p=0.004$, $p=0.018$). Regarding multiple Cox analysis, Nuclear-beta-catenin (RR = 0.40, IC 95% 0.18 – 0.87) and IMDC Prognostic Classification (RR = 0.18, IC 95% 0.043 – 0.74) were positive for OS, while for PFS, only IMDC Prognostic Classification was positive (RR = 0.12, IC: 0.02 – 0.53, $p = 0.005$). In addition, we performed a stratified Kaplan Meier survival analysis, creating a new variable with N-cadherin positive / Nuclear-beta-catenin positive. When this variable was positive, OS was non-reached, while when negative, OS was 43.33 m ($p 0.004$, CI 20.7 – 62.8); when both were positive, PFS was 125.5m and were negative it was 51.9m ($p = 0.004$ CI 18.9 – 45.04). **Conclusion:** we found that patients with mCCR and mesenchymal phenotype in metastatic tissue have longer OS and PFS, favoring mesenchymal-epithelial-transition theory.

Key-words: Kidney Neoplasms. Neoplasm Metastasis. Cadherins. Immunohistochemistry. Tissue Array Analysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Inativação do VHL no CCR e sua implicação na terapia alvo	5
Figura 2	Via de sinalização WNT/B-catenina.....	16
Figura 3	Vias de sinalização da Transição Epitélio-Mesênquima.....	19
Figura 4	Eventos celulares durante a Transição Epitélio-Mesênquima.....	22
Figura 5	Arvore filogenética do carcinoma de células renais	24
Figura 6	Lâminas da imunohistoquímica da N-caderina	41
Figura 7	Lâminas da imunohistoquímica da E-caderina	42
Figura 8	Lâminas da imunohistoquímica de beta-catenina	48
Figura 9	Sobrevida global estratificada pela Classificação de risco IMDC ..	51
Figura 10	Curvas de sobrevida global de acordo com a relação neutrófilo linfócito, dicotomizada no ponto de corte estabelecido 4.09	51

Figura 11 Curvas de sobrevida global de acordo com a realização ou não de metastasectomia.....	52
Figura 12 Sobrevida global dos pacientes estratificada pela marcação mais alta da N-caderina.....	53
Figura 13 Sobrevida global de acordo com a categorização da N-caderina no seu ponto de corte.....	54
Figura 14 Sobrevida global de acordo com a categorização da Beta-catenina nuclear no seu ponto de corte	54
Figura 15 Sobrevida livre de progressão dos pacientes estratificada pela marcação mais alta da N-caderina.....	55
Figura 16 Sobrevida livre de progressão de acordo com a categorização da N-caderina no seu ponto de corte.....	55
Figura 17 Sobrevida livre de progressão de acordo com a categorização da Beta-catenina nuclear em seu ponto de corte	56
Figura 18 Análise de sobrevida dos pacientes com N-caderina negativa estratificada pela beta-catenina nuclear.....	59
Figura 19 Análise de sobrevida dos pacientes com N-caderina forte pela beta-catenina nuclear	60

Figura 20 Análise da sobrevida global se Beta-catenina positiva e N caderina positiva versus Beta-catenina negativa e N-caderina negativa	61
Figura 21 Análise da sobrevida livre de progressão se Beta-catenina positiva e N caderina positiva versus Beta-catenina negativa e N-caderina negativa.....	61
Figura 22 Plasticidade celular na cascata de metástase: processo de transição epitélio-mesênquima e transição mesênquima-epitélio..	66
Figura 23 Mudanças fenotípicas na célula durante o processo de metástase.....	67

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Lista de anticorpos primários utilizados com respectivos clones, títulos, nomes de fabricantes e códigos.....	31
Tabela 1	Variáveis epidemiológicas de 129 pacientes portadores de mCCR - A.C.Camargo Cancer Center	37
Tabela 2	Tipos de tratamentos realizados pelos 129 pacientes com mCCR - A.C.Camargo Cancer Center	39
Tabela 3	Variáveis clínicas de interesse correlacionadas com as caderinas de 129 pacientes do A.C.Camargo Cancer Center	43
Tabela 4	Variáveis clínicas de interesse correlacionadas com a beta-catenina de membrana e citoplasmática de 129 pacientes do A.C.Camargo Cancer Center.....	46
Tabela 5	Variáveis clínicas de interesse correlacionadas com a beta-catenina nuclear de 129 pacientes do A.C.Camargo Cancer Center	47
Tabela 6	Modelo de risco de Cox simples das variáveis clínico-laboratoriais com SG e SLP.....	50

Tabela 7	Modelo de risco de Cox simples das variáveis moleculares e SG	52
Tabela 8	Variáveis escolhidas para análise no modelo Cox múltiplo e seus respectivos valores p na análise de Cox simples	58
Tabela 9	Análise do modelo Cox múltiplo referente a sobrevida global	59

LISTA DE ABREVIações

AJCC	American Joint Committee Cancer
bHLH	basic helix-loop-helix
ccA	carcinoma de células claras tipo A
ccB	carcinoma de células claras tipo B
CCR	Carcinoma de células renais
CCRm	Carcinoma de células renais metastático
CTCs	Células tumorais circulantes
CTLA-4	antígeno 4 do linfócito T citotóxico
DTCs	disseminated tumor cells
E-caderina	epitelial-caderina
EGFR	epithelial growth fator receptor
FAC	fibroblastos associados ao câncer
FOX	Forkhead box
GATA	Erythroid transcription factor
Glut1	Glucose transporter one
HER2	human epithelial receptor 2
HIF	fator indutor de hipóxia
HIT	heterogeneidade intratumoral
HR	hazard ratio
IHQ	imunohistoquímica
IL	interleucina
IMDC	International
ISUP	International Society of Urologic Pathologists
ITK	inibidores tirosina quinase
KPS	Karnofsky performance scale
MAC	macrófagos associados ao câncer
miRNA	micro-RNA
mRNA	Messenger RNA
MSKCC	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center

mTOR	Mamalian Target of Rapamicin
N-caderina	neural-caderina
NCAM	molécula de adesão neural celular
PBRM1	Protein polybromo-1
PCR	polymerase chain reaction
PD-1	programmed death one
PDGF	fatores de crescimento derivado de plaquetas
PD-L1	programmed death one ligant
PI3K	phosphatidilinositol 3 kinase
RNL	Relação neutrófilo-linfócito
RT-PCR	Real time reverse transcriptase polymerase chain reaction
SCE	sobrevida câncer específica
SG	sobrevida global
SLD	sobrevida livre de doença
SLP	sobrevida livre de progressão
SLR	sobrevida livre de recorrência
TEM	Transição epitélio-mesênquima
TGF	transforming growth factor
TMA	tissue microarray
TME	Transição mesênquima-epitélio
TNF	tumor necrosis factor
TR	taxa de resposta
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	receptor do fator de crescimento endotelial vascular
VHL	Von Hippel Lindau
ZEB	Zinc finger E-box-binding

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia e História	1
1.2	Terapia sistêmica	3
1.3	Biomarcadores	7
1.3.1	Biomarcadores clínicos em CCRm.....	9
1.3.2	Biomarcadores moleculares em CCRm	11
1.3.3	Biomarcadores moleculares e vias de carcinogênese que serão estudadas	15
1.3.3.1	Beta-catenina e via WNT	15
1.3.3.2	Transição epitélio-mesênquima e caderinas	17
1.3.4	Heterogeneidade intertumoral e intratumoral no CCR.....	23
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo Primário	27
2.2	Objetivo Secundário	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Desenho do Estudo e Casuística	28
3.2	Elegibilidade	29
3.3	Construção do Tissue Microarray.....	30
3.4	Imunohistoquímica	31
3.5	Pontuação da Imunohistoquímica	32
3.6	Análise Estatística	34
4	RESULTADOS	36
4.1	Pacientes.....	36
4.2	Tratamento da doença metastática	38
4.3	Avaliação imunohistoquímica das caderinas.....	40
4.4	Avaliação imunohistoquímica das beta-cateninas	44

4.5	Análise de Sobrevida.....	48
4.5.1	Modelo de Cox simples	56
4.5.2	Modelo de Cox múltiplo	57
4.5.3	Análise estratificada Kaplan-Meier	59
5	DISCUSSÃO	62
6	CONCLUSÃO	75
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

ANEXOS

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

Anexo 2 Escala de performance de Karnofsky

Anexo 3 Classificação TNM da “American Joint Committee on
Cancer’s AJCC Cancer Staging”

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

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

Anexo 5 Graduação histológica de Fuhrman

Anexo 6 Classificação IMDC

APÊNDICE

Apêndice 1 Ficha de coleta de dados

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA E HISTÓRIA

O carcinoma de células claras renal (CCR) ocupa o décimo terceiro lugar em frequência no mundo e representa cerca de 3,7% do total das neoplasias diagnosticadas nos Estados Unidos (FERLAY et al. 2010; NOONE et al. 2018). Cerca de 20 a 30% dos pacientes já têm o diagnóstico como doença metastática e tem uma sobrevida baixa, de cerca de 11,6% em 5 anos (NOONE et al. 2018).

Os fatores de risco mais comuns são hipertensão arterial sistêmica, tabagismo e obesidade. Outras condições clínicas associadas com CCR são: insuficiência renal crônica, hemodiálise, transplante renal, doenças císticas renais e possivelmente diabetes mellitus (MCLAUGHLIN et al. 2006). Hábitos de vida como consumo de carne vermelha, também parecem ter alguma influência no aparecimento de CCR. A realização de atividade física pode reduzir em até 9% o risco de CCR e o consumo moderado (≥ 11 g/dia) de álcool também parece reduzir as taxas de CCR. Fatores genéticos também contribuem para o aumento de incidência de CCR, como na Síndrome de von Hippel Lindau, síndrome de Birt-Hogg-Dubbé e Síndrome de carcinoma renal papilífero, entre outras (GNARRA et al. 1994; HAAS et al. 2014). Os casos esporádicos representam até 95% do total enquanto que até 5% estão relacionados a CCR hereditários e familiares.

Historicamente, a quimioterapia nunca foi eficaz no CCR, e menos de 25% dos pacientes respondem ao tratamento com interleucinas (MCDERMOTT et al. 2005). A escassez de tratamento sistêmico efetivo disponível e a descoberta da íntima relação de fatores angiogênicos e CCR, motivaram estudos no final dos anos 90 e início dos anos 2000 com terapias-alvo, tendo como um de seus protótipos o sunitinibe, uma molécula inibidora de múltiplas quinases, em especial as relacionadas aos receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), do fator de crescimento de fibroblastos e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (RINI 2007). Em 2007 tivemos a divulgação de um dos primeiros estudos fase III, multicêntrico e randomizado, coordenado por MOTZER et al. que estabeleceu a superioridade do sunitinibe sobre o interferon alfa, terapia padrão da época (CHAND et al. 2005; MOTZER et al. 2009). Dessa forma, os inibidores de tirosina quinase tornaram-se as medicações padrão-ouro para o tratamento de primeira-linha de CCRm.

Com o advento das terapias- alvo, a sobrevida global mediana dos pacientes com câncer renal metastático aumentou consideravelmente, chegando a 24-26 meses (71,8% de sobrevida em 5 anos) (NOONE et al. 2018). Apesar disso, a duração da resposta é bastante heterogênea e não tão duradoura, sendo a sobrevida livre de progressão mediana cerca de 11 meses na primeira linha de terapia. Além disso, do total de pacientes que iniciam tratamento sistêmico, apenas cerca de 43% conseguem receber uma segunda linha de tratamento e 11% uma terceira linha, demonstrando a importância de se escolher o tratamento correto já na primeira linha

(ALIMOHAMED et al. 2014). Para isso, seria interessante o conhecimento de biomarcadores prognósticos e preditores de resposta a determinado tratamento-alvo, a exemplo de outras neoplasias sólidas, como a hiperexpressão de HER2 nas neoplasias de mama, ou a mutação do EGFR nas neoplasias de pulmão. Entretanto, até a presente data não dispomos de biomarcadores em carcinoma renal e por isso a indicação do tratamento sistêmico é baseada em escores clínicos de prognóstico.

1.2 TERAPIA SISTÊMICA

O sunitinibe é um inibidor multiquinase, cujos receptores tirosina-quinases inibidos incluem o VEGFR (1,2 e 3) e o PDGFR (alfa e beta). Inicialmente, foi aprovado para uso em segunda linha após progressão a terapia com citocinas (MOTZER et al. 2006). A seguir, em 2007, o estudo de MOTZER et al. (2007) fase III, randomizado, multicêntrico, que comparava sunitinibe com INF-alfa, terapia padrão na época, em uma população virgem de tratamento, demonstrou superioridade da terapia alvo, tanto no seu desfecho principal, que foi sobrevida livre de progressão (SLP) [sunitinibe 11 meses x INF-alfa 5 meses HR 0,42 (95% CI: 0.32-0.54; P<0.001)], quanto nos seus desfechos secundários como sobrevida global [sunitinibe 26.4 meses e INF-alfa 21.8 meses, HR 0.82 (95% CI, 0.67 to 1.001, p= 0,051)] e taxa de resposta [47% com sunitinibe comparado com 12% com INF-alfa (p <0,001)] (MOTZER et al. 2009). A partir de então, o sunitinibe passou a ser a

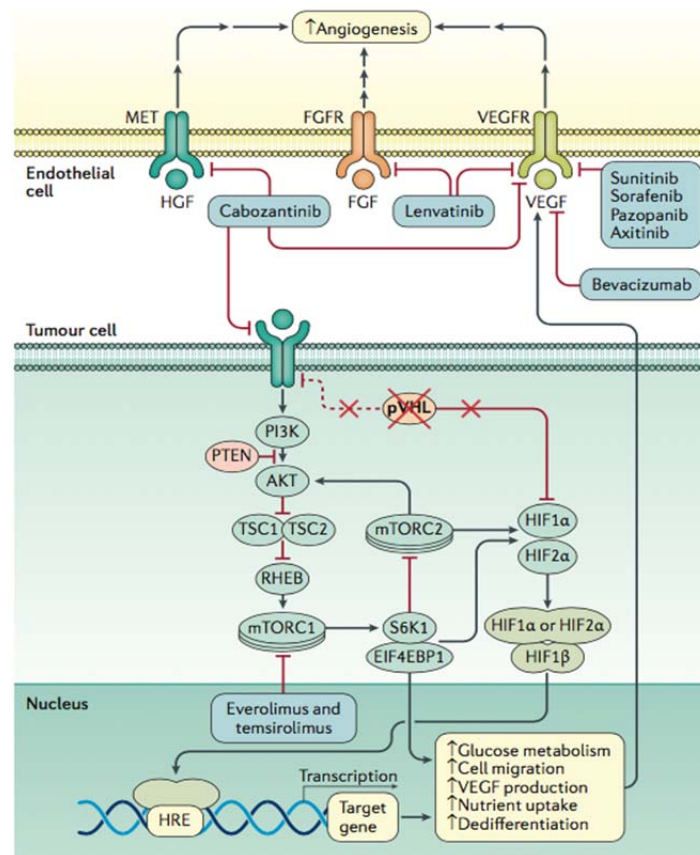
molécula padrão de tratamento em primeira linha para carcinoma renal metastático, independente do subtipo histológico.

O pazopanibe é um inibidor multiquinase, cujos receptores tirosina-quinases inibidos incluem VEGFR (1, 2 e 3), PDGFR (alfa e beta), além do c-kit. Inicialmente foi avaliado comparado a placebo, demonstrando aumento de SLP [pazopanibe 9.2 meses versus placebo 4.2 meses, HR 0.46 (95% CI, 0.34-0.62; P <.0001)] (STERNBERG et al. 2010). A seguir, foi comparado diretamente com sunitinibe, não mostrando diferenças significativas de SG e SLP, porém o perfil de toxicidade favoreceria o pazopanibe (MOTZER et al. 2013).

O bevacizumab é um anticorpo monoclonal que se liga ao VEGF, inibindo sua ligação com o VEGFR e assim inibindo a angiogênese. Existem dois estudos fase III que demonstram superioridade do INF-alfa + bevacizumabe versus INF-alfa isolado. Ambos demonstram maior SLP no braço de INF-alfa + bevacizumab e tendência a maior SG no mesmo grupo (RINI et al. 2008; RINI 2009; ESCUDIER et al. 2010).

O tencirolimus, composto inibidor do complexo C1 do mTOR, foi avaliado em um estudo fase III, randomizado, em pacientes de risco desfavorável baseado no escore de Motzer, com três braços: tencirolimus isolado, tencirolimus + INF-alfa e INF-alfa isolado. O estudo foi positivo para o seu desfecho principal, que era sobrevida global, [tencirolimus 10,9 meses versus INF-alfa 7,3 meses HR 0.73 (95% CI: 0.58-0.92; p = 0.008)]. Além disso, também foi positivo nos seus desfechos secundários, como SLP [5.5 vs 3.1 meses; HR: 0.66; p = 0.001], taxa de benefício clínico [32.1 vs 15.5%]

e duração de resposta [mediana de duração de resposta 11.1 meses no braço temsirolimus e 7.4 meses no braço IFN- α] (HUDES et al. 2007). A partir deste estudo, a indicação para pacientes de risco desfavorável em primeira linha de tratamento sistêmico, é de temsirolimus (LJUNGBERG et al. 2010).



Fonte: HIESH (2017)

Figura 1 - Inativação do VHL no CCR e sua implicação na terapia alvo. Inativação do VHL no CCR e sua implicação na terapia alvo. A perda do VHL é o evento genético mais frequente no CCR. A sua perda, livra a célula da regulação negativa no fator de indução de hipóxia (HIF), que por sua vez, quando aumentado no citoplasma, tem ação no núcleo, causando mudanças no metabolismo celular e levando a sobrevivência dessa célula. O conseqüente aumento da expressão de VEGF leva a angiogênese e carcinogênese.

Em meados de 2016 a imunoterapia deu seus primeiros passos em direção ao tratamento do carcinoma renal, com a comparação do nivolumab - um inibidor de check-point PD-1 - e everolimus em pacientes com carcinoma de células renais previamente expostos a uma ou duas linhas de terapia anti-VEGFR. Neste estudo fase III, houve um aumento da SG de 5,4 meses [nivolumab 25 meses versus everolimus 19,6 meses HR 0.73 (98.5% CI, 0.57-0.93; P=0.002)], demonstrando superioridade (MOTZER et al. 2015).

MOTZER et al. (2018) publicou em março o primeiro estudo fase 3 randomizado comparando imunoterapia com sunitinibe. Nesse estudo, os autores randomizaram os pacientes para receberem nivolumabe (anti-PD-1) e ipilimumabe (anti-CTLA-4) no braço experimental, contra sunitinibe no braço controle. O desfecho principal do estudo era comparar a SG dos grupos na população de risco alto ou intermediário conforme IMDC. O resultado foi favorável ao braço da imunoterapia, e aos 18 meses de tratamento, 75% dos pacientes do braço experimental estavam vivos, versus 60% do grupo controle. O grupo dos imunoterápicos ainda não atingiu a SG mediana, enquanto o grupo do sunitinibe teve SG mediana = 26 meses com HR de 0.63 (IC = 0.44-0.89). Referente a SLP, também houve benefício, com 11.6 meses para os imunoterápicos versus 8.4 meses para o sunitinibe. Quando o grupo de baixo risco foi adicionado (população por intenção de tratar, somando baixo, intermediário e alto risco), o benefício se manteve para a SG mediana (Não atingido x 32.9 meses) porém desapareceu para a SLP (12.4 m x 12.3 m). Esse estudo estratificou os pacientes quanto a

expressão de PD-L1, porém não era critério de inclusão do estudo e tanto os positivos quanto os negativos, apresentaram benefício dos imunoterápicos. Fica claro que a estratificação clínica pelo IMDC na realidade traduz doenças diferentes, provavelmente por biologia e mecanismos de carcinogênese diferentes.

1.3 BIOMARCADORES

Os biomarcadores podem variar desde marcadores clínicos (como pressão arterial sistêmica) até substâncias endógenas (como proteínas plasmáticas) ou biomarcadores biomoleculares que são específicas para um subtipo tumoral (como mutações). Além disso, eles podem ser biomarcadores prognósticos, referindo-se ao maior ou menor risco de morte relacionados a sua presença ou podem ser biomarcadores preditivos, referindo-se a maior ou menor resposta a certo medicamento quando presentes (LAIRD et al. 2015).

