

**AVALIAÇÃO DO VALOR PROGNÓSTICO DA PRESENÇA
DE MARCADORES DE TRANSIÇÃO EPITÉLIO-
MESÊNQUIMA ATRAVÉS DAS EXPRESSÕES IMUNO-
HISTOQUÍMICAS DE E-CADERINA
E VIMENTINA EM CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIAS
DO TIPO CÉLULAS CLARAS**

BRUNO HURTADO RODRIGUES

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Walter Henriques da Costa

**Co-orientadores: Dra. Isabela Werneck da
Cunha, Prof. Dr. Stênio de Cássio Zequi**

**São Paulo
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Rodrigues, Bruno Hurtado

Avaliação do valor prognóstico da presença de transição epitélio-mesênquima através das expressões imuno-histoquímicas de E-caderina e Vimentina em carcinoma de células renais do tipo células claras / Bruno

Hurtado Rodrigues - São Paulo, 2019.

60p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Walter Henriques da Costa

Descritores: 1. Transição Epitelial-Mesenquimal/Epithelial-Mesenchymal Transition. 2. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 3. Carcinoma de Células Renais/Carcinoma, Renal Cell. 4. Caderinas/Cadherins. 5. Vimentina/Vimentin. 6. Prognóstico/Prognosis.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, minha maior fonte inspiradora, cujo árduo sacrifício e tempo dispendidos resultaram na minha formação pessoal e profissional, e me permitiram um dia sonhar com este estudo.

Às minhas irmãs Renata e Fernanda, que sempre me apoiaram em todos os momentos da vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Walter da Costa, meu orientador neste projeto, pela paciência, incentivo e apoio. É um grande professor e exemplo, sua maneira de ver a medicina e a pesquisa, e o seu interesse no aprendizado contínuo foram fonte de grande inspiração.

Ao Prof. Dr. Stênio de Cássio Zéqui e Isabela Werneck da Cunha, meus co-orientadores, por todo o apoio sempre. Em todos os encontros científicos, compartilham sua experiência e conhecimento sempre com muito entusiasmo.

A todos os alunos da pós-graduação da Instituição, sobretudo os envolvidos com os projetos da Urologia, por compartilhar esse aprendizado, sempre com união e incentivo.

Às equipes de Urologia e Patologia do Hospital AC Camargo, pela receptividade, apoio e paciência durante todo o estudo.

Às instituições Universidade de Mogi das Cruzes, Hospital das Clínicas Luzia de Pinho Melo e Hospital Santa Marcelina, às quais tenho grande gratidão e carinho, por fornecer todo o alicerce para a minha formação de médico, cirurgião e urologista, pelo incentivo à pesquisa e por manter sempre as portas abertas para o trabalho e amizade.

Às Sras. Ana Maria Kuninari, Karla de Barros e Deborah Queiroz de Alencar, da Pós-Graduação do A.C. Camargo Cancer Center, por toda ajuda e orientação.

À Sra. Suely Francisco, bibliotecária do A.C. Camargo Cancer Center, por toda a ajuda no processo de revisão deste estudo.

RESUMO

Rodrigues BH. **Avaliação do valor prognóstico da presença marcadores de transição epitélio-mesênquima através das expressões imuno-histoquímicas de E-caderina e Vimentina em carcinoma de células renais do tipo células claras.** São Paulo; 2019. [Dissertação de mestrado-Fundação Antônio Prudente]

O carcinoma de células renais (CCR) corresponde a 2 a 3% das malignidades em adultos, sendo que 75-80% destes correspondem ao CCR do tipo células claras (CCRcc). Sua forma metastática é quase sempre fatal. A transição Epitélio-Mesênquima (TEM), alteração fenotípica observada por células neoplásicas, pode conferir pior prognóstico, por aumentar a migração e invasão e favorecer o surgimento de metástases. O objetivo deste estudo foi analisar a expressão de e-caderina e vimentina, marcadores de TEM, e associá-los a fatores clínico-patológicos em CCRcc utilizando-se de larga casuística disponível no nosso serviço (580 pacientes presentes com cortes de *Tissue MicroArray – TMA*), de modo a avaliar o impacto da presença de TEM na sobrevida dos pacientes de forma substancial. Houve predominância de expressão de vimentina e de algum grau de perda de e-caderina nas amostras analisadas. A perda de expressão de e-caderina foi associada a tamanho, necrose tumoral e margem positiva, enquanto a expressão de vimentina associou-se com menor grau ISUP. Nenhum dos marcadores estudados influenciou sobrevidas global e câncer-específica.