Idealmente, qualquer nova intervenção médica deve ser adotada apenas se houver evidência nível I e essa evidência deve ser produzida em um estudo randomizado e prospectivo. Entretanto, para o estudo de biomarcadores, essa qualidade de estudo se torna muito difícil e pouco prática, já que pode envolver não fazer uso de uma determinada terapia padrão, o que se tornaria antiético e também levaria um tempo demasiadamente longo para que pudesse ser realizada uma análise prospectiva do papel desses biomarcadores. Por isso, em 1996, a *American*

Society of Clinical Oncology Tumors Markers Guideline Committee recomendou cinco níveis de evidência (Levels of Evidence - LOE) para se determinar a validade clínica e a utilização de um biomarcador. Em 2009 essa classificação foi atualizada por SIMON et al. e ela leva em conta a categoria dos estudos que avaliam o biomarcador em questão. Assim, os estudos devem primeiramente ser categorizados em: Categoria A: estudo prospectivo e randomizado desenhado e com poder estatístico para a análise do biomarcador estudado. Categoria B: estudo prospectivo não primariamente desenhado para a análise do biomarcador estudado. Categoria C: estudo prospectivo, observacional, de registro de dados. Categoria D: estudo retrospectivo, observacional. Após isso, o nível de evidência do biomarcador pode ser estabelecido, levando-se em conta o número de estudos publicado em cada categoria. Nível I de evidência: pelo menos um estudo categoria A ou um ou mais estudos categoria B com resultados consistentes. Nível II: pelo menos um estudo categoria B ou dois ou mais categoria C com resultados consistentes. Nível III: pelo menos um estudo categoria C. Nível IV e V: estudos categoria D. A grande maioria dos estudos de biomarcadores se encaixa na categoria D: observacional e retrospectivo (SIMON et al. 2009), pela grande dificuldade na execução e randomização de pacientes baseado em biomarcadores.

1.3.1 Biomarcadores clínicos em CCRm

A observação e o estudo dos biomarcadores clínicos de CCRm levou a criação dos chamados escores prognósticos clínico-laboratoriais em carcinoma renal metastático. São esses escores que ditam a indicação do tratamento sistêmico até os dias de hoje (LJUNGBERG et al. 2010).

O primeiro escore desenvolvido foi o algoritmo do *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC score)*, desenvolvido na era do tratamento com citocinas por MOTZER et al. (1999). Este escore, publicado em 1999, observou que os pacientes com CCRm e portadores de anemia, hipercalcemia, KPS <80%, os não submetidos a nefrectomia e com DHL elevado tinham um pior prognóstico. Os pacientes eram então classificados como: risco favorável (0 fator prognóstico adverso), risco intermediário (1-2 fatores) e risco desfavorável ou alto risco (3 ou mais fatores prognósticos adversos), com curvas distintas de sobrevida global (MOTZER et al. 1999; MOTZER et al. 2002).

Após dez anos do primeiro escore publicado HENG et. al. (2009) reavaliou os critérios clínicos prognósticos, agora já na era da terapia alvo. Validou então seis variáveis que conferiam pior prognóstico: anemia, hipercalcemia, KPS <80%, tempo da nefrectomia para a metástase < 1 ano, neutrofilia e plaquetose e também classificou o risco em: risco favorável (0 fator prognóstico adverso), risco intermediário (1-2 fatores) e risco desfavorável ou alto risco (3 ou mais fatores prognósticos adversos), com curvas distintas de sobrevida global.

Assim, a indicação clínica do tipo de terapia alvo a ser utilizada na

primeira linha de tratamento sistêmico se faz através de escores clínicos. Conforme já descrito, existem cinco tipos de terapia alvo aprovadas pelo *U.S. Food & Drug Administration*-FDA em primeira linha, entretanto, pela falta de mecanismos de individualização do tratamento, suas indicações se sobrepõem. O sunitinibe, pazopanibe e INF-alfa + bevacizumabe são terapias alvo aprovadas para pacientes de risco favorável ou intermediário em primeira linha. Já o tencirolimus é o único aprovado especificamente para primeira linha de tratamento de pacientes com risco desfavorável (LJUNGBERG et al. 2010). Em 16 de abril de 2018, o FDA aprovou o combo de imunoterapia ipilimumabe e nivolumabe em primeira linha, que se mostrou superior em SG quando comparado ao padrão sunitinibe (MOTZER et al. 2018). A partir dessa data, a indicação em primeira linha para pacientes com risco intermediário e alto é de ipilimumab e nivolumabe concomitantes, nos Estados Unidos.

Além dos biomarcadores clínicos utilizados nos escores prognósticos, existem também biomarcadores clínicos preditores de terapias anti-VEGFR em CCRm. Por exemplo, a hipertensão arterial sistêmica ≥ 140 mmHg funciona como um biomarcador clínico preditivo para resposta a terapia alvo anti-VEGFR (BONO et al. 2011). Da mesma forma, o hipotireoidismo parece também ser biomarcador clínico preditivo para a terapia anti-VEGFR (BUDANOWAK et al. 2017).

1.3.2 Biomarcadores moleculares em CCRm

No CCR, a inativação do gene Von Hippel Lindau (VHL), com produção da proteína VHL alterada, é a alteração gênica mais frequentemente encontrada (GNARRA et al. 1994; The Cancer Genome Atlas Research Network TCGA 2013) e a sua perda completa por alterações genéticas (deleções, mutações, inserções e perda de 3p25) ou epigenéticas (metilações) constituem o primeiro evento oncogênico do carcinoma renal. A perda da proteína VHL leva ao aumento na concentração do fator indutor de hipóxia (HIF) (SEMENZA 2013; MASSON et al. 2014) por diminuir sua degradação via ubiquitinação, mesmo que haja um ambiente adequadamente oxigenado. Com isso, há ativação de genes VEGF, PDGF e Glut1, estimulando o crescimento do tumor por estímulo exacerbado à angiogênese, transporte de glicose e crescimento autócrino (BRATSLAVSKY et al. 2007).

Entretanto, a perda isolada de VHL não é suficiente para induzir CCR, como evidenciado pela observação de indivíduos com doença de VHL que ficam anos em latência e também observando ratos com perda de VHL induzida e que não desenvolvem CCR (KAPITSINOY et al. 2008; WEI e HSIEH 2015). Isso sugere que mecanismos adicionais genéticos ou epigenéticos devam ocorrer para que o CCR se desenvolva.

Para isso, foi realizada uma grande análise das mutações potencialmente envolvidas na carcinogênese do CCR, revelando várias outras mutações presentes no tecido tumoral primário: *PBRM1* (29-41%), *SETD2* (8-12%), *BAP1* (6-10%), *KDM5C* (4-7%) e *MTOR* (5-6%). De forma

bastante interessante, a PBRM1, SETD2 e BAP1, que são supressores tumorais, estão localizados no cromossomo 3p21. Isso indica que se houver perda do braço curto do cromossomo 3, tanto VHL como PBRM1, SETD2 e BAP1 serão perdidos, mostrando que a perda do 3p é um evento praticamente universal no CCR (PENA-LOPIS et al. 2012; HAKIMI et al. 2013; SATO et al. 2013) e o evento genético inicial.

Em 2014, DA COSTA et al. publicou a análise de PBRM1 como biomarcador prognóstico em CCR localizado, exclusivamente células claras. Cento e doze casos foram avaliados por meio de RT-PCR, confirmando que PRBM1 negativa tem impacto negativo na sobrevida por câncer específica e na sobrevida livre de doença (89.7% x 70.6% $p = 0.017$ e 87.3% x 66.7% $p = 0.048$, respectivamente). Outra publicação do mesmo grupo, agora analisando 441 casos com CCR EC I e II, demonstrou que a perda concomitante de PBRM1 e BAP1 tem impacto na sobrevida câncer específica (SCE) e na sobrevida livre de doença (SLD) (95.3% x 77.6% $p < 0.001$) em 10 anos (DA COSTA et al. 2018). Por outro lado, em 2017, KIM et al. fez a mesma análise de PRBM1 em 351 casos de CCR localizado, não confirmando importância prognóstica.

Pensando no ponto de vista preditivo, uma análise de biomarcadores genômicos foi publicada em 2016, avaliando os pacientes incluídos no estudo RECORD-3 (sunitinibe x everolimus em primeira linha) (MOTZER et al. 2014; KNOX et al. 2017). Os pacientes com mutação de BAP-1 que utilizaram sunitinib tiveram SLP de 8.1m, enquanto os que utilizaram everolimus tiveram 5.5m. Os com mutação de PBRM1 não apresentaram

melhor SLP com sunitinibe versus everolimus. Já os com mutação de KDM5C tiveram SLP muito mais longa com o uso de sunitinibe versus everolimus (20.6m x 9.8m) (HSIEH et al. 2017a, b).

Outro estudo, publicado em 2015, realizou análise genômica de um painel com 8 genes no tecido do tumor primário em pacientes com CCRm. Os pacientes foram classificados em grupos de bom e mau prognóstico, que conseguiu ter valor estatístico, confirmando então que esse painel é um biomarcador prognóstico. Além disso, eles avaliaram 48 pacientes com CCRm que estavam recebendo ITK e demonstraram que a avaliação prognóstica estava associada a melhor resposta radiológica ao ITK ($p = 0.0005$ e SLP prolongada ($p = 0.019$)) (CHOUDHURY et al. 2015; LAIRD et al. 2015).

Além desses, vários outros estudos, analisando principalmente a via de angiogênese ligada ao VEGF já foram publicados. Muitas das proteínas e genes que fazem parte dessa via já foram extensamente avaliadas. Uma revisão sistemática publicada por FUNAKOSHI et al. (2014) avaliou 50 artigos que analisavam biomarcadores preditivos e prognósticos em CCR e incluíram apenas artigos com análise de biomarcadores genômicos, proteômicos ou celulares relacionados a vias em que a terapia alvo anti-VEGF tem ação. Muitos marcadores sanguíneos ou do tecido tumoral primário foram analisados (por sequenciamento, PCR, IHQ, citometria de fluxo ou genotipagem), como por exemplo: gene VHL, VEGF-A, TNF-gama, Beta-catenina, HIF, IL-6, entre outros. Essa revisão sistemática chegou a

conclusão que atualmente, o biomarcador mais promissor para CCR é a IL-6.

Além de ter um papel na inflamação sistêmica, a IL-6 regula genes que regulam a proliferação celular, promovem angiogênese e suprimem a apoptose, através do STAT-3 (signal-transducer-and-activator-of-transcription-3) (AGGARWAL et al. 2006). Além disso, pacientes com níveis mais altos de IL-6 circulante já foram associados com pior prognóstico em pacientes que utilizam pazopanibe (TRAN et al. 2012). Por outro lado, níveis altos de IL-6 também foram associados com aumento de SLP em pacientes usando pazopanibe quando comparados ao placebo (NIXON et al. 2013). Apesar de o mecanismo exato pelo qual IL-6 tem papel preditivo e prognóstico seja desconhecido, esses achados sugerem que prognóstico adverso de IL-6 elevada pode ser atenuado pelo uso de terapia anti-VEGF. Apesar de vários estudos retrospectivos demonstrarem papel da IL-6, eles não cumprem a determinação Nível de Evidência 1 e por isso sua importância preditiva precisa ser validada de forma independente para ser adicionada a prática clínica.

Assim, apesar de anos de pesquisa e de inúmeros artigos pesquisando biomarcadores prognósticos e preditivos, nenhum biomarcador molecular cumpre as características necessárias para seja incorporados a prática clínica.

1.3.3 Biomarcadores moleculares e vias de carcinogênese que serão estudadas

1.3.3.1 B-catenina - via WNT

A via de sinalização WNT é um sistema antigo, que foi muito bem conservado durante a evolução das espécies. Ela tem um papel crucial no desenvolvimento embrionário de todas as espécies animais e na regeneração dos tecidos em animais adultos.

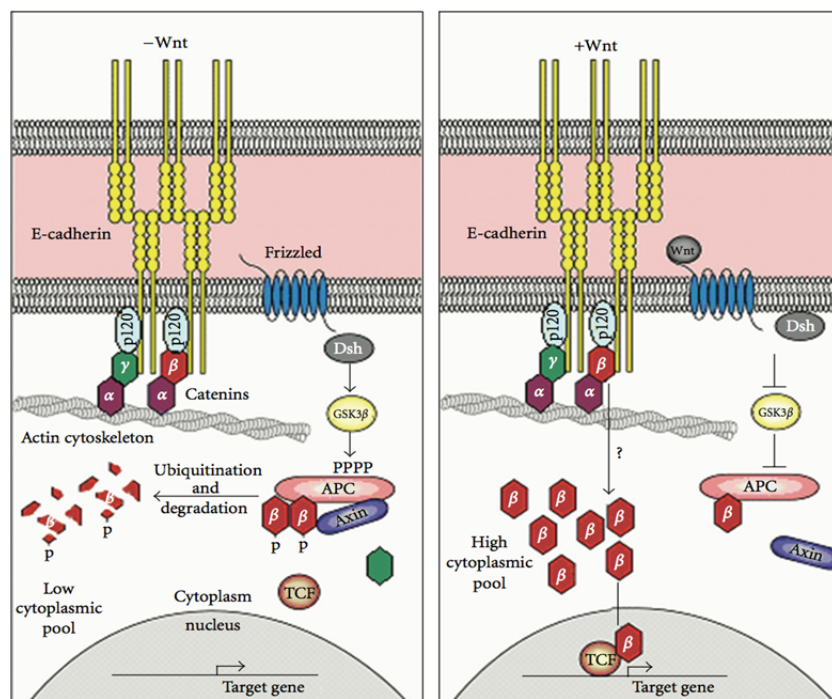
Desde o seu descobrimento, nos anos 80, a sinalização WNT é estudada como mediador da progressão do câncer. Primeiramente, ela foi identificada como um proto-oncogene presente no câncer de mama. Depois, foi identificada a correlação da via WNT com a transição epitélio-mesênquima (TEM), fenômeno importante para progressão do câncer e desenvolvimento de metástases.

A via WNT, junto as suas proteínas integrantes, como a Beta-catenina, têm sido cada vez mais estudada no CCR e sua ativação tem sido cada vez mais correlacionada ao maior grau tumoral, tamanho de tumor, invasão vascular e outros fatores prognósticos adversos (MACDONALD et al. 2009; KRABBE et al. 2014; ZHANG et al. 2017).

A Beta-catenina é uma glicoproteína que desempenha papel fundamental na transição epitélio-mesênquima e tem sua expressão celular dependente da ativação da via WNT. Ela se encontra em três principais locais na célula: na membrana, onde está ancorada a E-caderina, fazendo seu papel de adesão célula-célula; no citoplasma, onde tem a sua

concentração aumentada quando a via WNT está ativada e no núcleo (KRABBE et al. 2014).

Além disso, a Beta-catenina funciona como um fator muito importante na sinalização da via canônica do WNT. A desregulação da sinalização do complexo WNT/Beta-catenina resulta em um acúmulo anormal de Beta-catenina no citoplasma das células tumorais levando ao desenvolvimento de um complexo com múltiplos fatores de transcrição, que acaba levando a carcinogênese e progressão da doença (LAMOUILLE et al. 2014; NIETO et al. 2016).



Fonte: Adaptado de TIAN et al. (2011)

Figura 2 - Via de sinalização WNT/B-catenina. A) em uma situação onde a via WNT não está ativada, a beta-catenina citoplasmática é fosforilada e degradada pelo processo de degradação proteossômica. B) se a via WNT estiver ativada, ocorre a fosforilação da axina, impedindo a degradação da beta-catenina. Esta por sua vez se acumula no citoplasma e migra para o núcleo para promover transcrição de moléculas WNT ativadoras. Vê-se também que a beta-catenina fica ancorada na E-caderina de membrana ou no citoplasma ou no núcleo

A Beta-catenina também é membro do complexo caderina e está envolvida na adesão célula-a-célula dependente de canais de Ca^{2+} . A falha no complexo E-caderina/Beta-catenina ativa o mecanismo de metástase em uma série de malignidades (SU e SIMMEN 2009; TSENG et al. 2010; KANDOUZ et al. 2010; CHEN et al. 2016). Além disso, a Beta-catenina funciona como um fator muito importante na sinalização da via canônica do WNT. A desregulação da sinalização do complexo WNT/Beta-catenina resulta em um acúmulo anormal de Beta-catenina no citoplasma das células tumorais levando ao desenvolvimento de um complexo com múltiplos fatores de transcrição, que acaba levando a carcinogênese e progressão da doença.

Existe evidência de que a redução da expressão de E-caderina e o acúmulo de Beta-catenina citoplasmática estão associados a variáveis clínicas mais agressivas e com um comportamento biológico mais agressivo. Além disso, um estudo recente demonstrou que o complexo E-caderina negativa/Beta-catenina positiva está associado a pior prognóstico em termos de sobrevida global em carcinoma renal localizado (ZHANG et al. 2017).

Entretanto, o valor clínico prognóstico da sinalização da via WNT e da desregulação da Beta-catenina e E-caderina no CCRm não é conhecido.

1.3.3.2 Transição Epitélio-Mesênquima e Caderinas

A transição epitélio-mesênquima (TEM) é um processo em que a célula epitelial perde a sua polaridade e acessibilidade célula-célula e ganha poder de invasão e migração. Trata-se de um processo natural durante a

vida embriogênica, principalmente na fase de gastrulação e neurulação e também natural em processos de cicatrização.

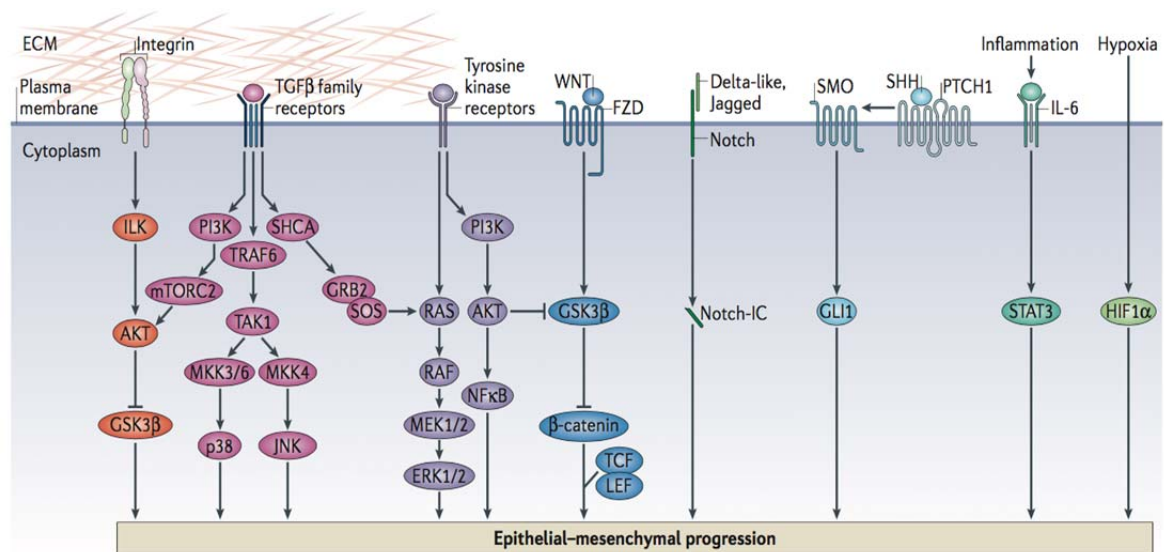
Existem três tipos de TEM: Tipo 1, que ocorre durante a vida embriogênica; tipo 2, que ocorre em cicatrizações e regeneração de tecidos; tipo 3, que faz parte da carcinogênese, progressão do câncer e com propriedades de células-tronco (LAMOUILLE et al. 2014).

✓ **Ativação da TEM**

De uma forma geral, a TEM é ativada e regulada por uma série de mecanismos (LAMOUILLE et al. 2014):

- Fatores de transcrição múltiplos: incluindo SNAIL, o fator de transcrição bHLH, ZEB, entre outros, que incluem fatores da família FOX e da família GATA
- Regulação a nível de RNA: desde splicing de mRNA até controle mediado por miRNA
- Proteínas da família TGF-beta: que inclui processos dependentes da proteína SMAD e processos não dependentes dessa proteína, como por exemplo através da via do PI3K
- Indução pelos receptores de tirosina-quinase: tanto o fator de crescimento endotelial, quanto o fator de crescimento endotelial relacionado ao Cripto 1 (TDGF1), o fator de crescimento plaquetário e o fator de crescimento endotelial vascular estão relacionados com a ativação da TEM

Durante o processo de carcinogênese, a TEM também pode se desencadear independentemente de qualquer outro estímulo, pela própria disfunção da E-caderina, que pode ter origem genética (mutações), epigenética, por silenciamento da transcrição ou por degradação proteossômica (BERX et al. 2009).



Fonte: Adaptado de LAMOUILLE et al. (2014)

Figura 3 - Vias de sinalização da TEM. As vias de sinalização podem cooperar entre si para induzir TEM completa. Além de promover ativação de TEM pela proteína SMAD, ele também pode ativar PI3K-AKT, ERK-MAPK, p38-MAPK e as vias do JUN-N terminal-kinase. Após fosforilação do domínio 2 da SRC, ela faz uma ligação com a via RAS-RAF-MEK-ERK, promovendo ativação dessa via também. Vários fatores de crescimento que atuam via RTK, incluindo fatores de crescimento endoteliais, fatores de crescimento plaquetários, VEGF, entre outros, também ativam a via do RAS-RAF-MEK-ERK, levando a TEM e carcinogênese. A via WNT ativada promove TEM impedindo a inibição da beta-catenina pela glicogênio-sintase-quinase. O acúmulo da beta-catenina no citoplasma é translocado ao núcleo, promovendo um programa de expressão genética que favorece TEM.

✓ **Eventos celulares que ocorrem após a ativação da TEM**

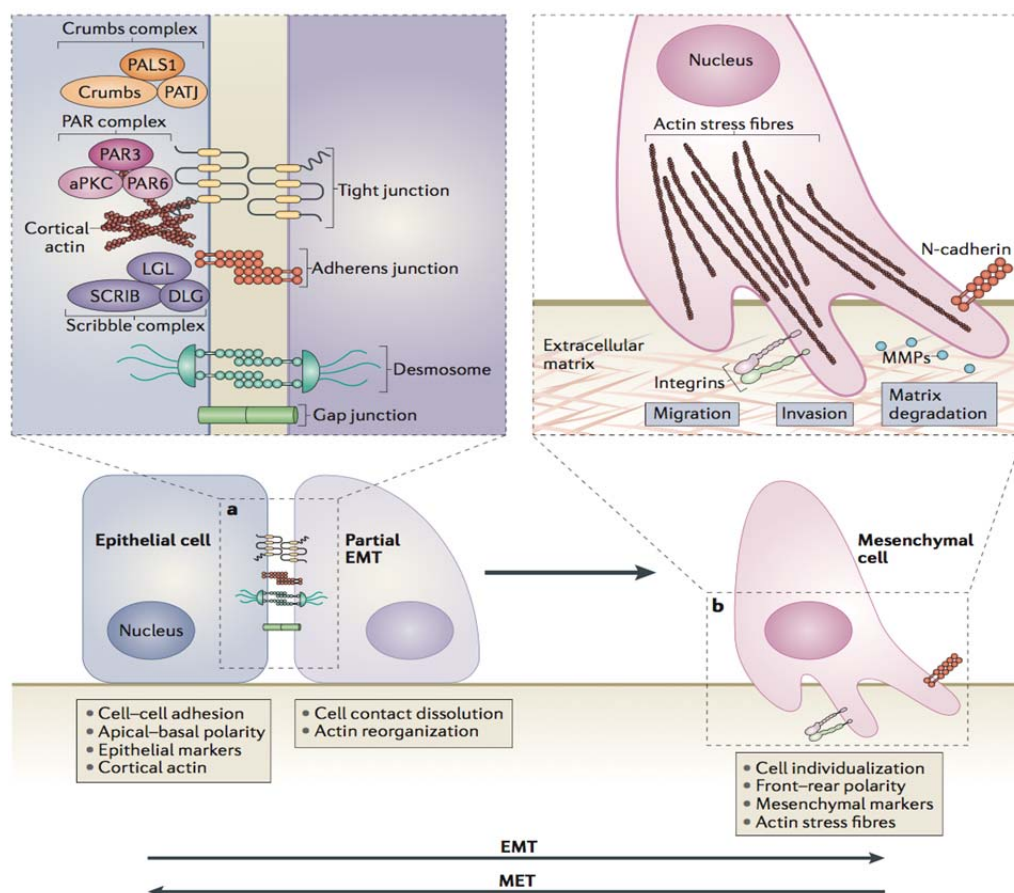
Após o rompimento da E-caderina na membrana celular, a beta-catenina não pode mais atuar na membrana pois perde a ancoragem e fica livre no citoplasma. Nesse momento, a Beta-catenina pode ser degradada ou pode ser protegida da degradação, quando a via WNT está ativada, atuando na transcrição e carcinogênese. Além da beta-catenina, a p120 catenina também se acumula no citoplasma, levando a transcrição de múltiplos fatores. O início do processo de TEM também afeta os desmossomos e a integridade das junções gap é comprometida pela redução dos níveis de conexina.

Após o início da TEM, a célula inicia um processo de reorganização do seu citoesqueleto cortical de actina para que ele promova o alongamento e a mobilidade em uma certa direção. Essa reorganização do citoesqueleto, em conjunto com a perda de polaridade celular, resulta em grandes mudanças no formato e alongamento das células. Todo esse processo, em conjunto com a polaridade em *front-rear* são essenciais para a TEM e permitem a migração e metástase direcional do tumor (LAMOUILLE et al. 2014).

Durante a TEM, a célula redireciona a sua expressão gênica para promover mudanças no citoesqueleto e tornar a célula aderente a outras células de origem mesenquimal. Entretanto, essa aderência é mais fraca do que a aderência entre as células epiteliais, facilitando a mobilidade dessas células.

A regulação negativa da E-caderina é um *hallmark* da TEM e reforça a desestabilização das junções de aderência. Essa diminuição da E-caderina é acompanhada por estímulo a caderina-neural-mesenquimal (N-caderina), resultando no processo chamado cadherin-switch e alterando a adesão celular. As interações celulares da N-caderina são mais fracas, promovendo uma maior mobilização, migração e invasão celular (WHEELLOCK et al. 2008; LAMOUILLE et al. 2014).

Outra molécula ativada nesse processo é a molécula de adesão neural celular (NCAM). Ela age ativando a família de receptores tirosina quinase SRC, estimulando a carcinogênese. (LAMOUILLE et al. 2014)



Fonte: Adaptado de LAMOUILLE et al. (2014)

Figura 4 - Eventos celulares durante a TEM. a) Os primeiros passos da TEM incluem o desaparecimento do contato célula-a-célula (incluindo junções tight, desmossomos, junções de intervalo e junções de aderência) e a perda de polaridade celular. A expressão de genes epiteliais é reprimida, enquanto a expressão de genes mesenquimais é estimulada. b) Após isso, a arquitetura da actina citoplasmática se reorganiza e a célula adquire motilidade e capacidade invasiva produzindo proteínas que são capazes de degradar a matriz extra-celular (MEC). A transição mesênquimo-epitelial (TME) possibilita a célula que sofreu TEM retornar ao seu estado original. Esse processo de TME acontece durante o desenvolvimento de estruturas que devem ser regeneradas e também pode ocorrer na metástase.

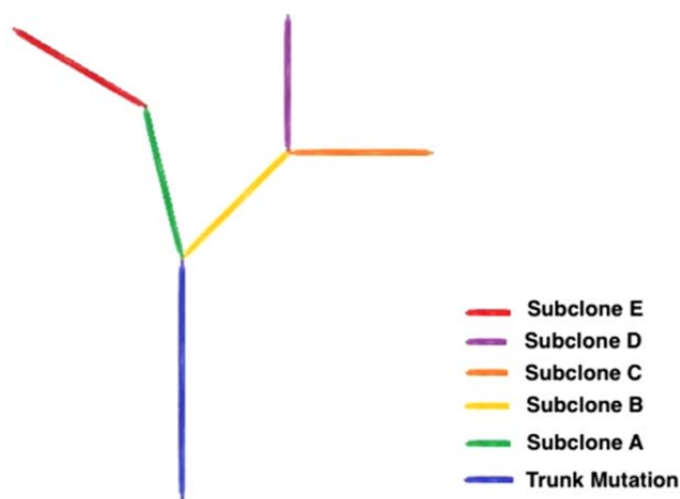
Existem estudos, recém-publicados, que correlacionam marcadores mesenquimais (Snail, vimentina, ZEB) a tumores primários maiores, mais heterogêneos, e possivelmente mais agressivos (ZALDUMBIDE et al. 2016).

1.3.4 Heterogeneidade intertumoral e intratumoral no CCR

A heterogeneidade intratumoral (HIT) pode ter consequências importantes na medicina personalizada que comumente é baseada em biópsias tumorais únicas para avaliação molecular de biomarcadores. A HIT em CCR localizado e CCRm tem se mostrado cada vez mais presente, tornando mais difícil a análise de biomarcadores moleculares prognósticos e preditivos.

GERLINGER et al. (2012) realizou sequenciamento de exomas, análise de aberrações cromossômicas e perfil de ploidia de DNA a fim de estudar várias amostras de biopsias de CCR localizado e seus respectivos sítios metastáticos. As biopsias dos tumores primários foram realizadas antes e depois da nefrectomia redutora e as biopsias das metástases foram feitas antes do início de everolimus neoadjuvante e depois de 1 semana sem o uso de everolimus (os pacientes usavam everolimus por 6 semanas). A seguir, os pacientes retomavam o uso de everolimus até progressão de doença (PD). Os resultados sugeriram que a evolução das mutações no CCR se dá por um tronco e várias ramificações e não de uma forma linear. (Figura 5). Outros estudos também corroboram a hipótese tronco-ramificações, sendo a mutação tronco fundamental para a tumorigênese e a mutação VHL seria a grande responsável nos tumores esporádicos renais.

As mutações-ramificações formam subclones e são responsáveis pelo crescimento e progressão dos tumores. Exemplos de mutações-ramificações são PBRM1, BAP1, SETD2, KDM5C. Esses subclones não são bem avaliados por sequenciamento-bulk no início, já que poucas células fazem parte desse clone. Entretanto, podem ser avaliados através do sequenciamento de células isoladas.



Fonte: BEKSAC (2017)

Figura 5 - Árvore filogenética demonstrando a mutação tronco e as consequentes mutações e subclones.

Na análise de Gerlinger, 63 a 69% das mutações somáticas não foram detectadas em todas as regiões dos tumores biopsiadas. Apenas 31% das mutações detectadas por sequenciamento no tumor primário estavam presentes em todas as regiões do mesmo tumor (incluindo metástases). Essas alterações gênicas, quando isoladas, não conseguem levar ao sucesso o surgimento e crescimento tumoral. Alterações epigenéticas e expressões gênicas diferentes devem ocorrer para o sucesso da

carcinogênese (SUN e YU 2015). O microambiente tumoral também tem importância para permitir que o tumor se desenvolva e esse microambiente também é heterogêneo em diferentes partes do tumor. GERLINGER et al. (2013) realizou sequenciamento de células T para avaliar a distribuição dessas células em diferentes partes do tumor renal, chegando a conclusão que a frequência de células T varia muito em diferentes partes do tumor renal. CALLEA et al. analisou em 2015 a heterogeneidade tumoral de PD-L1 e observou que não apenas o PD-L1 é heterogêneo no tecido tumoral, mas como também ele quase que só está presente em áreas de alto grau tumoral.

Também há evidência de que o uso de medicações sistêmicas aumenta a heterogeneidade intra-tumoral. STEWART et al. (2015) demonstrou que após 3 ciclos de sunitibe, houve aumento da heterogeneidade intra-tumoral, da quantidade de mutações e da variabilidade de expressão proteica tumoral.

BRANNON et al. (2010) classificaram o carcinoma de células renais subtipo células claras em dois tipos de acordo com o perfil genético: ccA e ccB. O ccA, comparado com o ccB, é associado com melhor SCE (8.6 anos x 2 anos p 0.0002) e melhor SG (4.9 anos x 1.8 anos p = 0.004). SERIE et al. (2017) fizeram uma análise genética por meio do ClearCode34, de 111 pacientes que tinham o tecido do tumor primário e da metástase disponível, usando o princípio da subclassificação em ccA e ccB. Eles compararam os dois tecidos e viram que 43% das metástases apresentavam subtipo de células claras diferente do tumor primário.

Essa grande heterogeneidade intratumoral dificulta ainda mais a pesquisa por biomarcadores prognósticos e preditivos em CCRm. A procura é por biomarcadores que tenham, não apenas validade analítica, mas também qualificação clínica, ou seja, que tenham significância clínica e sejam aplicáveis a prática médica (DANCEY et al. 2010).

Entretanto, são poucos os estudos que avaliam o tecido metastático em CCR e tendo em vista a heterogeneidade intra-tumoral no carcinoma renal metastático (GERLINGER et al. 2012), torna-se fundamental o melhor entendimento das vias moleculares de carcinogênese e de potenciais biomarcadores confiáveis, tanto para ITK quanto para imunoterápicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar a expressão imunohistoquímica de Beta-catenina, E-caderina e N-caderina como marcadores prognósticos de sobrevida global nas metástases de carcinoma de células renais.

2.2 OBJETIVO SECUNDÁRIO

Avaliar a expressão imunohistoquímica de Beta-catenina, E-caderina e N-caderina como marcadores prognósticos de sobrevida livre de progressão nas metástases de carcinoma de células renais em 1ª linha de tratamento sistêmico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO E CASUÍSTICA

Após aprovação no Comitê de Ética do A.C.Camargo Cancer Center, nós identificamos retrospectivamente todos os pacientes com carcinoma renal metastático em tratamento ou em acompanhamento na instituição no período de janeiro de 2007 a março de 2016 (Anexo 1). Essa identificação foi feita através do banco de dados eletrônico do registro hospitalar do A.C.Camargo Cancer Center. Todos os pacientes com material patológico foram filtrados e destes, registramos apenas os com tecido tumoral da metástase.

De um total de 129 pacientes, coletamos os dados clínicos dos registros em prontuário médico arquivados no SAME e pelo prontuário eletrônico. Idade, gênero, tipo de nefrectomia, escala de performance de Karnofsky (Anexo 2), grau de Fuhrman/ISUP (Anexo 5), subtipo histológico, particularidades histológicas, sítio de metástase, realização de metastasectomia e estadiamento, de acordo com o AJCC 7ª edição foram registrados (Anexos 3 e 4). Com relação aos exames laboratoriais, coletamos hematócrito e hemoglobina iniciais, contagem de neutrófilos, contagem de plaquetas, cálcio total corrigido e linfócitos. Após isso, os pacientes foram categorizados em grupos de risco, de acordo com os

critérios do IMDC em risco baixo (0 variáveis positivas), intermediário (1-2 variáveis positivas) e alto (3 ou mais variáveis positivas) (Anexo 6).

O seguimento dos pacientes foi feito de múltiplas formas: avaliando-se o prontuário médico da oncologia clínica, da urologia ou de outras especialidades que o paciente tenha frequentado; entrando em contato com médicos de outras instituições que sejam atualmente responsáveis pelo tratamento do paciente; via contato telefônico com os pacientes que não tinham dados recentes arquivados em prontuário.

Os dados patológicos foram avaliados das lâminas do tecido da metástase de cada paciente, armazenadas no arquivo do departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center.

3.2 ELEGIBILIDADE

Os pacientes elegíveis deveriam ter 18 anos ou mais e diagnóstico histológico comprovado de carcinoma de células renais metastático. O tecido da metástase deveria estar disponível para análise microscópica e se houvesse mais de um sítio metastático, ambos deveriam ser analisados. A histologia obrigatoriamente era subtipo células claras, podendo haver até 10% de componente sarcomatóide e/ou rabdóide.

Quanto ao tratamento recebido, os pacientes poderiam ter feito apenas seguimento ou terem sido submetidos a intervenções, tais como: metastasectomia dos sítios de metástase (uma ou mais cirurgias), tratamento sistêmico com inibidores da tirosina quinase, com interleucinas

em altas doses, com imunoterapia ou com inibidores da via do mTOR.

Excluimos pacientes com outros cânceres metastáticos, outras histologias que não células claras, material da metástase insuficiente para análise e os pacientes com dados clínicos de prontuário ou seguimento insuficientes para análise de sobrevida.

3.3 CONSTRUÇÃO DO TISSUE MICROARRAY (TMA)

A análise da expressão das moléculas de E-caderina, N-caderina, Beta-catenina nuclear, Beta-catenina de membrana e Beta-catenina citoplasmática foi feita em TMA. Os casos foram resgatados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica e os blocos representativos do tumor foram separados. Após coloração das lâminas pela técnica de hematoxilina-eosina, as áreas mais representativas do tumor foram identificadas por meio de exame microscópico. As áreas de interesse, definidas como aquelas com maior porcentagem de células tumorais em relação ao estroma e às células não neoplásicas, foram marcadas com caneta permanente e identificadas nos blocos de parafina correspondentes (blocos doadores). Usando o *tissue microarrayer* (Beecher Instrument, Silver Springe, MD, USA), foram retirados cilindros das áreas de interesse previamente identificadas e transferidos para novos blocos de parafina (blocos receptores).

Para cada caso foram retirados dois cilindros de 1mm de duas áreas distintas do tumor, que foram distribuídos no bloco de parafina receptor de forma que cada amostra de um bloco doador ocupou uma determinada linha

e uma determinada coluna no bloco receptor. Foram obtidos cortes histológicos em duplicata destes blocos de TMA e dispostos em lâminas com adesivos Microsystems Inc[®]. As lâminas foram coradas com HE e para os estudos imunohistoquímicos foram utilizados anticorpos específicos.

3.4 IMUNOHISTOQUÍMICA

As seções foram montadas em lâminas de vidro e secas após 30 minutos em uma temperatura de 37 graus Celsius. As seções foram desparafinizadas em xileno e re-hidratadas através de uma série de álcoois. As seções foram então mergulhadas em um anticorpo primário conforme quadro abaixo. Todos os procedimentos de imunohistoquímica foram feitos usando o sistema de visualização Novolink de acordo com as especificações do fabricante.

Quadro 1 - Lista de anticorpos primários utilizados com respectivos clones, títulos, nomes de fabricantes e códigos

Anticorpo	Marca	Clone	Diluição	Padrão Avaliado
Anti-E-caderina	BD Transduction	36	1/1000	Membrana
Anti-N-caderina	Dako	6G11	1:50	Membrana
Anti-Beta-catenina	BD Transduction	14	1/600	Membrana, Citoplasma e Núcleo

Uma patologista especialista em uro-oncologia e cega para o desfecho dos casos, (IWC) pontuou qualitativamente a intensidade da E-caderina, N-caderina, Beta-catenina na membrana, Beta-catenina no núcleo

e Beta-catenina no citoplasma em todas as amostras. A leitura dos resultados da imunohistoquímica nos blocos receptores foi feito no formato de uma tabela de Excel onde se identifica uma determinada amostra pela coluna e linha correspondente àquela que ocupa no bloco de parafina. Durante a leitura, a patologista responsável IWC analisou as lâminas enquanto AFF registrava os dados na tabela do Excel, para minimizar erros.

Utilizamos tecido renal não neoplásico como forma de controle positivo da reação para todos os marcadores pesquisados. Como marcador negativo, a marcação padrão foi utilizada.

3.5 PONTUAÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA

Cada caso foi pontuado de forma independente pela patologista responsável (IWC). Os marcadores foram avaliados e pontuados qualitativamente, de acordo com a intensidade de captação do anticorpo na célula.

Para posterior análise estatística e categorização, foi calculado o ponto de corte do marcador para o qual se melhor diferenciava a sobrevida em dois grupos (conforme descrito na seção “análise estatística”). Essa estratégia foi adotada para todos os marcadores e foi o que definiu a categorização dos mesmos.

A E-caderina e N-caderina foram avaliadas na membrana celular e pontuadas de 0 a 3. Recebiam pontuação 0 se não houvesse captação 1 se captação fraca 2 se moderada e 3 se forte. O ponto de corte da E-caderina

foi 0, e por isso consideramos os grupos negativo versus positivo para análise estatística. Já o ponto de corte da N-caderina foi 2 e os grupos foram divididos em negativo, fraco e moderado versus forte captação.

A Beta-catenina foi avaliada em todas as suas localizações celulares: membrana, citoplasma e núcleo. A beta-catenina de membrana foi pontuada de 0 a 2, sendo 0 sem captação 1 perda parcial e 2 positivo total. O ponto de corte da beta-catenina de membrana foi 1, por isso os grupos foram negativo e perda parcial versus positivo total.

Já a Beta-catenina citoplasmática foi pontuada de 0 a 3, sendo 0 se não houvesse captação 1 se captação fraca 2 se moderada e 3 se forte. O ponto de corte foi 2 e os grupos foram negativo, fraco e moderado versus forte.

Por sua vez, a beta-catenina nuclear recebeu pontuação em forma de porcentagem, de 0 a 100%. O seu ponto de corte foi 0 e então os grupos foram negativo versus positivo.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente foi realizado uma análise descritiva das variáveis, em que as distribuições de frequência absoluta (n) e relativa (%) foram apresentadas para as variáveis qualitativas, e as principais medidas resumo, como a média, desvio padrão, mediana, valores mínimo e máximo para as variáveis quantitativas.

A fim de investigar uma possível associação entre as variáveis qualitativas, o teste de independência (teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando apropriado) foi aplicado. A comparação entre duas ou mais amostras (independentes) com respeito a uma variável quantitativa foi realizada por meio do teste não-paramétrico U de Mann-Whitney (dois grupos) ou o teste de Kruskal-Wallis (três ou mais grupos) seguido de uma comparação múltipla via método de Bonferroni.

A concordância entre os marcadores foi avaliada por meio da medida de concordância Kappa. O coeficiente kappa pode variar de < 0 até 1. Se < 0 significa sem concordância; se 0-0.19, concordância pobre; se 0.2-0.39, concordância fraca; se 0.4-0.59, concordância moderada; se 0.6-0.79 concordância importante; se 0.8-1, concordância quase perfeita.

Com o objetivo de criar dois grupos de pacientes (bom e mal prognóstico) em relação ao marcador RNL e aos biomarcadores em estudo E-caderina, N-caderina, Beta-catenina de membrana, Beta-catenina citoplasmática e Beta-catenina nuclear, um ponto de corte foi estimado. A técnica da maximização da estatística log-rank padronizada proposta por

LAUSEN e SCHUMACHER (1992) foi aplicada. A ideia da técnica é determinar o valor que deixa a estatística log-rank padronizada com o valor máximo. O valor que maximiza a estatística é considerado como a estimativa do ponto de corte.