Descritores: Transição Epitelial-Mesenquimal. Imuno-Histoquímica. Carcinoma de Células Renais. Caderinas. Vimentina. Prognóstico

SUMMARY

Rodrigues BH. **[Evaluation of the prognostic value of the presence of epithelial-mesenchymal transition markers through immunohistochemical expressions of e-cadherin and vimentin in clear cell renal cell carcinoma]**. São Paulo; 2019. [Dissertação de mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Renal cell carcinoma (RCC) accounts for 2 to 3% of malignancies in adults, with 75-80% of them corresponding to clear cell CRC (ccRCC). Its metastatic form is almost always lethal. The epithelial-mesenchymal transition (EMT), a phenotypic alteration observed by neoplastic cells, may confer a worse prognosis, as it increases migration and invasion and favors the appearance of metastases. The aim of this study was to analyze the combined expression of two EMT markers, e-cadherin and vimentin, and associate them with clinical-pathological factors in CCRcc using a wide casuistry available in our service (580 patients present with Tissue MicroArray - TMA sections), in order to evaluate the impact of the presence of EMT in the survival of patients in a substantial way. There was a predominance of vimentin expression and some degree of e-cadherin loss in the analyzed samples. E-cadherin was associated with tumor size and necrosis, while vimentin was associated with higher ISUP grade. None of the markers studied influenced global or cancer-specific survivals.

Key-words: Epithelial-Mesenchymal Transition. Immunohistochemistry. Carcinoma, Renal Cell. Cadherins. Vimentin. Prognosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da construção de Tissue	16
Figura 2	Lâminas da imuno-histoquímica da E-caderina	30
Figura 3	Lâminas da imuno-histoquímica da vimentina	30
Figura 4	Curva de sobrevida global em 120 meses para pacientes portadores de CCRcc, estratificados em ausência de perda, perda parcial ou total de expressão de E-caderina (p=0,69)	40
Figura 5	Curva de sobrevida global em 120 meses para pacientes portadores de CCRcc, estratificados em presença ou ausência de expressão de vimentina (p=0,93)	41
Figura 6	Curva de sobrevida global em 120 meses para pacientes portadores de CCRcc, estratificados em expressão ausente/fraca ou média/forte de vimentina (p=0,85).....	41
Figura 7	Curva de sobrevida câncer-específica em 120 meses para pacientes portadores de CCRcc, estratificados em ausência de perda, perda parcial ou total de expressão de E-caderina (p=0,79).	45
Figura 8	Curva de sobrevida câncer-específica em 120 meses para pacientes portadores de CCRcc, estratificados em presença ou ausência de expressão de vimentina (p=0,36)	46
Figura 9	Curva de sobrevida câncer-específica em 120 meses para pacientes portadores de CCRcc, estratificados em expressão ausente/fraca ou média/forte de vimentina (p=0,75).	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variáveis clínico-epidemiológicas de 580 pacientes portadores de CCRcc – A.C.Camargo Cancer Center	26
Tabela 2	Variáveis terapêuticas de 580 pacientes com CCRcc – A.C.Camargo Cancer Center	27
Tabela 3	Variáveis patológicas de 580 pacientes com CCRcc no A.C.Camargo Cancer Center	28
Tabela 4	Variáveis relacionadas a estadiamento patológico de 580 pacientes com CCRcc no A.C.Camargo Cancer Center	29
Tabela 5	Grau de expressão de E-caderina e vimentina em 580 pacientes portadores de CCRcc – A.C.Camargo Cancer Center.....	30
Tabela 6	Variáveis demográficas relacionadas à expressão de E-caderina em 580 pacientes portadores de CCRcc – A.C.Camargo Cancer Center	31
Tabela 7	Variáveis clínicas relacionadas à expressão de E-caderina em 580 pacientes portadores de CCRcc – A.C.Camargo Cancer Center	32
Tabela 8	Variáveis patológicas relacionadas à expressão de E-caderina em 580 pacientes portadores de CCRcc – A.C.Camargo Cancer Center	33