Em situações em que o tempo até o desfecho é de interesse (SG ou SLP) foram estimadas as curvas de sobrevivência por meio do estimador de Kaplan-Meier, bem como o teste log-rank aplicado com objetivo de comparar as curvas de sobrevivência. Além disso, possíveis fatores de riscos foram avaliados por meio do modelo de riscos proporcionais de Cox simples e múltiplo, sendo sua influência medida pela razão dos riscos (RR). A avaliação da suposição de proporcionalidade foi verificada por meio dos resíduos de SCHOENFELD (1982) seguido do teste de proporcionalidade proposto por GRAMBSCH e THERNEAU (1994). Em todos os casos temos indícios que as covariáveis apresentam efeito constante ao longo do tempo.

Em todos os testes realizados o nível de significância fixado foi de 5%. Assim, resultados cujos valores p são menores que 0,05 são considerados estatisticamente significativos. O software IBM SPSS versão 24 e o software livre R versão 3.4 foram utilizados nas análises de dados.

4 RESULTADOS

4.1 PACIENTES

Resgatamos os dados de pacientes com carcinoma renal metastático tratados no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2007 a março de 2016. De um total de 129 pacientes incluídos no estudo, 91 (70.5%) eram homens, sendo a idade mediana de 56.5 anos. Apenas 10 pacientes (7.8%) não foram submetidos a nefrectomia. Dos nefrectomizados com dados disponíveis (82 pacientes), 46 encontravam-se com doença localizada inicial, sendo estadiamento patológico I (pT1a ou pT1b e N0; 26%) ou II (pT2a ou pT2b pN0; 31%). Dos 129 pacientes, 45 (34.9%) apresentaram-se com metástase sincrônica, ou seja, no momento do diagnóstico do carcinoma renal ou dentro de 6 meses após esse diagnóstico.

Quanto a classificação de risco do IMDC, os nossos resultados foram bastante consistentes com a literatura, com 25 (23%) de bom prognóstico, 61 (57%) de prognóstico intermediário e 21 (20%) de mau prognóstico (HENG et al. 2009).

As características descritivas da população estão detalhadas na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1 - Variáveis epidemiológicas de 129 pacientes portadores de CCRm - A.C.Camargo Cancer Center

Variável	Categoria	Número de pacientes	HR	95% CI		Valor p
				Limite inferior	Limite superior	
Idade	contínuo	123	1.031	1.008	1.053	0.007
Estadiamento patológico	T1N0	21 (26%)	Ref			
	T2N0	25 (31%)	0.94	0.440	2.015	0.877
	T3 or N+	19 (23%)	1.17	0.504	2.749	0.706
	T4 or M1	17 (21%)	0.623	0.243	1.597	0.324
Fuhrman	1	4 (6%)	Ref			
	2	29 (40%)	2.147	0.277	16.624	0.464
	3	23 (32%)	3.198	0.413	24.777	0.266
	4	16 (22%)	5.405	0.666	43.872	0.114
ISUP	1 and 2	33 (46%)	Ref			
	3 and 4	39 (54%)	1.916	1.017	3.610	0.044
Metástase sincrônica	Não	79 (65%)	Ref			
	Sim	43 (35%)	1.354	0.827	2.217	0.228
Pulmão	Não	32 (27%)	Ref			
	Sim	88 (73%)	1.206	0.678	2.147	0.523
Fígado	Não	88 (73%)	Ref			
	Sim	32 (27%)	1.454	0.878	2.409	0.146
Ossos	Não	54 (45%)	Ref			
	Sim	67 (55%)	1.911	1.157	3.157	0.011
SNC	Não	98 (82%)	Ref			
	Sim	22 (18%)	1.827	1.049	3.182	0.033
Intra-abdominal	Não	83 (69%)	Ref			
	Sim	38 (31%)	0.556	0.320	0.965	0.037
Subcutâneo	Não	102 (84%)	Ref			
	Sim	19 (16%)	0.959	0.499	1.843	0.900
Metastasectomia	Não	72 (59%)	Ref			
	Sim	50 (41%)	0.192	0.103	0.355	<0.0001
Critério IMDC	Risco alto	21 (20%)	Ref			
	Risco baixo	25 (23%)	0.109	0.047	0.253	<0.0001
	Risco intermediário	61 (57%)	0.190	0.101	0.360	<0.0001
Relação Neutrófilo-Linfócito	≤4.09	63 (77%)	Ref			
	>4.09	18 (22%)	3.712	2.004	6.875	<0.0001

4.2 TRATAMENTO DA DOENÇA METASTÁTICA

Analisando a forma de tratamento realizado, dos 128 pacientes com dados disponíveis 19 (15%) foram submetidos apenas a metastasectomia do sítio de doença a distância, não tendo realizado tratamento sistêmico. Desse mesmo total de pacientes, 9 (7%) pacientes não realizaram nenhuma forma de tratamento sistêmico, sendo mantidos apenas em melhor suporte de vida. Trinta e um pacientes (24%) realizaram metastasectomia porém também fizeram tratamento sistêmico a seguir. No total 95 (74%) pacientes fizeram tratamento sistêmico.

Dos pacientes submetidos a tratamento sistêmico em primeira linha, 85 (89%) fizeram inibidores de tirosina quinase (sunitinibe, sorafenibe ou pazopanibe). O restante foi submetido a temsirolimus (6 pacientes, 6%), Interferon (3 pacientes, 3%) ou interleucina em alta dose (2 pacientes 2%) e estão descritos na Tabela 2.

De um total de 104 pacientes com dados de segunda linha disponíveis, apenas 57 (55%) foram submetidos a uma segunda linha de tratamento sistêmico. Everolimus foi utilizado em 25 pacientes (40%), sorafenibe foi utilizado em 11 (18%), o pazopanibe em 9 (15%) e o nivolumabe em 7 (11%) pacientes. O restante das medicações utilizadas em segunda linha estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Tipos de tratamentos realizados pelos 129 pacientes com CCRm
- A.C.Camargo Cancer Center

Variável	Valor
Metastasectomia	50 (41%)
Tratamento sistêmico em primeira linha	95 (79%)
Sunitinib	63 (66%)
Sorafenib	2 (2%)
Pazopanib	19 (20%)
Temsirolimus	6 (6%)
Interferon	3 (3%)
IL-2	2 (2%)
Tratamento sistêmico em segunda linha	57 (47%)
Everolimus	25 (44%)
Sorafenib	11 (19%)
Pazopanib	9 (16%)
Nivolumab	7 (12%)
Sunitinib	3 (5%)
Interferon	1 (2%)
Axitinib	1 (2%)

4.3 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS CADERINAS

Do total de 129 casos, 88 (68.2%) tinham material histopatológico disponível e com boa qualidade técnica, sendo incluídos na análise de N-caderina. A N-caderina foi visualizada na membrana celular e sua pontuação reflete a intensidade da marcação. Onze (12.5%) casos foram pontuados negativos, 26 (29.5%) fracos, 32 (36.4%) moderados e 19 (21.6%) fortes.

Realizamos o teste kappa para concordância entre os spots do TMA de N-caderina e observamos que existe concordância discreta (kappa = 0.344, $p < 0.001$) entre os diferentes spots do mesmo tumor, já sugerindo certo grau de heterogeneidade intratumoral de N-caderina.

O ponto de corte da N-caderina para SG e SLP foi 2 (≤ 2 versus > 2), conforme analisado pela estatística de log-rank maximizada para obter o melhor ponto de corte correlacionado a Sobrevida. Após a avaliação de N-caderina ≤ 2 versus > 2 , observamos 67 (77%) pacientes com marcação negativa ou baixa, versus 20 (23%) com marcação forte. (Figura 6)

Quanto a E-caderina, 89 (68.9%) casos foram incluídos na análise final. Ela também é uma proteína de membrana celular e sua pontuação reflete a intensidade da marcação. Quinze (16.9%) casos foram pontuados negativos, 47 (52.8%) fracos, 27 (30.3%) moderados e não houve nenhuma marcação forte. A correlação kappa para concordância entre os spots do TMA de E-caderina foi de 0.435 ($p < 0.001$), considerada uma concordância moderada (Figura 7).

O ponto de corte da E-caderina para SG e SLP foi 0 e não houve nenhum caso de forte captação de E-caderina na membrana do tecido metastático. Após avaliação da E-caderina pelo ponto de corte 0, observamos 14 (15.7%) pacientes com marcação negativa versus 75 (84.3%) com marcação positiva.

A correlação das caderinas e as variáveis clínicas de maior interesse estão representadas na Tabela 3.

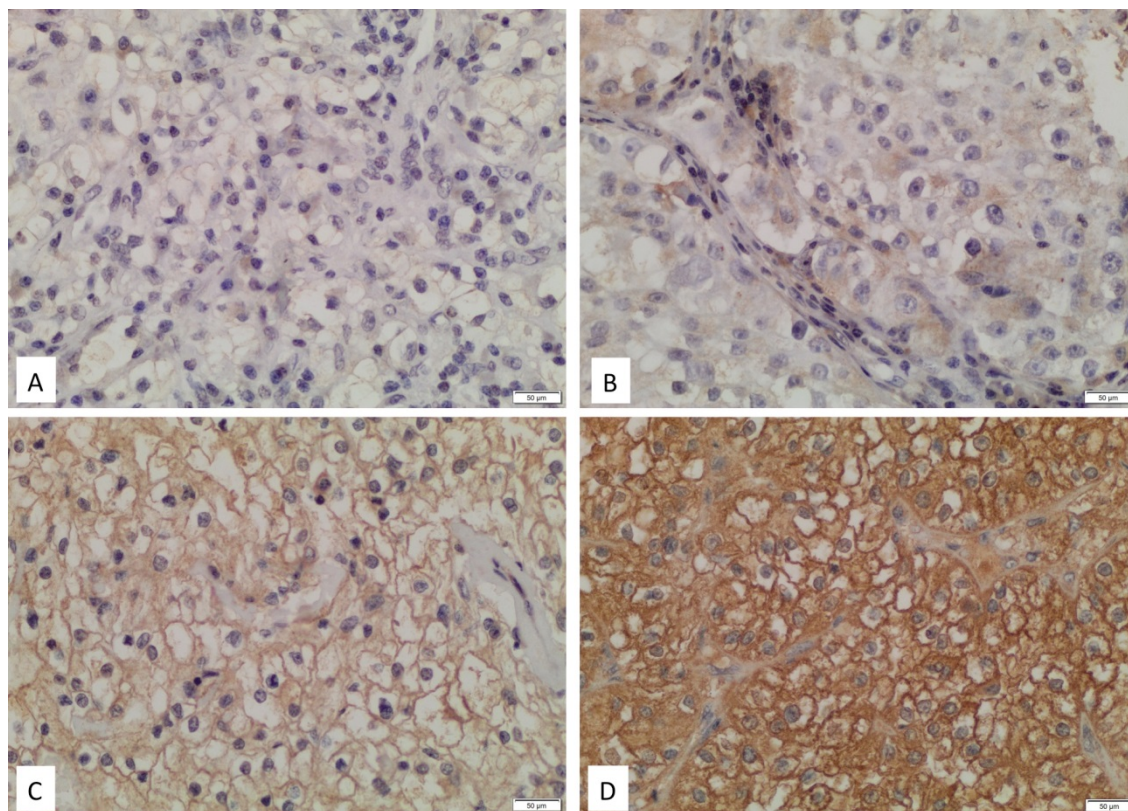


Figura 6 - Lâminas da imunohistoquímica da N-caderina. A - expressão negativa; B - expressão fraca; C - expressão moderada; D - expressão forte

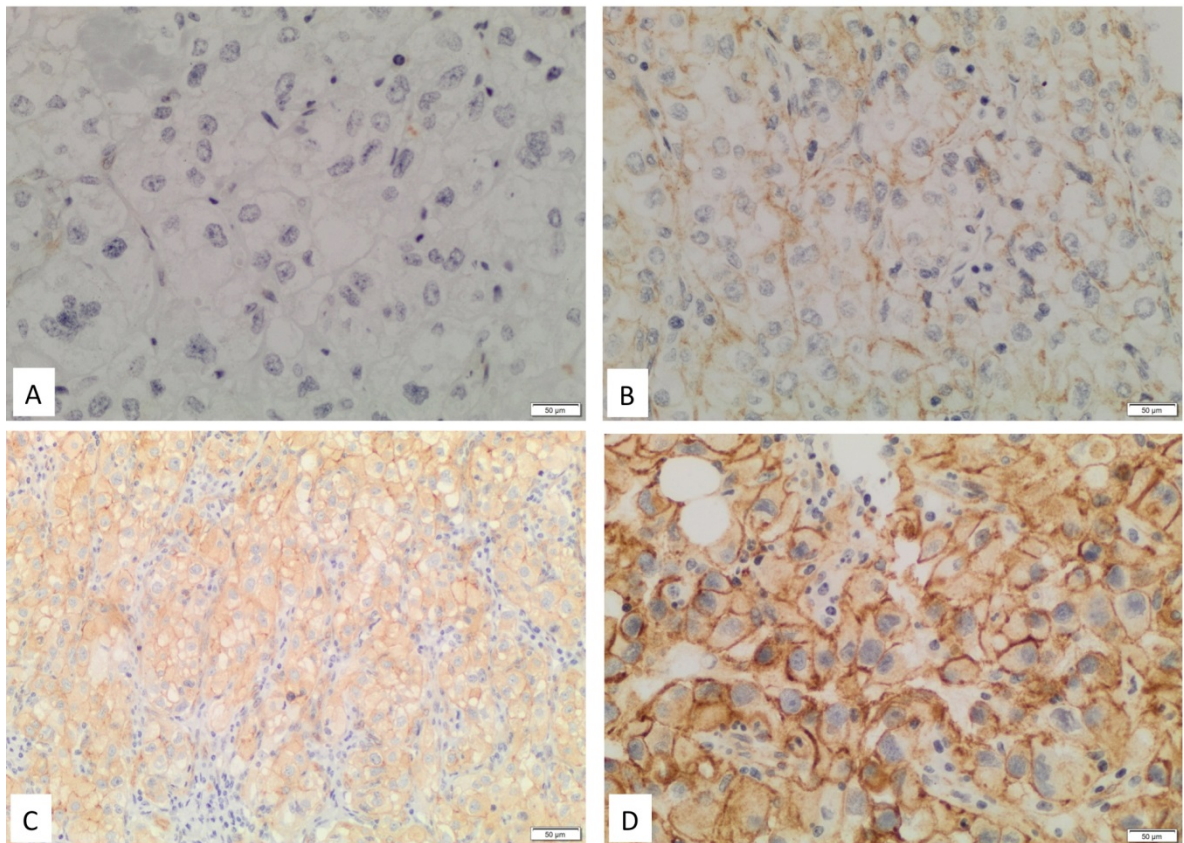


Figura 7 - Lâminas da imunohistoquímica da E-caderina. A - expressão negativa; B - expressão fraca; C - expressão moderada; D - expressão forte

Tabela 3 - Variáveis clínicas de interesse correlacionadas com as caderinas de 129 pacientes do A.C.Camargo Cancer Center

Variável	N-caderina positiva	N-caderina negativa	Valor p	E-caderina positiva	E-caderina negativa	Valor p
Gênero						
• Masculino	15 (75%)	51 (76.1%)	0.55	56 (74.7%)	11 (78.6%)	0.52
• Feminino	5 (25%)	16 (23.9%)		19 (25.3%)	3 (21.4%)	
Nefrectomia						
• Sim	20 (100%)	61 (91%)	0.19	72 (96%)	13 (92.9%)	0.79
• não	0	6 (9%)		3 (4%)	1 (7.1%)	
Estadiamento patológico						
• pT1pN0	3 (20%)	11 (25.6%)	0.43	12 (24.5%)	3 (33.3%)	0.28
• pT2pN0	7 (46.7%)	11 (25.6%)		17 (34.7%)	1 (11.1%)	
• pT3 e/ou pN+	2 (13.3%)	12 (27.9%)		10 (20.4%)	4 (44.4%)	
• T4 e/ou M1	3 (20%)	9 (20.9%)		10 (20.4%)	1 (11.1%)	
Fuhrman						
• 1	0 (0%)	2 (5.4%)	0.09	2 (4.3%)	0 (0%)	0.93
• 2	8 (61.5%)	13 (35.1%)		19 (41.3%)	3 (50%)	
• 3	5 (38.5%)	11 (29.7%)		15 (32.6%)	2 (33.3%)	
• 4	0 (0%)	11 (29.7%)		10 (21.7%)	1 (16.7%)	
Classificação IMDC						
• Bom	4 (21.1%)	12 (21.8%)	0.05	16 (24.6%)	2 (20%)	0.85
• Intermediário	15 (78.9%)	30 (54.5%)		40 (61.5%)	6 (60%)	
• Mau	0 (0%)	13 (23.6%)		9 (13.8%)	2 (20%)	
Neutrofilia						
• Sim	1 (5.3%)	10 (19.6%)	0.13	7 (11.5%)	3 (30%)	0.11
• Não	18 (94.7%)	41 (80.4%)		54 (88.5%)	7 (70%)	
Metastasesectomia						
• Sim	12 (60%)	30 (44.8%)	0.17	39 (48.9%)	4 (28.6%)	0.08
• Não	8 (40%)	37 (55.2%)		35 (51.1%)	10 (71.4%)	
Relação Neutrófilo/Linfócito						
• > 4.07	1 (6.3%)	12 (27.3%)	0.07	10 (18.9%)	3 (37.5%)	0.22
• < =4/07	15 (93.8%)	32 (72.7%)		43 (81.1%)	5 (62.5%)	

4.4 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS BETA-CATENINAS

De um total de 129 casos, 84 (65.1%) tinham material histopatológico disponível e com boa qualidade técnica, sendo incluídos na análise de Beta-catenina de membrana. A beta-catenina foi bem visualizada na membrana celular, e sua pontuação reflete a intensidade de captação desse marcador na membrana. Trinta e nove (46.4%) casos foram negativos, 31 (36.9%) tiveram perda parcial e 14 (16.7%) foram completamente positivos na membrana celular.

Fizemos a análise de concordância kappa entre os spots de diferentes locais do tumor, sendo 0.091 ($p < 0.001$), caracterizando fraca concordância e sugerindo também heterogeneidade intratumoral na metástase.

O ponto de corte da Beta-catenina de membrana para sobrevida global foi 1. Setenta e um (84.5%) dos casos tinham captação fraca na membrana e 13 (15.5%) apresentavam positividade total de captação na membrana. (Figura 8)

Quanto a Beta-catenina citoplasmática, de um total de 129 casos, 85 (65.8%) tinham material disponível e estavam em boa qualidade técnica para análise. A sua captação no citoplasma foi bastante heterogênea e a pontuação foi baseada na intensidade da captação. Onze casos (12.9%) foram negativos 24 (28.2%) captaram de forma fraca, 39 (45.9%) moderada e 11 (12.9%) forte. (Figura 8)

Fizemos a análise da concordância kappa de Beta-catenina citoplasmática nos spots do mesmo tecido da metástase, que resultou em 0.33, significando correlação positiva, porém discreta, sugerindo também heterogeneidade intratumoral na metástase.

Após avaliarmos o ponto de corte da beta-catenina citoplasmática com relação a sobrevida global que foi 2, observamos 73 (85.9%) casos com baixa captação e 12 (14.1%) casos com forte captação.

Em relação a Beta-catenina nuclear, todos os 129 casos puderam ser bem analisados tecnicamente. A captação nuclear foi bem visualizada e pontuada conforme intensidade, em valor de porcentagem. Após análise do ponto de corte pela sobrevida global, que foi 0, definimos como positivo captação $\geq 1\%$ e negativo se < 0 . No total, tivemos 79 (61.2%) casos negativos e 50 (38.8%) positivos.(Figura 8)

Quanto a análise de concordância da Beta-catenina nuclear, o coeficiente kappa foi 0.35, inferindo novamente concordância discreta.

A correlação entre as beta-cateninas de membrana e citoplasma e as variáveis clínicas estão descritas na Tabela 4. Já a referente a beta-catenina nuclear estão descritas na Tabela 5.