Tabela 9	Variáveis demográficas relacionadas à expressão de vimentina em 580 pacientes portadores de CCRcc – A.C.Camargo Cancer Center	34
Tabela 10	Variáveis clínicas relacionadas à expressão de vimentina em 580 pacientes portadores de CCRcc – A.C.Camargo Cancer Center	35
Tabela 11	Variáveis patológicas relacionadas à expressão de vimentina em 580 pacientes portadores de CCRcc – A.C.Camargo Cancer Center	36
Tabela 12	Variáveis relacionadas ao desfecho clínico após o tratamento do primário aos 10 anos do estudo de 580 pacientes portadores de CCRcc – A.C.Camargo Cancer Center.....	37
Tabela 13	Probabilidade acumulada de sobrevida global em 10 anos de acordo com variáveis clínicas em 580 pacientes portadores de CCRcc.....	38
Tabela 14	Probabilidade acumulada de sobrevida global em 10 anos de acordo com variáveis patológicas em 580 pacientes portadores de CCRcc.....	39
Tabela 15	Risco de óbito em 580 pacientes portadores de CCRcc. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.....	42
Tabela 16	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer-específica em 10 anos de acordo com variáveis clínicas em 580 pacientes portadores de CCRcc	43

Tabela 17	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer-específica em 10 anos de acordo com variáveis patológicas em 580 pacientes portadores de CCRcc	44
Tabela 18	Risco de óbito por câncer em 580 pacientes portadores de CCRcc	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AJCC	<i>American Joint Committe on Cancer</i>
CCR	carcinoma de células renais
CCRcc	carcinoma de células renais do tipo células claras
CCRm	carcinoma de células renais metastático
DHL	desidrogenase láctica
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i>
IMDC	<i>International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium</i>
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i>
MSKCC	<i>Memorial Sloan-Kettering Cancer Center</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NP	nefrectomia parcial
NR	nefrectomia radical
PD-1	<i>programme death 1</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
RT-PCR	<i>Real time reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SCE	sobrevida câncer-específica
SG	sobrevida global
TEM	transição epitélio-mesênquima
TMA	<i>tissue microarray</i>
TME	transição mesênquima-epitélio
TNM	<i>Tumour node metastasis</i>
VEGF	<i>vascular and endothelial growth factor</i>
VHL	Von Hippel-Lindau

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia	1
1.2	A Transição Epitélio-Mesênquima	7
1.3	Os Marcadores Estudados	11
1.3.1	A E-Caderina	11
1.3.2	A Vimentina	13
1.4	O Tissue Microarray (TMA)	14
2	OBJETIVOS	17
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	18
3.1	População do Estudo	18
3.1.1	CrITÉRIOS de Inclusão	18
3.1.2	CrITÉRIOS de Exclusão	18
3.2	Metodologia	18
3.2.1	Diagnóstico e Estadiamento	19
3.2.2	Tratamento	20
3.2.3	Seguimento	20
3.2.4	Análise Imuno-histoquímica.....	21
3.3	Análise Estatística	22
3.3.1	Análise de Riscos e aspectos Éticos	24
4	RESULTADOS	25
4.1	Pacientes.....	25
4.2	Reações Imuno-Histoquímicas da E-Caderina.....	29
4.3	Reações Imuno-Histoquímicas da Vimentina	34
4.4	Análise de Sobrevida.....	37
4.4.1	Sobrevida Global (SG)	37
4.4.2	Sobrevida Câncer-Específica (SCE)	43

6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÕES	54
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	55

ANEXOS

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

Anexo 2 Classificação de Performance-Status da ECOG.

Anexo 3 Classificação TNM da “*American Joint Committee on Cancer*” (AJCC).

Anexo 4 Estadiamento Clínico da “*American Joint Committee on Cancer*” (AJCC).

Anexo 5 Classificação de risco do Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC).

Anexo 6 Estadiamento segundo a Classificação do MSKCC

Anexo 7 Classificação de risco do IMDC.