Tabela 4 - Variáveis clínicas de interesse correlacionadas com a beta-catenina de membrana e citoplasmática de 129 pacientes do A.C.Camargo Cancer Center

Variável	B-catenina membrana positiva	B-catenina membrana negativa	Valor p	B-catenina citoplasma positiva	B-catenina citoplasma negativa	Valor p
Gênero						
• Masculino	11 (84.6%)	52 (73.2%)	0.31	8 (66.7%)	56 (76.7%)	0.33
• Feminino	2 (15.4%)	19 (26.8%)		4 (33.3%)	17 (23.3%)	
Nefrectomia						
• Sim	12(92.3%)	68 (95.7%)	0.79	10 (83.3%)	71 (97.3%)	0.04
• não	1 (7.7%)	3 (4.2%)		2 (16.7%)	2 (2.7%)	
Estadiamento patológico						
• pT1pN0	2 (12.5%)	13 (27.7%)	0.64	2 (25%)	12 (25.5%)	0.85
• pT2pN0	4 (50%)	14 (29.8%)		3 (37.5%)	15 (31.9%)	
• pT3 e/ou pN+	2 (25%)	11 (23.4%)		1 (12.5%)	12 (25.5%)	
• T4 e/ou M1	1 (12.5%)	9 (19.1%)		2 (25%)	8 (17%)	
Fuhrman						
• 1	1 (14.3%)	1 (2.4%)	0.44	1 (14.3%)	1 (2.4%)	0.24
• 2	2 (28.6%)	19 (46.3%)		1 (14.3%)	20 (47.6%)	
• 3	2 (28.6%)	13 (31.7%)		3 (42.9%)	13 (31%)	
• 4	2 (28.6%)	8 (19.5%)		2 (28.6%)	8 (19%)	
Classificação IMDC						
• Bom	1 (8.3%)	15 (26.8%)	0.13	0 (0%)	17 (27%)	0.09
• Intermediário	7 (58.3%)	34 (60.7%)		6 (66.7%)	38 (60.3%)	
• Mau	4 (33.3%)	7 (12.5%)		3 (33.3%)	8 (12.7%)	
Neutrofilia						
• Sim	2 (15.4%)	8 (14.8%)	0.62	1 (11.1%)	9 (15.3%)	0.60
• Não	11 (84.6%)	46 (85.2%)		8 (88.9%)	50 (84.7%)	
Metástase pulmonar						
• Sim	8 (61.5%)	53 (76.8%)	0.20	9 (81.8%)	53 (73.6%)	0.43
• Não	5 (38.5%)	16 (23.2%)		2 (18.2%)	19 (26.4%)	
Metástase intra-abdominal						
• Sim	3 (23.1%)	19 (27.1%)	0.53	2 (18.2%)	20 (27.4%)	0.40
• Não	10 (76.9%)	51 (72.9%)		9 (81.8%)	53 (72.6%)	
Metástase em subcutâneo						
• Sim	3 (23.1%)	13 (18.6%)	0.47	2 (18.2%)	14 (19.2%)	0.65
• Não	10 (76.9%)	57 (81.4%)		9 (81.8%)	59 (80.8%)	

Tabela 5 - Variáveis clínicas de interesse correlacionadas com a beta-catenina nuclear de 129 pacientes do A.C.Camargo Cancer Center

Variável	B-catenina nuclear positiva	B-catenina nuclear negativa	Valor p
Gênero			
• Masculino	38 (76%)	53 (67.1%)	0.18
• Feminino	12 (24%)	26 (32.9%)	
Nefrectomia			
• Sim	48 (96%)	71 (89.9%)	0.31
• Não	2 (4%)	8 (10.1%)	
Estadiamento patológico			
• pT1pN0	11 (33.3%)	12 (22.2%)	0.70
• pT2pN0	9 (27.3%)	17 (31.5%)	
• pT3 e/ou pN+	6 (18.2%)	13 (24.1%)	
• T4 e/ou M1	7 (21.2%)	12 (22.2%)	
Fuhrman			
• 1	0 (0%)	4 (8.9%)	0.33
• 2	12 (38.7%)	19 (42.2%)	
• 3	12 (38.7%)	13 (28.9%)	
• 4	7 (22.6%)	9 (20%)	
Classificação IMDC			
• Bom	12 (27.3%)	15 (22.4%)	0.25
• Intermediário	27 (61.4%)	36 (53.7%)	
• Mau	5 (11.4%)	16 (23.9%)	
Neutrofilia			
• Sim	2 (5%)	16 (24.6%)	0.007
• Não	38 (95%)	49 (75.4%)	
Metástase pulmonar			
• Sim	39 (78%)	51 (67.1%)	0.13
• Não	11 (22%)	25 (32.9%)	
Metástase intra-abdominal			
• Sim	11 (22%)	29 (37.7%)	0.04
• Não	39 (78%)	48 (62.3%)	
Metástase em subcutâneo			
• Sim	13 (26%)	8 (10.4%)	0.02
• Não	37 (74%)	69 (89.6%)	

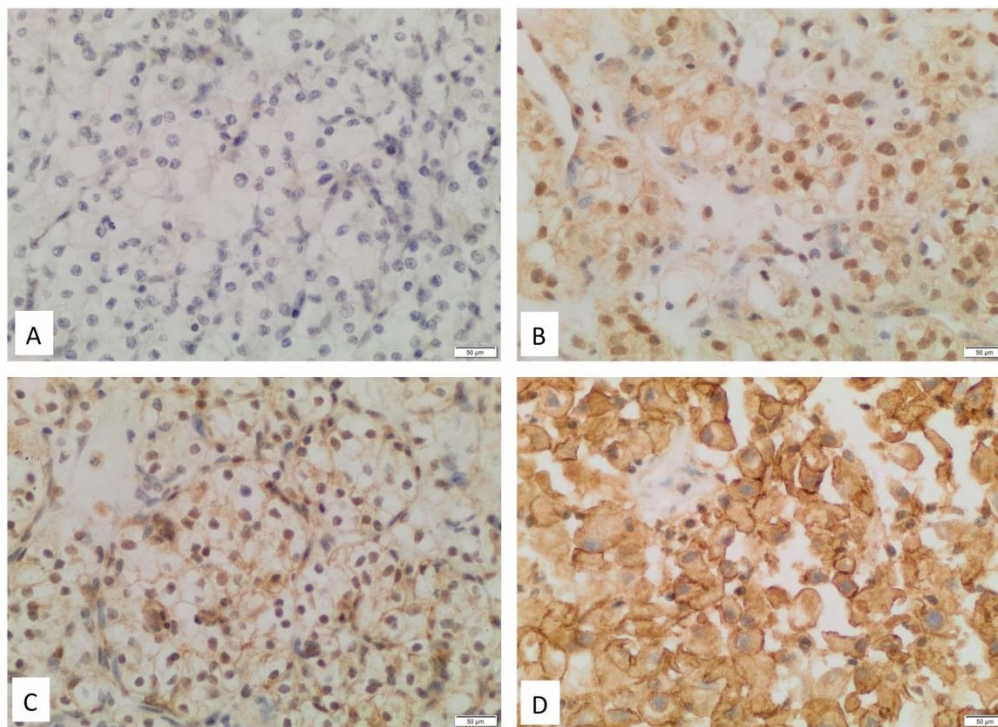


Figura 8 - Lâminas da imunohistoquímica de beta-catenina. A - expressão negativa; B e C - expressão positiva da beta-catenina nuclear; D - expressão positiva da beta-catenina de membrana e citoplasmática

4.5 ANÁLISE DE SOBREVIDA

A sobrevida global mediana da população estudada foi 49.28 meses e o tempo de seguimento mediano foi de 70.4 meses. Ao final da análise, 74 (57.8%) eventos de óbito já haviam ocorrido.

A análise do modelo de Cox simples das variáveis clínicas e sobrevida global está demonstrada na Tabela 6. A presença de metástases ósseas e em sistema nervoso central denotaram pior prognóstico, enquanto a presença de metástases intra-abdominais denotaram melhor prognóstico. A classificação do IMDC, a relação neutrófilo-linfócito > 4.09 e a realização de metastasectomia também foram estatisticamente significativas em termos

de prognóstico e sobrevida global ($p < 0001$), compatível com a literatura por HENG et. al. (2009), HU et al. 2015, TEMPLETON et al. (2016), BILEN et al. (2018) e LALANI et al. (2018) sugerindo que a nossa amostra populacional esteja bem representada.(Figura 9).

A análise do modelo de risco de Cox simples das variáveis moleculares e SG está disposta na Tabela 7. Observamos significância estatística para os biomarcadores N-caderina ($p=0.01$) e Beta-catenina nuclear ($p=0.001$). (Figuras 13 e 14)

Quanto a SLP, a mediana foi 24.54 meses. Ao final da análise, tivemos um total de 88 (69.8%) eventos de óbito ou progressão de doença ou toxicidade limitante. A análise do modelo de Cox simples das variáveis clínicas e SLP está demonstrada na Tabela 6 (Figuras 16 e 17). Observamos que Fuhrman elevado foi estatisticamente significativo em termos de SLP, mas não em termos de SG. Metástase óssea, metástase em SNC e em linfonodos impactaram em pior prognóstico em termos de SLP. Da mesma forma que para SG, a classificação IMDC, a relação neutrófilo-linfócito e a realização de metastasectomia tiveram significância estatística em termos de SLP ($p < 0.0001$).

A análise do modelo de risco de Cox simples das variáveis moleculares e SLP está disposta na Tabela 7. Assim como para SG, foram positivos para SLP os biomarcadores N-caderina ($p = 0.004$) e Beta-catenina nuclear ($p = 0.001$).

Tabela 6 - Modelo de risco de Cox simples das variáveis clínico-laboratoriais com SG e SLP

Variável	SG mediana	Valor p	SLP mediana	Valor p
Gênero				
• Feminino	71.39m	0.24	37.32m	0.20
• Masculino	42.61m		24.31m	
Nefrectomia				
• Sim	54.80m	< 0.001	30.16m	<0.001
• Não	8.64m		6.11m	
Estadiamento patológico inicial				
• T1N0	42.61m	0.59	19.02m	0.61
• T2N0	59.36m		24.41m	
• T3 e/ou N+	36.20m		30.16m	
• T4 e/ou M1	175.37m		37.32m	
Fuhrman inicial				
• 1	Não avaliável	0.09	86.14m	0.01
• 2	59.36m		37.12m	
• 3	25.06m		16.0m	
• 4	43.36m		19.02m	
Metástase pulmonar				
• Sim	43.33m	0.40	24.34m	0.25
• Não	79.50m		37.94m	
Metástase hepática				
• Sim	43.36m	0.15	19.35m	0.07
• Não	49.28m		30.39m	
Metástase óssea				
• Sim	37.38m	0.008	19.71m	0.02
• Não	95.63m		37.32m	
Metástase SNC				
• Sim	32.49m	0.02	21.42m	0.03
• Não	59.72m		30.39m	
Metástase intra-abdominal				
• Sim	95.63m	0.01	37.94m	0.13
• Não	40.54m		24.31m	
Metástase subcutânea				
• Sim	32.09m	0.93	21.42m	0.29
• Não	49.28m		30.16m	
Metástase linfonodal				
• Sim	34.33m	0.41	19.02m	0.002
• Não	59.36m		37.32m	
Classificação IMDC				
• Bom	95.63m	< 0.0001	60.74m	<0.0001
• Intermediário	58.15m		30.16m	
• Mau	16m		14.29m	
RNL				
• <=4.09	58.15m	< 0.0001	30.16m	<0.0001
• >4.09	11.49m		9.52m	
Metastastomia				
• Sim	98.39m	<0.0001	71.39m	<0.0001
• Não	26.84m		16m	

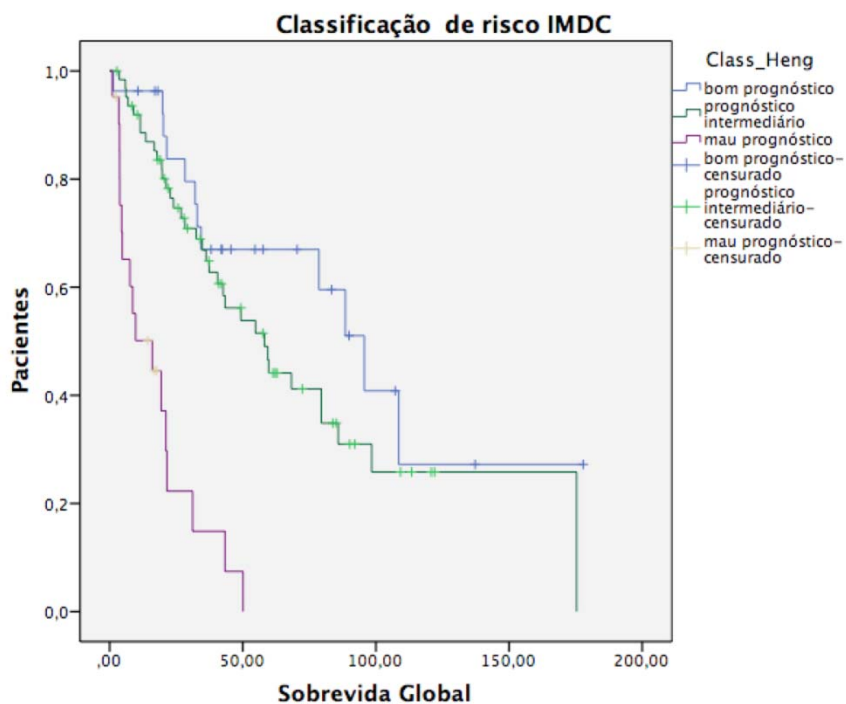


Figura 9 - Sobrevida global estratificada pela Classificação de risco IMDC. Nota-se a separação clara das curvas de sobrevida de acordo com o prognóstico do paciente ($p < 0.0001$)

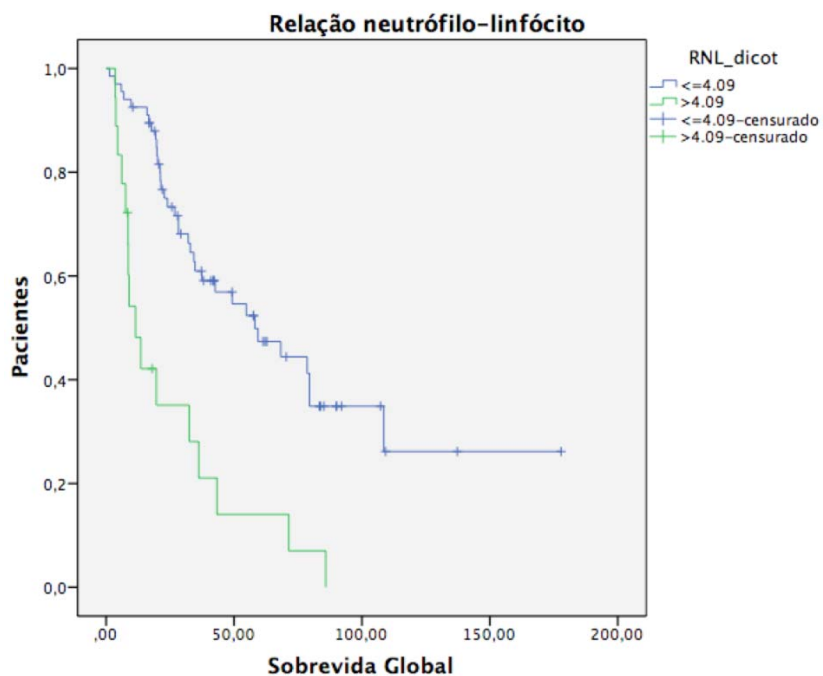


Figura 10 - Curvas de sobrevida global de acordo com a relação neutrófilo linfócito, dicotomizada no ponto de corte estabelecido 4.09 ($p < 0.0001$)

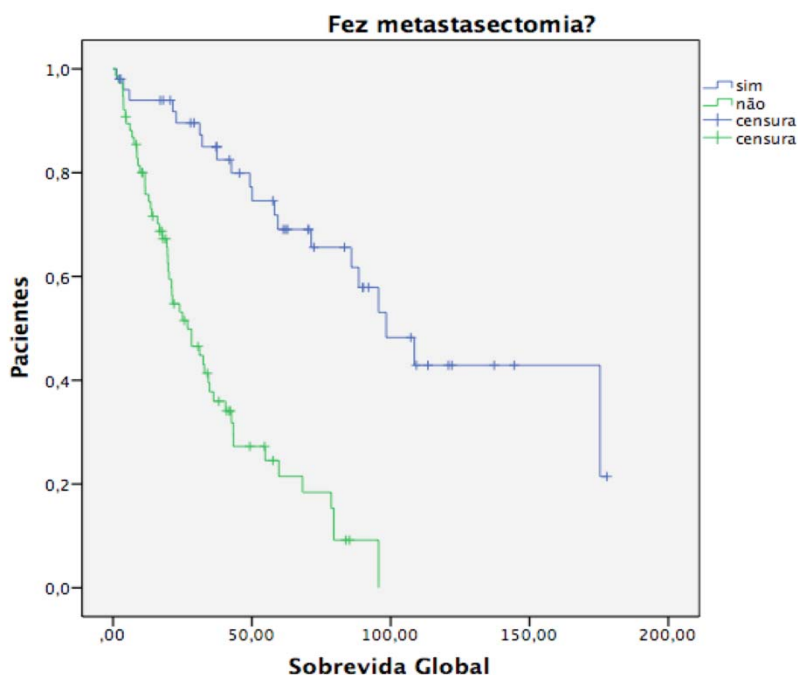


Figura 11 - Curvas de sobrevida global de acordo com a realização ou não de metastasectomia ($p < 0.0001$)

Tabela 7 - Modelo de risco de Cox simples das variáveis moleculares e SG

Variável	Sobrevida global mediana	Valor p	Sobrevida livre de progressão mediana	Valor p
N-caderina spot mais alto				
• Negativo	21.22m	0.03	15.90	0.01
• Fraco	40.54m		34.07	
• Moderado	50.10m		30.16	
• Forte	98.39m		86.27	
N-caderina cut off				
• Negativo, fraco, moderado	42.61m	0.01	30.16	0.004
• Forte	98.39m		86.27	
E-caderina spot mais alto				
• Negativo	43.33m	0.43	27.99	0.53
• Fraco	68.27m		37.94	
• Moderado	78.58m		24.31	
• Forte	Nenhuma amostra		Nenhuma amostra	

Cont/ Tabela 7

Variável	Sobrevida global mediana	Valor p	Sobrevida livre de progressão mediana	Valor p
E-caderina cut off				
• Negativo	40.54m	0.30	27.99	0.44
• Fraco, moderado, forte	68.27m		37.32	
Beta-catenina de membrana spot mais alto				
• Negativo	59.36m	0.31	32.0	0.70
• Perda parcial	79.50m		53.58	
• Positivo total	50.10m		37.12	
Beta-catenina de membrana cut off				
• Negativo, perda parcial	71.39m	0.06	37.32	0.48
• Positivo total	50.10m		19.02	
Beta-catenina citoplasmática spot mais alto				
• Negativo	59.72m	0.79	32.0	0.99
• Fraco	43.33m		37.94	
• Moderado	71.39m		34.07	
• Forte	54.80m		37.32	

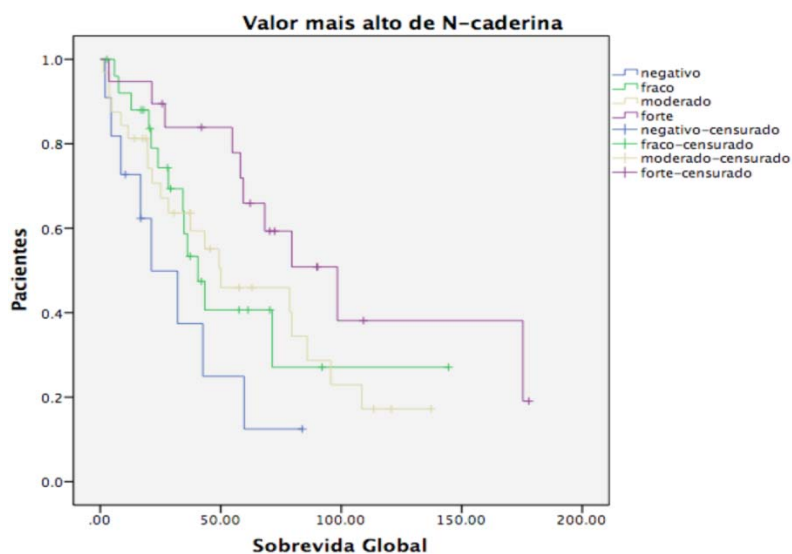


Figura 12 - Sobrevida global dos pacientes estratificada pela marcação mais alta da N-caderina. Demonstramos que houve separação das curvas pelo valor mais alto de marcação da N-caderina, sendo a marcação negativa de pior prognóstico e a forte de melhor prognóstico ($p = 0.03$).

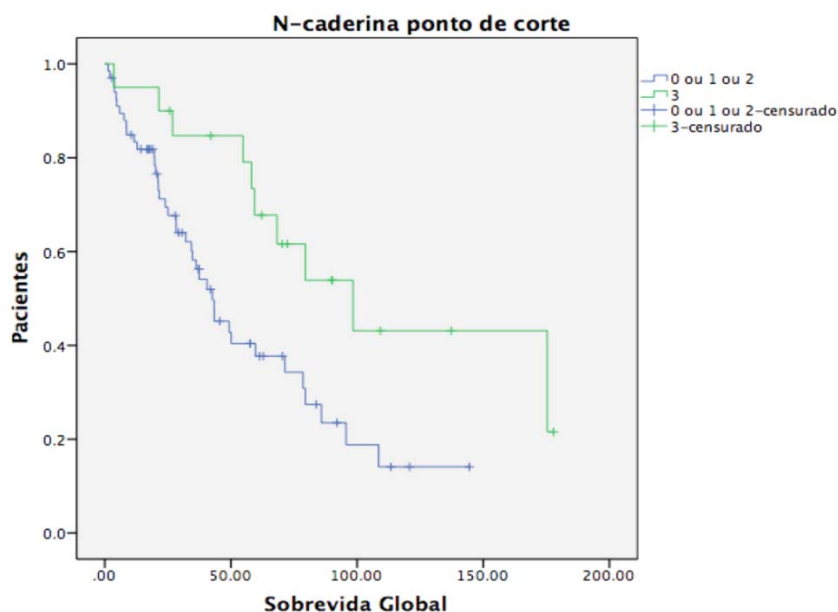


Figura 13 - Sobrevida global de acordo com a categorização da N-caderina no seu ponto de corte. Após categorizarmos a N-caderina de acordo com o seu ponto de corte (pontuação ≤ 2 versus > 2), observamos importante separação das curvas de sobrevida global ($p = 0.01$).