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

O carcinoma de células renais (CCR) corresponde a 2 a 3% das malignidades em adultos, sendo que 75-80% destes correspondem ao CCR do tipo células claras (CCRcc), de origem nos túbulos contorcidos proximais (EBLE et al. 2004). Os fatores de risco reconhecidos para o CCR são obesidade, tabagismo e hipertensão arterial sistêmica, porém existem evidências crescentes que associam o sedentarismo, etilismo, exposição ocupacional ao tricloroetileno, abuso de analgésicos como o acetaminofen. A doença renal cística adquirida e o transplante renal também parecem aumentar o risco de CCR (MCLAUGHLIN et al. 2006). Muitos desses fatores estão associados ao estilo de vida e podem ser evitados. Atualmente, com o advento dos exames de imagem muitas vezes realizados devido a queixas abdominais inespecíficas, houve um aumento do diagnóstico incidental desses tumores. Isso resultou em uma migração de estágios mais avançados para mais iniciais ao diagnóstico a partir da década de 1990, porém não houve diminuição das taxas de mortalidade (WOLDRICH et al. 2008).

O tratamento do CCR é eminentemente cirúrgico, com a ressecção completa do tumor primário. ROBSON et al. em 1969, descreveram e padronizaram a nefrectomia radical (NR) aberta, via transperitoneal ou

tóraco-abdominal, com a retirada em bloco do rim, fáscia de Gerota, linfonodos paracavais e paraórticos. Estudos posteriores não identificaram benefício da linfadenectomia no tratamento dos tumores renais, e seu papel atual ainda é incerto (BEKEMA et al. 2013).

A nefrectomia parcial (NP) começou a ser realizada em casos de exceção, para pacientes com rim único, com função renal limítrofe, tumores bilaterais e síndromes familiares (estas com maiores chances de doença multicêntrica e recidiva) (BECKER et al. 2009). Os bons resultados da NP, com baixa taxa de complicações (7 a 11%), bom controle local (recorrência local <5%) e resultados oncológicos equiparáveis à cirurgia radical em relação a SCE permitiram a extrapolação da indicação desta modalidade para tumores T1 (BECKER et al. 2009). Outros estudos mostraram que a NP permite uma melhor preservação da função renal global em longo prazo em comparação com a NR, além de diminuir os riscos de doenças cardiovasculares ou metabólicas (WEIGHT et al. 2010).

Os critérios classicamente utilizados como fatores prognósticos para o CCR foram descritos inicialmente por ROBSON et al. em 1969, e são o estadio clínico, o grau histológico de malignidade, o envolvimento linfonodal e a presença de metástases a distância. Há ainda outras variáveis relacionadas ao prognóstico, que podem ser divididas em clínicas e patológicas. Os fatores clínicos incluem o status performance, presença de sintomas e exames laboratoriais, como proteína C reativa, albumina e presença de anemia. Os fatores anatomopatológicos incluem tamanho tumoral, invasão venosa macroscópica (veias renal e cava), invasão

capsular, acometimento adrenal e presença de metástases a distância, grau nuclear e outros fatores patológicos. Há também outros fatores, como grau nuclear da ISUP (*International Society of Urological Pathology*), invasão microvascular, presença de necrose tumoral e de componente sarcomatóide (DALL'OGGIO et al. 2007; FICARRA et al. 2007; DA COSTA et al. 2012).

O sistema de estadiamento mais amplamente utilizado atualmente é o TNM (*Tumour Node Metastasis*), descrito inicialmente em 1974 e com várias atualizações feitas pela *American Joint Committee on Cancer-AJCC*. Permite classificar os pacientes de acordo com riscos de progressão e óbito pela doença, além de orientar as adequadas estratégias de tratamento, com base em ensaios clínicos. Consiste na avaliação das características anatômicas do tumor, como tamanho e suas relações com estruturas adjacentes, invasão vascular macroscópica, acometimento linfonodal e metástases a distância.

A doença na forma metastática (CCRm) é quase sempre fatal, com sobrevida menor que 5% em 10 anos (MOTZER et al. 1999). O advento da terapia-alvo [inibidores da tirosina-kinase (inibem, entre outros, o VEGF) e mTOR] em doença disseminada resultou em impacto positivo na sobrevida global, embora a remissão completa da doença ainda seja um evento extremamente raro. Recentemente, inibidores de *checkpoint* imunológico tem sido estudados, com aparente benefício em sobrevida em casos metastáticos. Os agentes nivolumab, inibidor de PD-1, e ipilimumab, anticorpo anti-citotóxico associado ao linfócito T (CTLA4), mostraram benefício quanto a sobrevida global e eventos adversos em comparação

com sunitinibe como primeira linha de tratamento para pacientes com CCRcc metastático de prognósticos intermediário e ruim (POWLES et al. 2018).