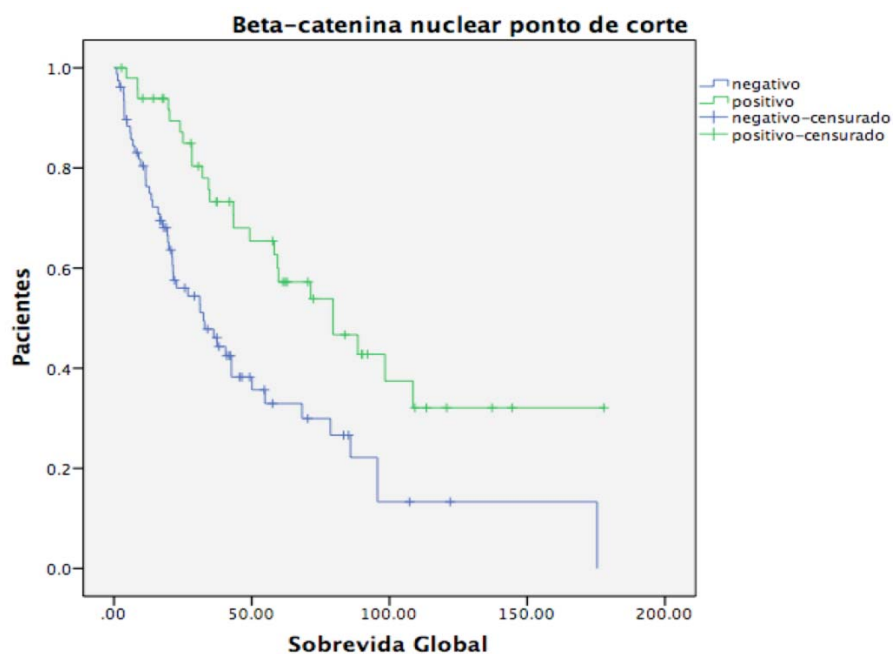


Figura 14 - Sobrevida global de acordo com a categorização da Beta-catenina nuclear no seu ponto de corte (0 versus > 0). Observamos importante separação das curvas de sobrevida global ($p = 0.001$).

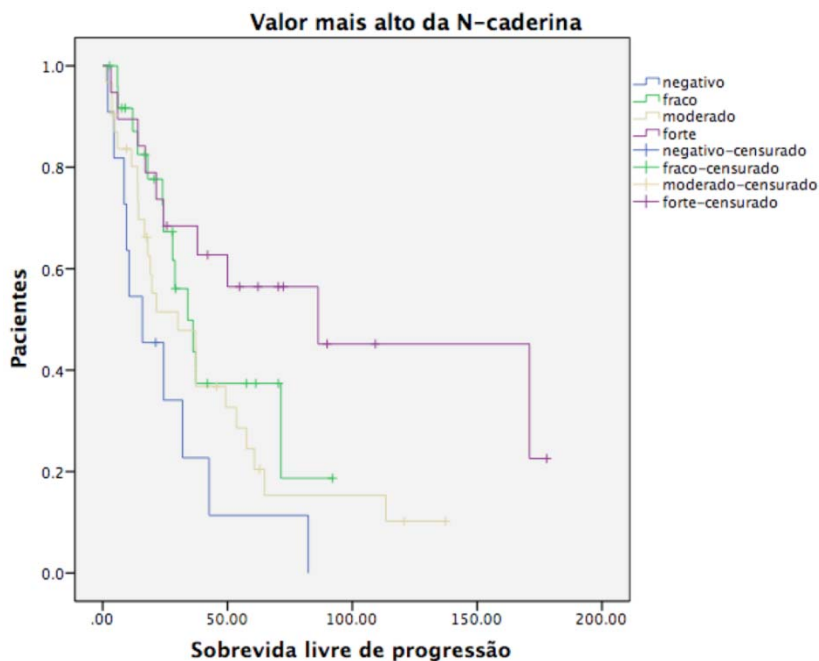


Figura 15 - Sobrevida livre de progressão dos pacientes estratificada pela marcação mais alta da N-caderina. Observamos separação importante das curvas, sendo a marcação negativa de pior prognóstico e a marcação forte a de melhor prognóstico ($p = 0.001$).

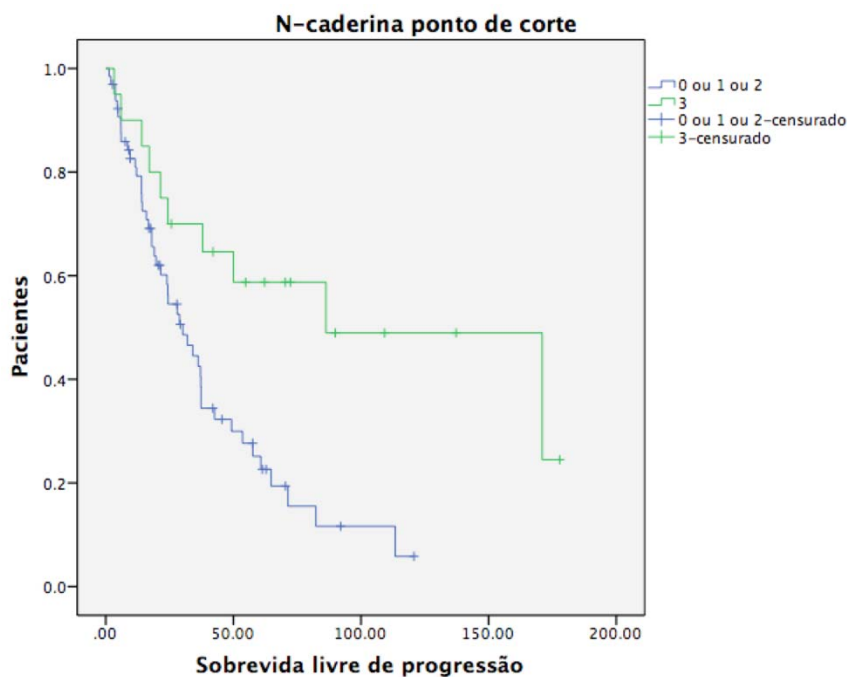


Figura 16 - Sobrevida livre de progressão de acordo com a categorização da N-caderina no seu ponto de corte (≤ 2 versus > 2). Observamos importante separação das curvas de sobrevida livre de progressão ($p = 0.004$)

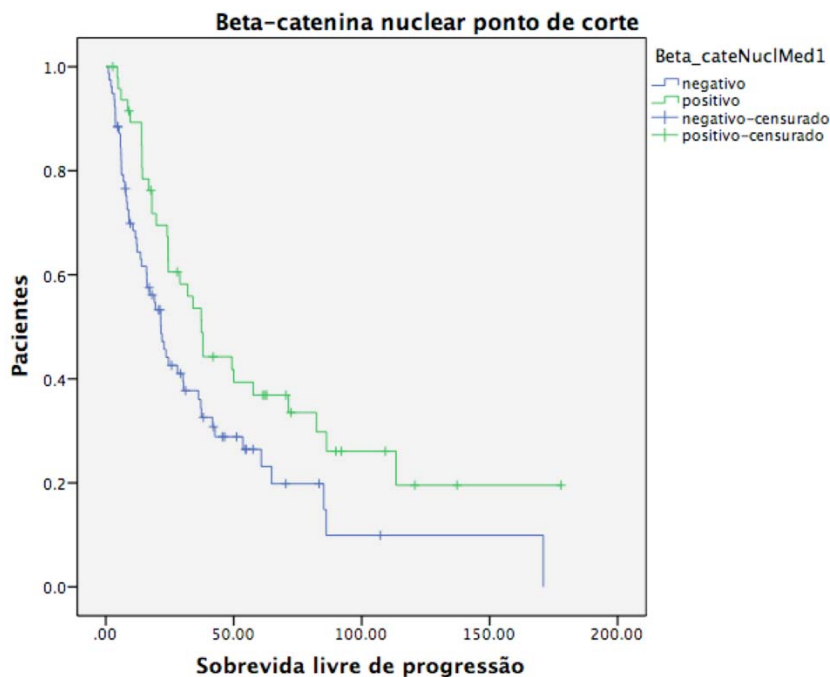


Figura 17 - Sobrevida livre de progressão de acordo com a categorização da Beta-catenina nuclear em seu ponto de corte (0 versus > 0). Observamos separação das curvas de sobrevida livre de progressão ($p = 0.018$).

4.5.1 Modelo de Cox simples

Os biomarcadores estudados foram avaliados de forma univariada por modelo de Cox simples. N-caderina e Beta-catenina nuclear foram positivas, com HR 0.40 e 0.36, respectivamente. Beta-catenina de membrana teve uma tendência a significância estatística, com HR 1.92. E-caderina e Beta-catenina citoplasmática não foram significativas.

Biomarcador	Categoria	Número de amostras	HR	95% CI		Valor p
				Limite inferior	Limite superior	
E-cadherin	Negativo	14 (16%)	Ref			
	Positivo	72 (84%)	0.69	0.34	1.39	0.308
N-cadherin	Negativo	64 (76%)	Ref			
	Positivo	20 (24%)	0.40	0.19	0.84	0.015
Membranous- β -catenin	Negativo	69 (84%)	Ref			
	Positivo	13 (16%)	1.92	0.94	3.91	0.070
Nuclear- β -catenin	Negativo	36 (44%)	Ref			
	Positivo	46 (56%)	0.36	0.20	0.65	0.001

4.5.2 Modelo de Cox múltiplo

Para ser realizado, as variáveis com valor $p \leq 0.01$ e variáveis de maior interesse clínico foram escolhidas. Como o número de eventos para SG, descartando valores ausentes nas variáveis, foi 30, o número máximo de variáveis era 4. Assim, as variáveis descritas na Tabela 8 foram escolhidas para análise no modelo múltiplo relacionado a SG.

Tabela 8 - Variáveis escolhidas para análise no modelo Cox múltiplo e seus respectivos valores p na análise de Cox simples.

Variável escolhida	Valor p
Metastasectomia	< 0.001
Risco IMDC	<0.001
N-caderina cut off	0.01
Beta-catenina membrana cut-off	0.07
Beta-catenina nuclear cut off	0.001

Após realização do modelo de Cox múltiplo, as variáveis idade, Classificação IMDC, realização de metastasectomia, N-caderina e Beta-catenina nuclear confirmaram-se como variáveis de significância estatística independentes para risco de óbito. (Tabela 9).

Tabela 9 - Análise do modelo Cox múltiplo referente a sobrevida global.

Variável	Categoria	HR	95% CI		Valor p
			Limite inferior	Limite superior	
Idade		1.05	1.02	1.09	0.004
Gênero	Masculino	Ref			
	Feminino	0.51	0.19	1.49	0.23
Risco prognóstico IMDC	Risco-alto	Ref			
	Risco-baixo	0.17	0.05	0.54	0.003
	Risco-intermediário	0.24	0.09	0.64	0.004
Metastasesectomia	Não	Ref			
	Sim	5.23	2.22	12.33	<0.0001
N-caderina	Baixo	Ref			
	Alto	0.32	0.11	0.91	0.033
β -catenina-membrana	Alto	Ref			
	Baixo	1.44	0.54	3.84	0.47
β -catenina-nuclear	Baixo	Ref			
	Alto	0.28	0.13	0.60	0.001

Com relação a SLP, o número de eventos, descartando valores ausentes nas variáveis, foi de 34. Por isso, escolhemos as mesmas variáveis descritas na Tabela 9 para análise de Cox modelo múltiplo relacionado a SLP.

Após análise do modelo Cox múltiplo, apenas a variável Classificação IMDC (HR = 0.12, IC: 0.02 - 0.53, p = 0.005) manteve significância estatística, sendo a única a se confirmar como variável prognóstica independente para SLP.

4.5.3 Análise estratificada Kaplan-Meier

Fizemos ainda uma análise estratificada de sobrevida global, verificando especificamente a relação de sobrevida dos marcadores N-caderina e Beta-catenina nuclear.

Avaliando apenas os pacientes com N-caderina negativa, percebemos que quando beta-catenina nuclear positiva, a sobrevida mediana é de 59.7 meses enquanto se beta-catenina nuclear negativa, a sobrevida é 36.2 meses (p 0.007). Da mesma forma, se N-caderina positiva e beta catenina nuclear positiva, a sobrevida global mediana não pode ser atingida, enquanto se beta catenina nuclear negativa, SGM é 54.8m (p 0.035). (Figuras 18 e 19).

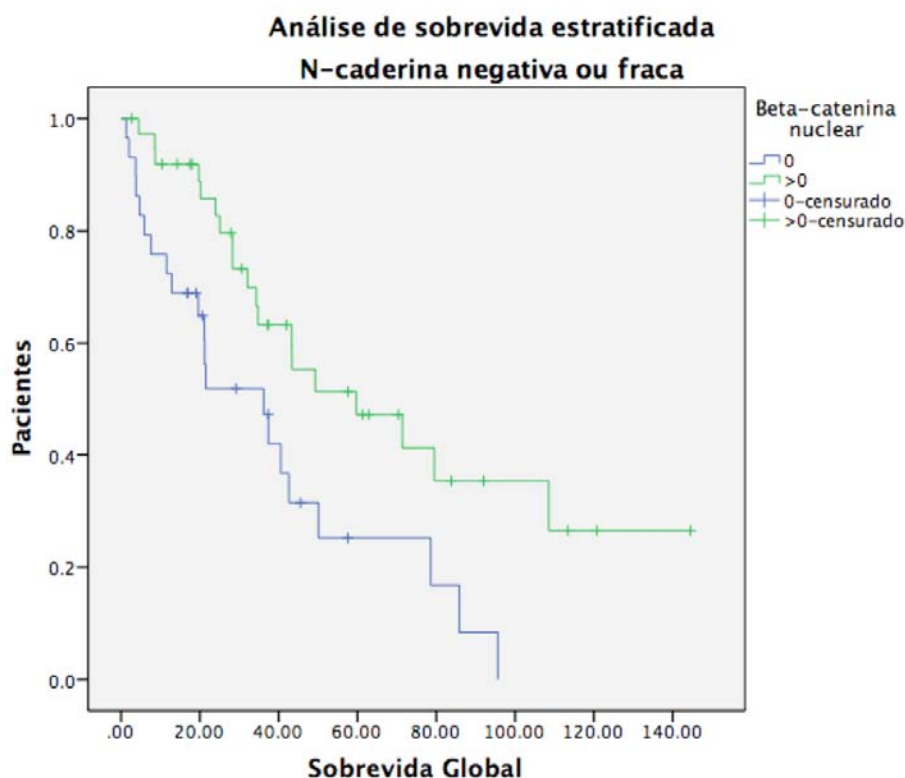


Figura 18 - Análise de sobrevida dos pacientes com N-caderina negativa estratificada pela beta-catenina nuclear ($p=0.007$)

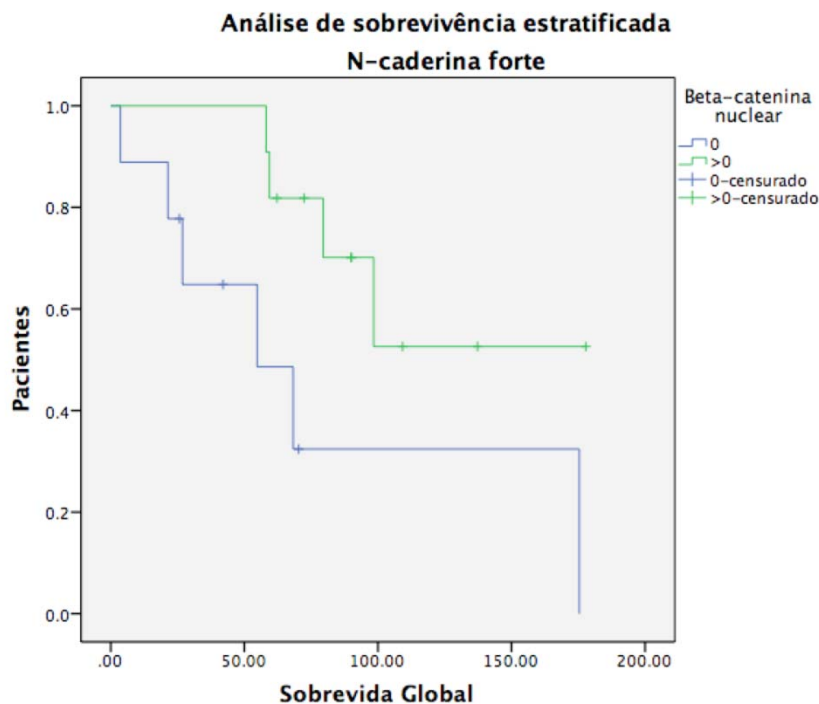


Figura 19 - Análise de sobrevida dos pacientes com N-caderina forte pela beta-catenina nuclear ($p = 0.035$)

Após esses achados positivos, criamos a variável N-caderina positiva/Beta catenina nuclear positiva, no intuito de avaliar o papel prognóstico conjunto dos dois marcadores. Feito isso, encontramos que se ambos os marcadores positivos, a SG mediana não foi atingida, enquanto que se ambos negativos, SG mediana era de 43.33 meses ($p = 0.004$). Figura 20.

A mesma variável N-caderina positiva/Beta catenina nuclear positiva, agora avaliando por SLP, encontramos que quando positivo, SLPm foi 125.5 enquanto quando ambos negativos, foi 51.9m ($p = 0.004$ IC 18.9 – 45.04), conforme disposto na Figura 21.

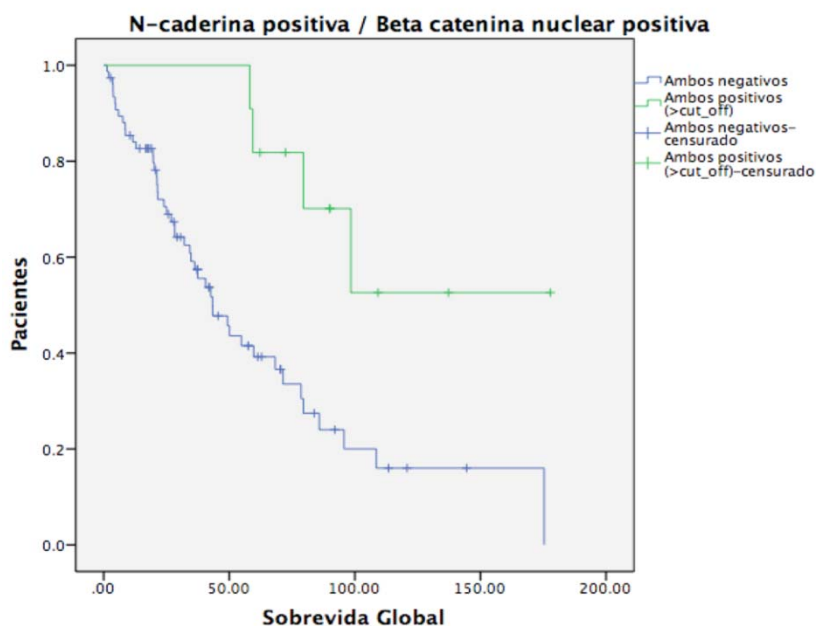


Figura 20 - Análise da sobrevida global se Beta-catenina positiva e N caderina positiva versus Beta-catenina negativa e N-caderina negativa. Observamos grande separação das curvas, com significância estatística ($p = 0.0004$).

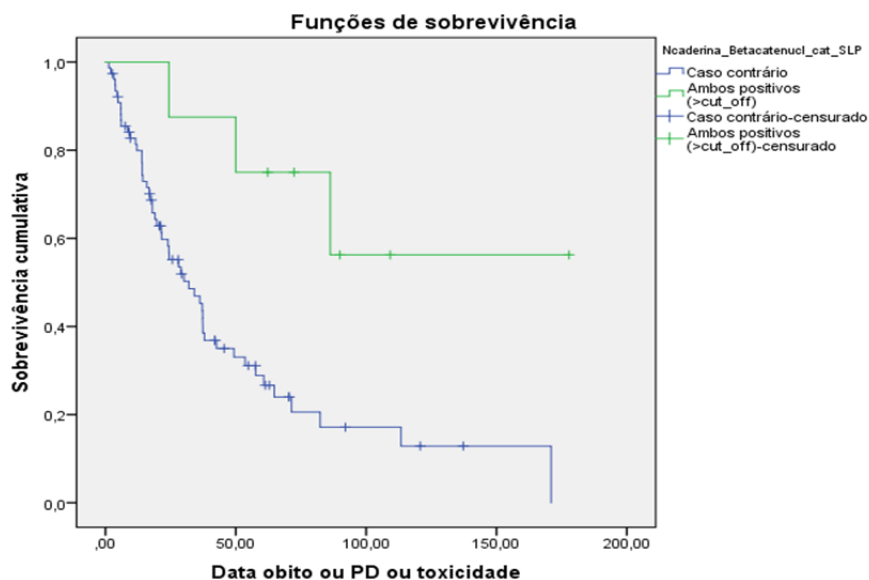


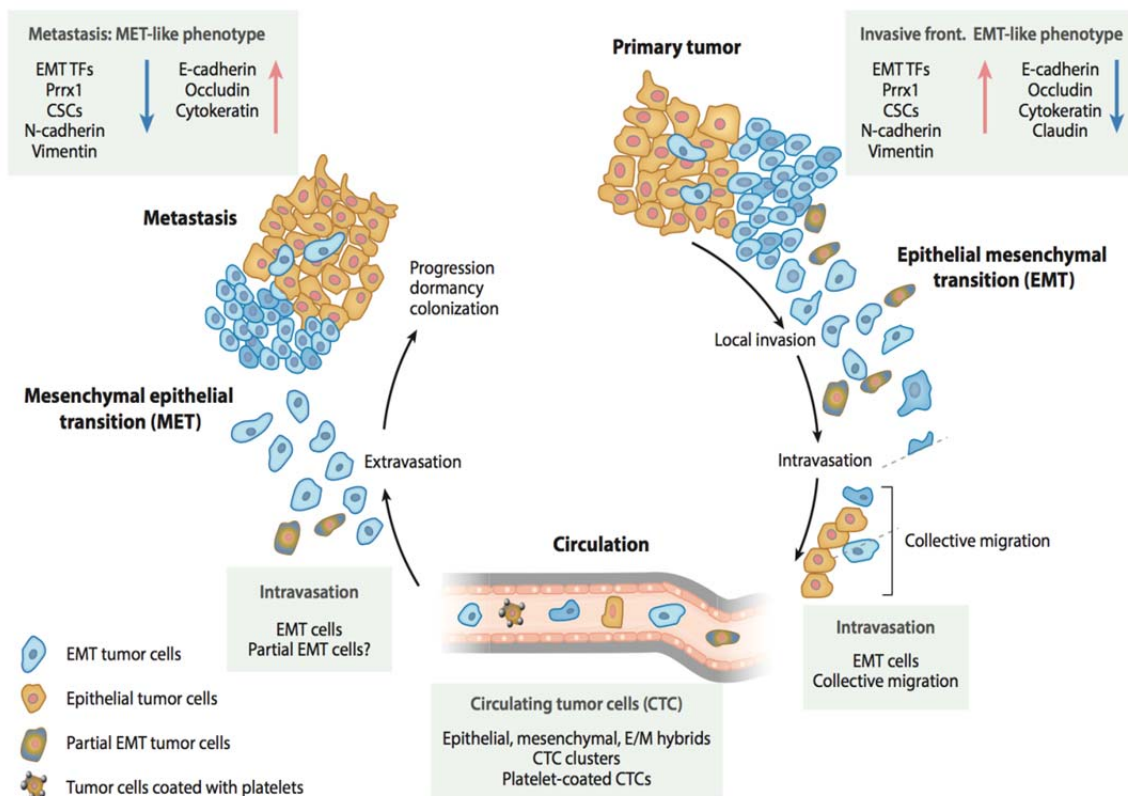
Figura 21 - Análise da sobrevida livre de progressão se Beta-catenina positiva e N caderina positiva versus Beta-catenina negativa e N-caderina negativa. Observamos grande separação das curvas, com significância estatística ($p = 0.008$).

5 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, um grande esforço de toda a comunidade científica tem sido feito para que a biologia básica tumoral e as vias de carcinogênese sejam melhor compreendidas, e que então novos tratamentos possam levar a diminuição da mortalidade e morbidade pelas doenças oncológicas. Apesar disso, mais de 90% dos óbitos relacionados ao câncer ainda são devido a existência e a progressão de metástases (MEHLEN e PUISIEUX 2006). A capacidade biológica de crescimento, proliferação e metástase tumoral foi bem descrita no clássico artigo *Hallmarks of Cancer*, (HANAHAN e WEINBERG 2000, 2011). Ele descreve seis capacidades biológicas constitucionais dos tumores: sinalização sustentada de proliferação, capacidade de evasão dos supressores de crescimento, resistência a morte celular, replicação imortal, indução da angiogênese e capacidade de invasão e metástase.

Na primeira publicação desse artigo, em 2000, a capacidade de invasão e metástase situava-se meramente no campo especulativo. Sabia-se, entretanto, que uma série de alterações morfológicas aconteciam na célula tumoral para que ela se tornasse mais agressiva, facilitando o processo de metástase. A primeira alteração conhecida e a que se tornou o hallmark desse processo é a perda da caderina de epitélio (E-caderina). Esse processo recebeu o nome de transição epitélio-mesênquima e com o avançar da luz científica foi visto que além da perda de E-caderina, várias

outras proteínas de expressão epiteliais são perdidas, tais como claudina, ocludina, e citoqueratinas (LAMOUILLE et al. 2014). Concomitantemente, há o aumento da expressão de marcadores mesenquimais celulares, incluindo N-caderina, vimentina, fibronectina e proteína específica do fibroblasto. Esse processo leva a uma série de alterações morfológicas celulares, como perda da polarização ápico-basal celular, diminuição do poder de adesão célula-célula, alongamento celular, aumentando o poder de invasão e metástase tumoral. Além do grande potencial metastático das células que sofreram TEM, existem evidências que essas células se tornam mais parecidas com as células-tronco (stemness), com alto poder de plasticidade, podendo se indiferenciar e se rediferenciar em diferentes graus e a qualquer momento da sua evolução (NIETO et al. 2016). Trata-se de um processo dinâmico, progressivo e reversível, que acontece principalmente no tumor primário.

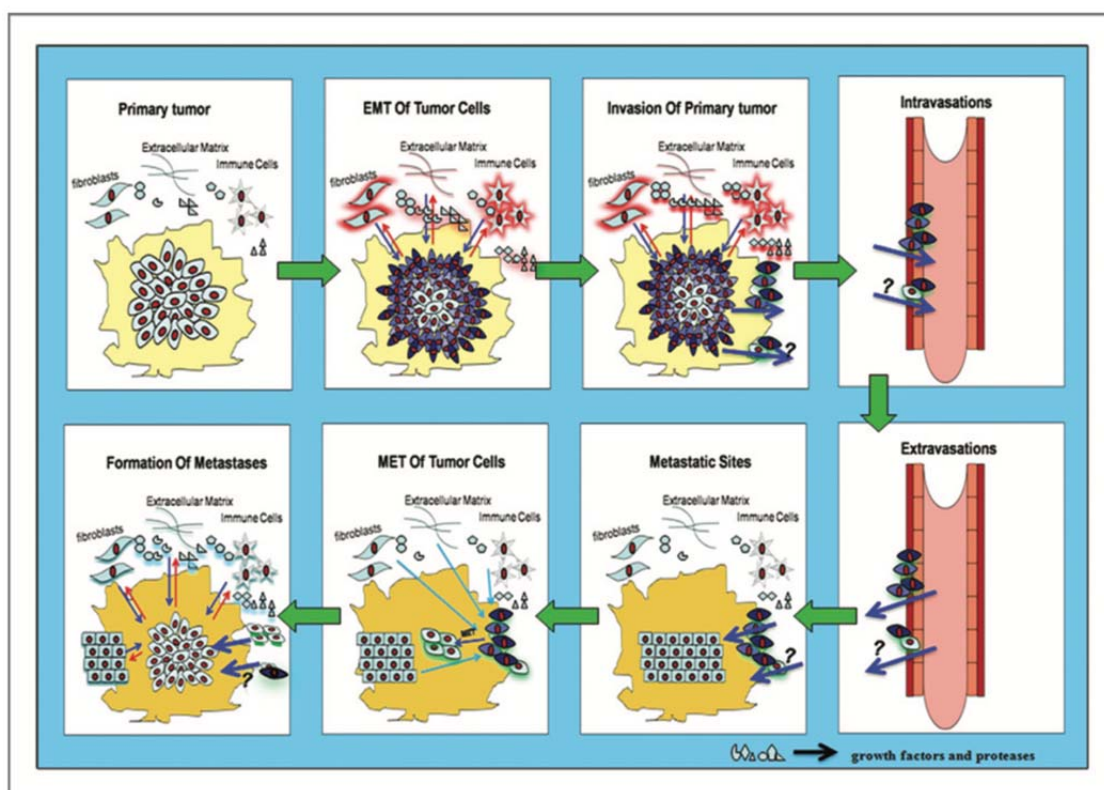


Fonte: Adaptada de MITTAL (2018).

Figura 22 - Plasticidade celular na cascata de metástase: processo de transição epitélio-mesênquima e transição mesênquima-epitélio

Esse esquema ilustra a complexidade da cascata de metástase, do ponto de vista da plasticidade celular. Ele mostra a heterogeneidade celular do tumor primário e as diferentes estratégias que as células tumorais adquirem para sobreviver na corrente sanguínea e colonizar sítios distantes. TEM é um evento focal limitado no tumor primário que pode acontecer após interação das células tumorais com o microambiente em que se localizam fibroblastos associados ao câncer, células imunes, incluindo células killers T e B, entre outras células. O estroma circunjacente também inclui macrófagos associados ao tumor e outras células derivadas da medula óssea. Após o

extravasamento, as células tumorais circulantes penetram no parênquima do órgão alvo e iniciam a colonização. Para que isso ocorra da forma devida, ocorre o processo de transição mesênquima-epitélio. O fato de as células tumorais de metástases terem fenótipo epitelial é consistente com essa plasticidade descrita.



Fonte: Adaptada de CHAO et al. (2010)

Figura 23 - Mudanças fenotípicas na célula durante o processo de metástase

Mecanismos de mudança fenotípica na célula no processo de metástase. TEM e TME tem um papel importante no processo de metástase. Durante a mudança de fenótipo, comunicações complexas ocorrem entre fibroblasto, matriz extracelular, células imunes e células tumorais. Essas

interações podem influenciar a progressão do câncer em todos os seus estágios.

Essa frente de invasão com células parcialmente ou totalmente submetidas a TEM, além de células com potencial de células-tronco, promove invasão para a corrente sanguínea. Esse processo de invasão da camada endotelial e entrada para a circulação sanguínea é chamado intravasamento e o processo de saída da circulação e invasão de tecidos a distância é chamado extravasamento. Estudos utilizando videomicroscopia intravivo de alta resolução indicam que essas células tumorais circulantes são protegidas por um complexo de três células chamado microambiente metastático, composto por macrófago, célula tumoral e célula endotelial. (HARNEY et al. 2015; MITTAL 2018).

A célula tumoral circulante (CTC) no microambiente metastático pode ter fenótipo epitelial, de TEM ou híbrido. A monitorização e a avaliação do fenótipo das CTCs têm se mostrado prognóstico em vários tipos de tumores. Em geral, pacientes refratários a terapia sistêmica e os que progridem mais rápido, tem um fenótipo mesenquimal de CTC e os que respondem melhor ao tratamento têm o fenótipo mais próximo ao epitelial (YU et al. 2013). Ainda se faz necessário estudos mais bem desenhados das CTCs, a fim de entender o potencial de invasibilidade e metástase desse complexo.

A CTC adere ao endotélio vascular no órgão metastático alvo e inicia o processo de extravasamento, migrando para o parênquima por meio de uma variedade de mecanismos (MASSAGUE 2016). Há evidência de que Twist e Snail1 podem contribuir para o extravasamento, estimulando

protrusões semelhantes a filopoidia (STOLETOV et al. 2010; SHIBUE et al. 2012). Isso indica que a TEM estimula o processo inicial de colonização das metástases. Ao atingir o nicho metastático, as células tumorais podem seguir dois caminhos: um fenótipo de parada do ciclo celular, caracterizando um estado quiescente celular ou podem formar grupos de micrometástases multicelulares, que eventualmente irão atingir o estado de macrometástase (OCAÑA et al. 2012; DEL POZO MARTIN et al. 2015).

Esse grupo multicelular sofre então, novamente uma re-diferenciação por meio do processo de transição mesênquima-epitélio (TME), adquirindo características fenotípicas semelhantes a região central do seu tumor primário, que não sofreu o processo de TEM (QIAN et al. 2015; CALON et al. 2015; PLAKS et al. 2015; NIETO et al. 2016).

A nossa análise foi desenhada para avaliação do papel prognóstico dos marcadores imuno-histoquímicos E-caderina, N-caderina e Beta-catenina na metástase de carcinoma de células renais. Esses marcadores estão intrinsecamente relacionados a Transição epitélio-mesênquima e Transição mesênquima-epitélio, podendo sugerir ou até mesmo esclarecer a ativação dessas vias de transição na metástase do CCRm.

A avaliação de E-caderina mostrou-se quase que homogeneamente positiva fraca na metástase de carcinoma de células claras renal e sem papel prognóstico em termos de sobrevida global e sobrevida livre de progressão. A E-caderina já foi avaliada em carcinoma primário renal e não há consenso quanto ao seu papel prognóstico. ZHANG et al. (2017) demonstrou que tumores primários com E-caderina positiva têm melhor

prognóstico em termos de sobrevida livre de progressão, mas não de sobrevida global ($p=0.06$). Por outro lado, LANGNER et al. (2004) não mostrou maior sobrevida livre de progressão ou sobrevida global para os pacientes com E-caderina positiva. Apesar disso, todas as análises de E-caderina avaliados por imunohistoquímica demonstram ou tem tendência em demonstrar, correlação entre maior grau tumoral, maior estadiamento e perda de E-caderina na membrana no carcinoma renal primário (KATAGIRI et al. 1995; LANGNER et al. 2004; ZHANG et al. 2017). Não encontramos descrição prévia na literatura de análise imuno-histoquímica da metástase de carcinoma de células claras renal.

Com relação a N-caderina, observamos positividade de 23% ($n=20$) das amostras de metástases, sugerindo manutenção da ativação da via de transição epitélio-mesênquima nesses pacientes. A N-caderina positiva teve impacto positivo tanto em termos de sobrevida global quanto em sobrevida livre de progressão, quando comparado a N-caderina negativa (98.3m x 42.6m $p = 0.01$; 86.2m x 30.1m, $p = 0,004$, respectivamente, conforme demonstrado nas Figuras 13 e 16). Novamente, não encontramos análises imunohistoquímicas descritas de N-caderina na metástase de carcinoma de células claras renal.

A beta-catenina foi observada na membrana, no citoplasma e no núcleo celular. Observamos correlação inversa entre a presença de beta-catenina de membrana e da beta-catenina nuclear: dos 50 casos com beta-catenina nuclear positiva, 48 (96%) estão negativos na membrana, sugerindo perda de ancoragem com a E-caderina, concomitante a ativação

simultânea da via WNT. Assim, há o acúmulo de beta-catenina citoplasmática, que migra para o núcleo para ativação de transcrição, levando a carcinogênese.

Apesar dessa correlação positiva e com racional biológico forte, a beta-catenina de membrana e a citoplasmática não tiveram papel em termos de sobrevida global e de sobrevida livre de progressão. Por outro lado, a beta-catenina nuclear positiva, que também sugere ativação da transição epitélio mesênquima e da via WNT e estava presente em 38% dos casos, teve forte impacto na sobrevida global e na sobrevida livre de progressão, quando comparado a beta-catenina nuclear negativa (79.5m x 32.4m $p < 0.001$; 37.3m x 21.5m $p = 0.01$, conforme demonstrado nas Figuras 14 e 17). Além disso, em conjunto com a Classificação clinico-laboratorial do IMDC, ela foi positiva na análise do modelo de Cox múltiplo, inferindo que é uma variável prognóstica independente.

Os nossos dados vão ao exato encontro das teorias de transição epitélio-mesênquima, que ocorre no tumor primário e na circulação sanguínea e da transição mesênquima-epitélio, que ocorre na metástase. Inicialmente a teoria da TME foi questionada pela comunidade científica, mas evidências recentes têm corroborado a sua existência. CHAO et al. (2010) demonstrou que após administrar células de câncer de mama humano com fenótipo mesenquimal em ratos, os focos metastáticos pulmonares apresentaram E-caderina positiva, sugerindo a existência do processo de TME. Outro estudo, publicado por DYKXHOORN et al. (2009) foi feito implantando 4 linhagens celulares diferentes de câncer de mama

(67NR, 168FARN, 4TO7 e 4T1) em ratos. Apenas a linhagem epitelial (4T1) foi capaz de formar macrometástases nos pulmões e fígado, sugerindo que TEM por si só não é útil para a colonização do órgão alvo e formação do sítio metastático e que a TME é necessário para tal.

Por isso, é provável que a transição mesênquima-epitélio seja fundamental para que as células tumorais disseminadas (do inglês disseminated tumor cells – DTCs) consigam colonizar de forma apropriada o órgão alvo e para que o processo de metastatização seja eficiente.

De forma surpreendente, porém favorecendo o racional biológico, a sobrevida global e sobrevida livre de progressão dos pacientes analisados com TEM ativada na metástase demonstrou-se estatisticamente superior quando comparada a dos pacientes com N-caderina negativa e dos pacientes com Beta-catenina nuclear negativa, que seriam os pacientes com fenótipo epitelial (por não ativação prévia da TEM ou por ativação da transição mesênquima-epitélio na metástase). Isso sugere que a manutenção do fenótipo mesenquimal na metástase não promove crescimento e multiplicação dessa lesão secundária, dificultando a sobrevivência da metástase e tornando o processo de colonização metastática pelas DTCs ineficiente. O contrário ocorre nos tumores que sofreram transição mesênquima-epitélio e agora se apresentam com fenótipo epitelial na metástase. O fenótipo epitelial facilita a colonização metastática pelas DTCs através da interação célula-a-célula e do estímulo ao crescimento celular, que eventualmente farão dessa lesão uma macrometástase.

Ao avaliarmos a variável Beta-catenina positiva/N-caderina positiva, notamos que a SG mediana da variável positiva não foi atingida, enquanto que se ambas negativas, SG mediana foi de 43.33 meses, conforme bem demonstrado na curva de sobrevida Figura 20. Isso pode indicar que a positividade da beta-catenina nuclear e da N-caderina provavelmente não estão relacionadas, e fazem parte de processos diferentes, porém que levam ao mesmo produto final. Se ambas estão negativas, a transição mesênquima-epitélio não está ativada por nenhum processo, e por isso a SG chega a ser superior do que se uma ou outra estivesse positiva.

Quanto a realização de metastasectomia, demonstramos ganho importante em sobrevida global com a realização do procedimento (98.3m x 26.8m p <0.0001). O artigo referente a análise dos pacientes submetidos a metastasectomia está em processo de publicação e encontra-se anexo a este manuscrito.

Em relação a análise da relação neutrófilo-linfócito (RNL), observamos que pacientes com RNL alta (>4.09, de acordo com seu ponto de corte) tiveram sobrevida global e sobrevida livre de progressão inferior aos com RNL baixa (<=4.09) (58.1m x 11.4m p<0.0001 e 30.1m x 9.5m p <0.0001). Dados prognósticos e até mesmo preditivos da relação neutrófilo-linfócitos têm sido extensamente discutidos e publicados e este não é o escopo principal deste trabalho (TEMPLETON et al. 2016).

Nossos dados não suportam correlação estatística entre N-caderina e a classificação prognóstica IMDC ou N-caderina com a relação neutrófilo-linfócito, mostrando que tratam-se de fatores prognósticos diferentes. Além

disso, a beta-catenina nuclear também não apresentou correlação com a classificação prognóstica do IMDC ou com a relação neutrófilo-linfócito.

Nosso estudo se faz inédito na comunidade científica por diversos pontos de metodologia e de resultados encontrados. Quanto a metodologia, é o primeiro estudo a avaliar o processo de transição epitélio-mesênquima e mesênquima-epitélio em tecido metastático humano de carcinoma de células renais. Também é o primeiro estudo a se avaliar biomarcadores na metástase de carcinoma renal metastático.

Além disso, esse foi o primeiro estudo a demonstrar diferença na sobrevida a depender da ativação da via mesênquima-epitélio no tecido metastático, podendo futuramente, guiar os esforços da comunidade acadêmico-científica nesse sentido.

6 CONCLUSÃO

- 1 Quando avaliadas na metástase de carcinoma de células claras renal, as proteínas N-caderina e Beta-catenina nuclear têm papel prognóstico para sobrevida global, sendo que a Beta-catenina nuclear mostrou-se ser uma variável de importância prognóstica independente das outras variáveis.
- 2 Quando avaliadas na metástase de carcinoma de células claras renal, as proteínas N-caderina e Beta-catenina nuclear têm papel prognóstico para sobrevida livre de progressão.
- 3 Concluímos nosso trabalho levantando a importância do fenótipo epitelial para o adequado crescimento da metástase de carcinoma de células claras renal e sugerindo que estudos prospectivos e com análise de expressão gênica sejam desenhados a fim do melhor esclarecimento dessa via de carcinogênese tumoral.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alimohamed N, Lee JL, Srinivas S, et al. A population-based overview of sequences of targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma. **Clin Genitourin Cancer** 2014; 12:e127-31.

Berx G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2009; 1:a003129.

Bilen MA, Dutcher GMA, Liu Y, et al. Association between pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio and outcome of patients with metastatic renal cell carcinoma treated with nivolumab. **Clin Genitourin Cancer** 2018; 16:e563-e75.

Bono P, Rautiola J, Ultrainen T, et al. Hypertension as predictor of sunitinib treatment outcome in metastatic renal cell carcinoma. **Acta Oncol** 2011; 50:569-73.