O papel da nefrectomia citorrredutora em casos multimetastáticos, antes relacionado a maior sobrevida, após o advento dos inibidores da tirosina-kinase ainda não está bem estabelecido (SELLA et al. 2016). Entretanto, tem sido realizada como tratamento adjunto à terapia sistêmica, por aliviar sintomas e oferecer ganho modesto de sobrevida, especialmente em pacientes com grandes massas tumorais ou síndromes paraneoplásicas. A metastasectomia pode ter benefício na sobrevida de pacientes selecionados, principalmente se oligometastáticos, com ressecção completa e bons status performance e funcional (KIM et al. 2014).

Nesta era pós-terapia-alvo, novos fatores prognósticos devem ser avaliados com o objetivo de estratificar melhor os pacientes candidatos a tratamento sistêmico, para a obtenção de melhor resposta terapêutica. Em 2004, o *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* (MSKCC) criou um escore prognóstico para prever o tempo de sobrevida em pacientes metastáticos tratados com imunoterapia (MOTZER et al. 1999). A partir de uma coorte de mais de 400 pacientes, foram analisados parâmetros como *Karnofsky Performance Status*, desidrogenase láctica sérica, taxa de hemoglobina e cálcio séricos, e realização de nefrectomia prévia. Cada parâmetro alterado recebe um ponto. A sobrevida mediana para pacientes com MSKCC de 0 (considerados de prognóstico favorável) foi de 20 meses, 10 meses para escore 1-2 (prognóstico intermediário), e 4 meses para escore 3-5

(prognóstico ruim). Em 2009, HENG et al. observaram que neutrofilia e plaquetose também foram fatores independentes de prognóstico em pacientes que receberam agentes anti-VEGF, e acrescentaram os mesmos aos critérios do MSKCC, e retiraram a análise do DHL. Este novo escore foi aprovado pelo *International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium-IMDC*. Assim, a escolha de tratamento sistêmico é baseada em um escore clínico-laboratorial. Pacientes com baixo risco pelo escore do IMDC são candidatos a receber sunitinib ou pazopanib, e os de risco intermediário e alto são candidatos a receber ipilimumab + nivolumab na primeira linha de tratamento (POWLES et al. 2018).

Apesar de os métodos descritos acima serem consagrados na avaliação de prognóstico, mesmo tumores com as mesmas características podem ter desfechos diferentes. Isso se dá devido à presença de características biológicas e genéticas tumorais individuais (SAKAI et al. 2009). Neste sentido, o estudo de biomarcadores moleculares pode ser uma ferramenta tanto para uma maior acurácia na predição de prognóstico, como no auxílio da indicação de tratamento complementar específico com drogas-alvo. A primeira alteração identificada e reconhecida como evento central na gênese do CCRcc é a perda somática da função do VHL, um supressor tumoral. Sua perda de expressão leva a um aumento de fatores induzidos por hipóxia (HIF1 α e HIF2 α), que regulam processos celulares como apoptose, proliferação, sobrevivência, metabolismo, e angiogênese, através da transcrição de VEGF e PDGF. Tal alteração está presente na maioria dos CCRcc esporádicos, mas também na síndrome de Von Hippel-Lindau,

doença hereditária que cursa com o aparecimento de CCRcc (JOOSTEN et al. 2018). A compreensão desta via da carcinogênese possibilitou o estudo e o uso dos inibidores da tirosina-kinase citados acima. Entretanto, as mutações somáticas são infrequentes nos tumores renais, porém várias alterações epigenéticas (em processos como hipermetilação, fosforilação e ubiquitilação do DNA, e pela presença de microRNAs não codificantes) podem causar desregulação ou supressão gênica sem afetar a sequência primária do DNA, e talvez tais alterações tenham papel fundamental na carcinogênese renal (JOOSTEN et al. 2018).

Foi observado alterações em mais de 200 genes e 120 microRNAs em CCR, porém as mais comumente encontradas são do *VHL*, *PBRM1*, *BAP1*, *KDM5C*, *KDM6A* e *SETD2* (JOOSTEN et al. 2018). Em 2016, HSIEH et al. (2017) analisaram 220 amostras tumorais de CCRcc através da técnica de *Next-Generation Sequencing*-NGS e observaram que 73% dos tumores tinham até 10 mutações genéticas, cujas mais frequentes foram *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, *BAP1*, *KDM5C* e *PTEN*, genes envolvidos na biologia da cromatina e das histonas. Não houve associação entre tais mutações e o escore de risco do MSKCC, porém observou-se que os pacientes com mutação de *BAP1* tratados com everolimus seguidos de sunitinib tiveram menor sobrevida global (9,8 meses) em relação à mutação de *PBRM1* (43,5 meses) ou tumor tipo selvagem (18,1 meses). Quando a terapia foi sunitinib seguido por everolimus, a sobrevida foi semelhante entre os grupos (*BAP1*, 29,9 meses; *PBRM1*, 33,2 meses e selvagem, 33,1 meses). Tal estudo sugere que a análise de biomarcadores pode influenciar na escolha da

terapia sistêmica, visando maior sobrevida. Em outro estudo, DA COSTA et al. (2012) analisaram as expressões de *BAP1* e *PBRM1* através de imunohistoquímica e RT-PCR em 604 amostras de tumores localizados, e observaram que a perda de expressão destes marcadores correlacionou-se com piores SVG e SCE.

Tais alterações epigenéticas também afetam outras vias de sinalização além da via do *VHL-HIF*, como a via do Wnt/beta-catenina e o TGF- β . Essas vias interagem entre si, formando uma rede complexa de sinalização, cujos componentes desregulados contribuem com a carcinogênese renal (JOOSTEN et al. 2018).

1.2 A TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA

O aparecimento e desenvolvimento de metástases a distância é associado a mau prognóstico na maioria dos tumores, sendo responsável pela maioria das mortes câncer-específicas. Consiste de um processo complexo, cuja biologia ainda não é totalmente compreendida. Inicialmente, células malignas escapam do sítio primário, penetram no estroma tumoral e atingem a microcirculação. Neste estágio, muitas células, ao perderem contato com a matriz extracelular, entram em apoptose, num processo conhecido como *anoikis*, mecanismo de controle da proliferação e organização celular em tecidos normais. As células tumorais que sobrevivem na circulação podem então extravasar da circulação, podendo invadir e se multiplicar em novos tecidos (IWATSUKI et al. 2010). REYA et al. em 2001,

observaram que tecidos tumorais tem a capacidade de auto-renovação, devido à presença de células-tronco tumorais, também chamadas de células iniciadoras de tumor, definidas pela habilidade de produzir novos tumores.

Recentemente o conceito de transição epitélio-mesênquima (TEM), já estudado em embriologia, tem sido associado à progressão e desenvolvimento de metástases em diversos tumores (BREMNES et al. 2002). A TEM é um fenômeno qualificado pela mudança de fenótipo de célula epitelial para mesenquimal, com alteração da polarização e maior plasticidade celular, perda da arquitetura tecidual e diminuição da adesão intercelular. Assim, as células adquirem características que favorecem a migração e invasão. É caracterizada por diversos mecanismos de sinalização celular que culminam na supressão de E-caderina, proteína de adesão célula-célula e marcador epitelial, o aumento da expressão de marcadores mesenquimais, como a N-caderina, a β -catenina, a vimentina, a fibronectina e a clusterina (MANI et al. 2008; HARADA et al. 2012). Tem papel importante na embriogênese, principalmente durante a gastrulação. Por exemplo, o mesoderma originado de TEM durante o desenvolvimento embrionário inicial se diferencia em múltiplos tipos de tecidos, e mais tarde, as células mesodérmicas geram os órgãos epiteliais como rins e ovários, num fenômeno reverso conhecido como transição mesênquima-epitélio (TME). Também pode ser observada durante processos de cicatrização, como resposta a processos inflamatórios crônicos, onde há deposição tecidual de fibroblastos. Recentemente, tem sido demonstrado que a TEM

pode ter papel na progressão tumoral e surgimento de metástases (MANI et al. 2008).