Brannon AR, Reddy A, Seiler M, et al. Molecular stratification of clear cell renal cell carcinoma by consensus clustering reveals distinct subtypes and survival patterns. **Genes Cancer** 2010; 1:152-63.

Bratslavsky G, Sudarshan S, Neckers L, Linehan WM. Pseudohypoxic pathways in renal cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2007; 13:4667-71.

Buda-Nowak A, Kucharz J, Dumnicka P, et al. Sunitinib-induced hypothyroidism predicts progression-free survival in metastatic renal cell carcinoma patients. **Med Oncol** 2017; 34:68.

Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llargo A, et al. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. **Nat Genet** 2015; 47:320-9.

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. **Nature** 2013; 499:43-9.

Chand VK, Sidloski J, Clamon G, et al. Long-term follow-up in patients with metastatic renal cell cancer not treated with IL-2 [abstract]. **J Clin Oncol** 2005; 23(16 suppl):4597. [Presented at Annual Meeting on May 29-June 2 2015 in Chicago, Illinois]

Chao YL, Shepard CR, Wells A. Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. **Mol Cancer** 2010. 9:179

Chen HN, Yuan K, Xie N, et al. PDLIM1 Stabilizes the E-Cadherin/beta-catenin complex to prevent epithelial-mesenchymal transition and metastatic potential of colorectal cancer cells. **Cancer Res** 2016; 76:1122-34.

Choudhury Y, Wei X, Chu Y-H, et al. A multigene assay identifying distinct prognostic subtypes of clear cell renal cell carcinoma with differential response to tyrosine kinase inhibition. **Eur Urol** 2015; 67:17-20.

da Costa WH, Rezende M, Carneiro FC, et al. Polybromo-1 (PBRM1), a SWI/SNF complex subunit is a prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. **BJU Int** 2014; 113:E157-63.

da Costa WH, da Cunha IW, Fares AF, et al. Prognostic impact of concomitant loss of PBRM1 and BAP1 protein expression in early stages of clear cell renal cell carcinoma. **Urol Oncol** 2018; 36:243.e1-243.e8.

Dancey JE, Dobbin KK, Groshen S, et al. Guidelines for the development and incorporation of biomarker studies in early clinical trials of novel agents. **Clin Cancer Res** 2010; 16:1745-55.

Del Pozo Martin Y, Park D, Ramachandran A, et al. Mesenchymal cancer cell-stroma crosstalk promotes niche activation, epithelial reversion, and metastatic colonization. **Cell Rep** 2015; 13:2456- 69.

Dykxhoorn DM, Wu Y, Xie H, et al. miR-200 enhances mouse breast cancer cell colonization to form distant metastases. **PLoS ONE** 2009; 4:e7181.

Escudier B, Bellmunt J, Négrier S, et al. Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival. **J Clin Oncol** 2010; 28:2144-50.

[FDA] U.S. Food & Drug Administration. **FDA approves nivolumab plus ipilimumab combination for intermediate or poor-risk advanced renal cell carcinoma**. Available from: <URL:<https://bit.ly/2z4JXJI>> [2018 mai 12]

Ferlay HR, Shin F, Bray D, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer** 2010; 15:2893-17.

Funakoshi T, Lee CH, Hsieh JJ. A systematic review of predictive and prognostic biomarkers for VEGF-targeted therapy in renal cell carcinoma. **Cancer Treat Rev** 2014; 40:533-47.

Gerlinger M, Quezada SA, Peggs KS, et al. Ultra-deep T cell receptor sequencing reveals the complexity and intratumour heterogeneity of T cell clones in renal cell carcinomas. **J Pathol** 2013; 231:424-32.

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. **N Engl J Med** 2012; 366:883-92.

Gnarra JR, Tory K, Weng Y. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. **Nat Genet** 1994; 7:85-90.

Grambsch PM, Therneau TM. Proportional hazards tests and diagnostics based on weighted residuals. **Biometrika** 1994; 81:515-26.

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

Hakimi AA, Chen YB, Wren J, et al. Clinical and pathologic impact of select chromatin-modulating tumor suppressors in clear cell renal cell carcinoma. **Eur Urol** 2013; 63:848-54.

Harney AS, Arwert EN, Entenberg D, et al. Real-time imaging reveals local, transient vascular permeability, and tumor cell intravasation stimulated by TIE2^{hi} macrophage-derived VEGFA. **Cancer Discov** 2015; 5:932-43.

Heng DY, Xie W, Regan MM, et al. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study. **J Clin Oncol** 2009; 27:5794-9.

Hsieh JJ, Chen D, Wang PI, et al. Genomic biomarkers of a randomized trial comparing first-line everolimus and sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. **Eur Urol** 2017a; 71:405-414.

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

Hu K, Lou L, Ye J, et al. Prognostic role of neutrophil-lymphocyte ratio in renal cell carcinoma: a meta-analysis. **BMJ Open** 2015; 5:e006404.

Hudes G, Carducci M, Tomczak P, et al. Temsirolimus, interferon α , or both for advanced renal-cell carcinoma. **N Engl J Med** 2007; 356:2271-81.

Kandouz M, Alachkar A, Zhang L, et al. Teucrium polium plant extract inhibits cell invasion and motility of human prostate cancer cells via the restoration of the E-cadherin/catenin complex. **J Ethnopharmacol** 2010; 129:410-5.

Kapitsinou PP, Haase, VH. The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice. **Cell Death Differ** 2008; 15:650-9.

Katagiri A, Watanabe R, Tomita Y. E-cadherin expression. in renal cell cancer and its significance in metastasis and survival. **Br J Cancer** 1995; 71:376-9.

Knox JJ, Barrios CH, Kim TM, et al. Final overall survival analysis for the phase II RECORD-3 study of first-line everolimus followed by sunitinib versus first-line sunitinib followed by everolimus in metastatic RCC. **Ann Oncol** 2017; 28:1339-45.

Krabbe LM, Westerman ME, Bagrodia A, et al. Dysregulation of beta-catenin is an independent predictor of oncological outcomes in patients with clear cell renal cell carcinoma. **J Urol** 2014; 191:1671-7.

Laird A, Harrison DJ, Stewart GD. The development of prognostic and predictive biomarkers in renal cell cancer are not one and the same thing. **Eur Urol** 2015; 67:21-2.

Lalani AA, Xie W, Martini DJ, et al. Change in neutrophil-to-lymphocyte ratio in response to immune checkpoint blockade for metastatic renal cell carcinoma. **J Immunother Cancer** 2018; 6:5.

Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2014; 15:178-96.

Langner C, Ratschek M, Rehak P, et al. Expression of MUC1 (EMA) and E-cadherin in renal cell carcinoma: a systematic immunohistochemical analysis of 188 cases. **Mod Pathol** 2004; 17:180-8.

Lausen B, Schumacher M. Maximally selected rank statistics. **Biometrics** 1992; 48:7-85.

Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, et al. European Association of Urology Guideline Group. EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. **Eur Uro** 2010; 58:398-406.

MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. **Dev Cell** 2009; 17:9-26.

Massague J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature** 2016; 529:298-306.

Masson N, Ratcliffe, PJ. Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. **Cancer Metab** 2014; 2:3.

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.

McLaughlin J, Lipworth L, Tarone R, et al. Epidemiologic aspects of renal cell carcinoma. **Semin Oncol** 2006; 33:527-33.

Mittal V. Epithelial to mesenchymal Transition in tumor metastasis. **Annu Rev Pathol Mech Dis** 2018; 13:395-412.

Noone AM, Howlader N, Krapcho M, et al. **SEER Cancer statistics review, 1975-2015**. Released April 16, 2018. <URL:<https://bit.ly/2HeOrl0>> [2018 mai 16]

Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. **J Clin Oncol** 1999; 17:2530-40.

Motzer RJ, Bazik J, Murphy BA. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2002; 20:289-96.

Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2006; 2:16-24.

Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal cell carcinoma. **N Engl J Med** 2007; 356:115-24.

Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2009; 27:3584-90.

Motzer RJ, Barros CH, Kim TM, et al. Phase II Randomized trial comparing sequential first-line everolimus and second-line sunitinib versus first-line sunitinib and second-line everolimus in patients with metastatic renal cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2014; 32: 2765-72.

Motzer RJ, Hutson TE, Cella D, et al. Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal cell carcinoma. **N Engl J Med** 2013; 369:722-31.

Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, et al. Nivolumab versus everolimus in advanced renal cell carcinoma. **N Engl J Med** 2015; 373:1803-13.

Motzer RJ, Tannir NM, McDermott, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced renal-cell-carcinoma. **N Engl J Med** 2018; 378:1277-90.

Nieto MA, Huang RYJ, Jackson RA, et al. EMT: 2016. **Cell** 2016; 30:166:21-45.

Nixon AB, Halabi S, Shterev I, et al. Identification of predictive biomarkers of overall survival (OS) in patients (pts) with advanced renal cell carcinoma (RCC) treated with interferon alpha (I) with or without bevacizumab (B): Results from CALGB 90206 (Alliance) [abstract]. **J Clin Oncol** 2013; 31(suppl 15):4520. [Presented at 49th Annual Meeting of the American-Society-of-Clinical-Oncology (ASCO; 2013 May 31-Jun 04; Chicago, IL].

Ocaña OH, Corcoles R, Fabra A, et al. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. **Cancer Cell** 2012; 22:709-24.

Pena-Llopis S, Vega-Rubín-de-Celis S, Liao A, et al. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. **Nat Genet** 2012; 44:751-9.

Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? **Cell Stem Cell** 2015; 16:225-38.

Qian BZ, Zhang H, Li J, et al. FLT1 signaling in metastasis associated macrophages activates an inflammatory signature that promotes breast cancer metastasis. **J Exp Med** 2015; 212:1433-48.

Rini BI. Vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma: current status and future directions. **Clin Cancer Res** 2007; 13:1098-106.

Rini BI, Halabi S, Rosember JE, et al. Bevacizumab plus interferon alfa compared with interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALGB 90206. **J Clin Oncol** 2008; 26:5422-8.

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

Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, et al. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. **Nat Genet** 2013; 45:860-7.

Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. **J Clin Invest** 2013; 123, 3664-71.

Serie DJ, Joseph RW, Cheville JC, et al. Clear cell type A and B molecular subtypes in metastatic clear cell renal cell carcinoma: tumor heterogeneity and aggressiveness. **Eur Urol** 2017; 71:979-85.

Shibue T, Brooks MW, Inan MF, et al. The outgrowth of micrometastases is enabled by the formation of filopodium-like protrusions. **Cancer Discov** 2012; 2:706-21.

Schoenfeld D. Partial residuals for the proportional hazard regression model. **Biometrika** 1982; 69:329-241.

Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. **J Natl Cancer Inst** 2009; 101:1446-52.

Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J, et al. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. **J Clin Oncol** 2010; 28:1061-8.

Stewart GD, O'Mahony FC, Laird A, et al. Sunitinib treatment exacerbates intratumoral heterogeneity in metastatic renal cancer. **Clin Cancer Res** 2015; 21:4212-23.

Stoletov K, Kato H, Zardouzian E, et al. Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. **J Cell Sci** 2010; 123:2332-41.

Su Y, Simmen RC. Soy isoflavone genistein upregulates epithelial adhesion molecule E-cadherin expression and attenuates beta-catenin signaling in mammary epithelial cells. **Carcinogenesis** 2009; 30:331-9.

Sun XX, Yu Q. Intra-tumor heterogeneity of cancer cells and its implications for cancer treatment. **Acta Pharmacol Sin** 2015; 36:1219-27.

Templeton AJ, Knox JJ, Lin X, et al. Change in neutrophil-to-lymphocyte ratio in response to targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma as a prognosticator and biomarker of efficacy. **Eur Urol** 2016; 70:358-64.

Tian X, Liu Z, Niu B, et al. E-cadherin/ β -catenin complex and the epithelial barrier. **J Biomed Biotechnol** 2011; 2011:567305.

Tran HT, Liu Y, Zurita AJ, et al. Prognostic or predictive plasma cytokines and angiogenic factors for patients treated with pazopanib for metastatic renal-cell cancer: a retrospective analysis of phase 2 and phase 3 trials. **Lancet Oncol** 2012; 13:827-37.

Tseng RC, Lee SH, Hsu HS, et al. SLIT2 attenuation during lung cancer progression deregulates beta-catenin and E-cadherin and associates with poor prognosis. **Cancer Res** 2010; 70:543-51.

Wei EY, Hsieh JJ. A river model to map convergent cancer evolution and guide therapy in RCC. **Nat Rev Urol** 2015; 12:706-12.

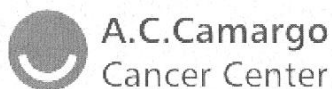
Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. **J Cell Sci** 2008; 121:727-35.

Yu M, Bardia A, Wittner BS, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. **Science** 2013; 339:580-84.

Zaldumbide L, Erramuzpe A, Guarch R, Pulido R, Cortés JM, López JI. Snail heterogeneity in clear cell renal cell carcinoma. **BMC Cancer** 2016; 16:194.

Zhang X, Yang M, Shi H et al. Reduced E-cadherin facilitates renal cell carcinoma progression by WNT/ β -catenin signaling activation. **Oncotarget** 2017; 8:19566-76.

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



Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 15 de julho de 2016.

À
Dra. Isabela Werneck da Cunha
Aluna: Aline Fusco Fares (Mestrado)

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

“Análise da expressão de beta catenina, e-caderina e n-caderina em carcinoma de células renais metastático”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **12/07/2016**, **tomaram conhecimento e aprovaram** os seguintes documentos:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático intitulado: “Expressão imunistoquímica e valor prognóstico de um painel de marcadores (BAP1; Beta-Catenina; CD133; Complexo Ezrina-Moesina; EPO/EPO-R; FOXP3; KDM5C; NOS-3; PBRM1; PTEN; REN/REN-R; SETD2 e STAT3) em carcinoma de células renais. Estudo multicêntrico internacional”, registrado neste CEP sob nº 2144/15. O projeto afiliado em referência será Dissertação de Mestrado da aluna *Aline Fusco Fares*.
- Dissertação de Mestrado – datado de 28 de junho de 2016

Atenciosamente,



Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Apêndice 1 - Ficha de coleta de dados

Nome:																			
RGH:			Idade:																
Gênero:			Etnia:																
Data da nefrectomia:																			
2010 AJCC T Stage:																			
2010 N Stage:																			
EC:																			
I	II	III	IV																
Histologia:																			
<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">1- Células claras</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2- Papilar</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">3- Cromóforo</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">4- Caract sarcomatóides</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">5- Sarcomatóide puro</td> </tr> </table>					1- Células claras	2- Papilar	3- Cromóforo	4- Caract sarcomatóides	5- Sarcomatóide puro										
1- Células claras																			
2- Papilar																			
3- Cromóforo																			
4- Caract sarcomatóides																			
5- Sarcomatóide puro																			
Grau do TU:																			
1	2	3	4																
Data do diagnóstico da metástase:																			
Sítios metastáticos:																			
<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">1 - lung</td> <td style="text-align: center;">2 - bones</td> <td style="text-align: center;">3 - liver</td> <td style="text-align: center;">4 - CNS</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">5 - Lymphnodes</td> <td style="text-align: center;">6 - skin</td> <td style="text-align: center;">88 - other</td> <td style="text-align: center;">99 - unknown</td> <td style="text-align: center;">0 - N/A</td> </tr> </table>					1 - lung	2 - bones	3 - liver	4 - CNS		5 - Lymphnodes	6 - skin	88 - other	99 - unknown	0 - N/A					
1 - lung	2 - bones	3 - liver	4 - CNS																
5 - Lymphnodes	6 - skin	88 - other	99 - unknown	0 - N/A															
Terapia sistêmica 1:																			
<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">1 - sunitinib</td> <td style="text-align: center;">2 - sorafenib</td> <td style="text-align: center;">3 - pazopanib</td> <td colspan="2" style="text-align: center;">4 - temsirolimus</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">5 - interferon</td> <td style="text-align: center;">6 - interferon + bev</td> <td style="text-align: center;">7 - interleucina</td> <td colspan="2" style="text-align: center;">8 - everolimus</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">9 - axitinib</td> <td style="text-align: center;">88 - outro</td> <td style="text-align: center;">99 - desconhecido</td> <td colspan="2" style="text-align: center;">0-N/A</td> </tr> </table>					1 - sunitinib	2 - sorafenib	3 - pazopanib	4 - temsirolimus		5 - interferon	6 - interferon + bev	7 - interleucina	8 - everolimus		9 - axitinib	88 - outro	99 - desconhecido	0-N/A	
1 - sunitinib	2 - sorafenib	3 - pazopanib	4 - temsirolimus																
5 - interferon	6 - interferon + bev	7 - interleucina	8 - everolimus																
9 - axitinib	88 - outro	99 - desconhecido	0-N/A																
Início:																			
Final:																			
Terapia sistêmica 2:																			
<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">1 - sunitinib</td> <td style="text-align: center;">2 - sorafenib</td> <td style="text-align: center;">3 - pazopanib</td> <td colspan="2" style="text-align: center;">4 - temsirolimus</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">5 - interferon</td> <td style="text-align: center;">6 - interferon + bev</td> <td style="text-align: center;">7 - interleukin</td> <td colspan="2" style="text-align: center;">8 - everolimus</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">9 - axitinib</td> <td style="text-align: center;">88 - outro</td> <td style="text-align: center;">99 - desconhecido</td> <td colspan="2" style="text-align: center;">0-N/A</td> </tr> </table>					1 - sunitinib	2 - sorafenib	3 - pazopanib	4 - temsirolimus		5 - interferon	6 - interferon + bev	7 - interleukin	8 - everolimus		9 - axitinib	88 - outro	99 - desconhecido	0-N/A	
1 - sunitinib	2 - sorafenib	3 - pazopanib	4 - temsirolimus																
5 - interferon	6 - interferon + bev	7 - interleukin	8 - everolimus																
9 - axitinib	88 - outro	99 - desconhecido	0-N/A																
Início:																			
Final:																			

Terapia sistêmica 3:

1 - sunitinib	2 - sorafenib	3 - pazopanib	4 - temsirolimus
5 - interferon	6 - interferon + bev	7 - interleukin	8 - everolimus
9 - axitinib	88 - outro	99 - desconhecido	0-N/A

Início:

Final:

Último follow-up:

Status do último follow-up:

1- vivo sem doença	2- vivo com doença	3-óbito
--------------------	--------------------	---------

Data óbito:

Fatores de risco:

- 1- Anemia
- 2- Hipercalcemia
- 3- Trombocitose > 300000
- 4- Neutrófilo > 4500
- 5- KPS < 80%
- 6- Tempo do diagnóstico ao tratamento < 1 ano

Grupo prognóstico:

a

1-Bom(0factor)	2- Intermediário	3- Pobre(>=3)
----------------	------------------	---------------

Anexo 2 - Classificação de performance/status de Karnofsky: KPS-
Karnofsky Performance Status Classification.

- 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; 196.

**Anexo 3 - Classificação TNM da “American Joint Committee on Cancer’s
AJCC Cancer Staging”**

Tx	Tumor primário não pode ser avaliado.
T0	Ausência de evidencia de tumor primário.
T1	Tumor & 7cm no maior diâmetro, limitado ao rim.
T1a	Tumor & 4cm no maior diâmetro, limitado ao rim.
T1b	Tumor > 4cm e & 7cm no maior diâmetro, limitado ao rim. .
T2	Tumor > 7cm no maior diâmetro, limitado ao rim. .
T3	Tumor com extensão ate grandes vasos, glândula adrenal ipsilateral ou tecido perinefrético e não ultrapassa fáschia de Gerota.
T3a	Tumor com extensão ate glândula adrenal ipsilateral, ou tumor invade seio e/ou gordura perinéfretica mas não ultrapassa fáschia de Gerota.
T3b	Tumor com extensão ate veia renal e seus ramos segmentares ou veia cava infa- diafragmática.
T3c	Tumor com extensão ate veia cava supra-diafragmática ou infiltração da parede da veia cava.
T4	Tumor com invasão além da fáschia de Gerota.
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0	Ausência de metástases linfonodais.
N1	Presença de metástase em 1 linfonodo regional.
N2	Presença de metástases em mais de 1 linfonodo regional.
Mx	Metástases a distancia não podem ser avaliadas.
M0	Ausência de metástases a distância.
M1	Presença de metástases a distância.

Fonte: Sobin LH, Wittekind CH. TNM classificação de tumores malignos. Trad de A L a Einsenberg. 6 ed. Rio de Janeiro. INCA; 2004. Rim; p200-3.

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

Estágio clínico	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1 ou T2 T3	N1 N0 ou N1	M0 M0
IV	T4 Qualquer T	Qualquer N Qualquer N	M0 M1

Fonte: Sobin LH, Wittekind CH. TNM classificação de tumores malignos. Trad de A L a Einsenberg. 6 ed. Rio de Janeiro. INCA; 2004. Rim; p200-3.

Anexo 5 - Gradação histológica de Fuhrman

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

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 - Classificação IMDC

Variável	Valor a ser pontuado
Anemia	Hemoglobina < 10g/dl
Neutrofilia	Neutrófilos > 7500
Hipercalcemia	Cálcio corrigido 5.5
KPS	< 80.
Tempo diagnóstico-metástase	< 1 ano