Em geral, é induzida por fatores moleculares transitórios, muitos deles autócrinos e parácrinos, que ocorrem devido a condições de estresse metabólico comuns no microambiente de tumores sólidos, como hipóxia, pH baixo ou deprivação de nutrientes (principalmente a glicose), gerando alterações nos mecanismos regulatórios epigenéticos, estáveis mas reversíveis, que não afetam a sequência primária do DNA, mas interferem na programação transcricional. Vários fatores de transcrição indutores de TEM são então expressos e ativados, como *TWIST*, *SLUG*, *SNAIL*, *ZEB1* e *VIM* (TAM e WEINBERG et al. 2013, CHEN et al. 2014).

O TGF- β é um dos principais indutores de TEM em células neoplásicas durante a progressão tumoral. É responsável por sinalizar a fosforilação de proteínas (*SMAD2* e *SMAD3*), que formam complexos (*SMAD2/SMAD3* -*SMAD4*), que ao atingir o núcleo, regulam genes responsáveis pelo mecanismo de morte celular. Também promove a angiogênese e supressão imunológica (IWATSUKI et al. 2010). A inibição de TGF- β tem potencial de bloquear a TEM e, portanto, a progressão tumoral (TAM e WEINBERG et al. 2013). A proteína WNT sinaliza a ativação de β -catenina durante a gastrulação no período embrionário (processo caracterizado por TEM). A hipersinalização de WNT leva a uma atividade aberrante de β -catenina e progressão tumoral.

O microambiente tumoral é um fator importante no desencadeamento de TEM e potencial de metástases pelas células malignas. Fatores de

crescimento como o hepático, de epiderme, de fibroblastos, agem ativando vias de sinalização oncogênicas, como a Ras e a PI3K/Akt/mTOR. Tais vias tem papel no controle do ciclo celular, afetando a proliferação e evitando a apoptose (TAM e WEINBERG et al. 2013, LI et al. 2015).

A hipóxia intratumoral promove alterações epigenéticas que caracterizam a TEM. Sua presença induz a ativação do Fator Induzido por Hipóxia 1 (*HIF1*, do inglês *hypoxia-inducible factor 1*), porém outras vias de sinalização também podem ativá-lo mesmo em estados de normoxia (como a via PI3K/Akt/mTOR e a mutação de proteínas supressoras tumorais, como a fumarato hidratase). Após sua ativação, *HIF1* induz à transcrição de genes que codificam proteínas transportadoras de glicose e glicolíticas, alterando a produção de energia de fosforilação oxidativa para glicólise, diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio. Ela também ativa a piruvato desidrogenase kinase, que inativa o complexo piruvato desidrogenase, reduzindo assim a conversão de piruvato em ácido tricarboxílico (ATC). Tais alterações diminuem a fosforilação oxidativa e o consumo de oxigênio, e mantêm o fenótipo celular como em condição de hipóxia (LI et al. 2015).

A disponibilidade de energia é outro fator importante para as alterações epigenéticas. Substratos ricos em energia, como carboidratos e gorduras, são transformados em ATP, com a formação de metabólitos como Acetil-CoA e NAD^+/NADH . Esses metabólitos são utilizados como substratos energéticos para a expressão gênica, e seus níveis informam às células a disponibilidade energética. Alterações em seus níveis celulares podem induzir a célula maligna a um estado de baixa oferta energética e promover

alterações epigenéticas que mantêm seu estado indiferenciado (LI et al. 2015).

É importante frisar que a TEM pode ser reversível, e as células-tronco tumorais podem se diferenciar novamente em epiteliais através da TME, ao atingir os sítios de colonização (LI et al. 2015).

Neste sentido, marcadores de TEM como a expressão de vimentina e a perda de expressão de e-caderina podem auxiliar na determinação do prognóstico dos pacientes com CCRcc, somando-se aos critérios clínicos e patológicos já existentes.

1.3 OS MARCADORES ESTUDADOS

1.3.1 A E-Caderina

As caderinas são glicoproteínas transmembrana de adesão intercelular cálcio-dependentes, responsáveis pela adesão intercelular e manutenção da arquitetura tecidual. São divididas em três subclasses de acordo com o padrão de distribuição em diferentes tecidos (células epiteliais expressam P- e E-caderina, enquanto células mesenquimais expressam N-caderina), estão presentes em praticamente todas as células e são fundamentais na manutenção de estruturas multicelulares (PAUL et al. 2004, IWATSUKI et al. 2010). Possuem estrutura primária semelhante, compostas por 723 a 748 aminoácidos, com um único domínio transmembrana, que divide a molécula em uma porção extracelular, mais extensa, com uma região amino-terminal composta por 113 aminoácidos, e uma porção

citoplasmática carboxi-terminal (TAKEICHI 1990). A porção extracelular possui sítios de ligação de Ca^{2+} , e sequências de três a cinco aminoácidos, repetidas três a quatro vezes, e sua região proximal, próximo à membrana celular, possui quatro moléculas de cisteína. Cada porção amino-terminal confere especificidade e função de adesão às caderinas, sendo que a ligação se dá entre estas duas porções idênticas. A porção intracelular, com região terminal carboxílica também tem papel na junção intercelular ao ligar-se a bandas citoplasmáticas de actina, e deleções nestas regiões podem inativar ou diminuir sua função de adesão (TAKEICHI 1990). Sua expressão é codificada pelo gene *CDH1*, frequentemente metilado em CCR (JOOSTEN et al. 2018), e a perda de sua expressão foi observada em estágios avançados de diversas neoplasias (BREMNES et al. 2002; FAN et al. 2013).

Foi observado que a e-caderina é expressa em tecido renal normal, principalmente nos túbulos contorcido distal e coletores, e apenas 20 a 30% dos CCRcc, originários do túbulo contorcido proximal, expressam a proteína (KATAGIRI et al. 1995). Apesar disso, sua expressão em CCRcc tem sido relacionada a melhor sobrevida (KATAGIRI et al. 1995; HARADA et al. 2012).

Em estudo publicado em 1995, KATAGIRI et al. analisaram a expressão de e-caderina em 106 amostras de CCR primário e 8 de lesões metastáticas, e observaram que a supressão da glicoproteína relacionou-se de forma significativa com estádios avançados (estadio III ou IV) e com menor sobrevida global, e não houve expressão de e-caderina em nenhuma das amostras de lesões metastáticas.

1.3.2 A Vimentina

A vimentina é uma proteína da família dos filamentos intermediários, encontrada no citoplasma de células mesenquimais e componente do citoesqueleto. Assim, forma uma extensa rede de conexões intracelulares, que ao ligar-se a outras substâncias como actina e microtúbulos, coordena atividades citoesqueléticas, participa da arquitetura celular, e da migração, através de fenômenos conhecidos como lamellipodia e filopodia. Atua também na sinalização celular e no controle do ciclo celular (principalmente na transição das fases G2 para M) (CHANG e GOLDMAN 2004).

Durante o processo de progressão tumoral, pode ligar-se ao p53 citoplasmático, um dos principais supressores tumorais, inativando sua função apoptótica e contribuindo com a tumorigênese (IWATSUKI et al. 2010). Sua expressão em tecidos tumorais é associada a TEM, e sua expressão tem sido relacionada a maior agressividade, invasividade e metástase precoce durante a progressão do CCRcc (WILLIAMS et al. 2009; SHI et al. 2015).

HARADA et al. em 2012, avaliaram 122 amostras de CCRcc e compararam a expressão de diversos marcadores relacionados a TEM com fatores clinicopatológicos. Observou-se associação com invasão microvascular, estadió patológico, tipo histológico e níveis de proteína C reativa. A análise univariada observou impacto significativo de e-caderina e vimentina nas taxas de sobrevida livre de recorrência.

CHEN et al. (2014), analisaram os níveis de RNAm para diversos marcadores de TEM em TMA de CCRcc primário e metástases em diversos

sítios, incluindo *CDH-1* (codificador de e-caderina) e vimentina. O painel gênico para TEM foi significativamente maior em tecidos neoplásicos em relação a amostras de tecido renal normal. Os níveis de RNAm para vimentina foram ainda maiores em metástases, e associados a desfecho desfavorável. Níveis elevados de transcrição de *CDH-1* predisseram melhor prognóstico. Curiosamente, nenhum dos marcadores para TEM em tecido metastático predisseram prognóstico.

Em outro estudo, SHI et al. (2015), observaram que a expressão proteica de vimentina e seu RNAm através da análise por *Western blot*, imuno-histoquímica e *polymerase chain reaction*-PCR em CCRcc foi maior conforme maior grau de Fuhrman, estadio T e presença de envolvimento linfonodal. Além disso, houve impacto negativo da expressão de vimentina nas taxas de sobrevida global. Os autores sugerem que a vimentina pode ser um fator independente de prognóstico.

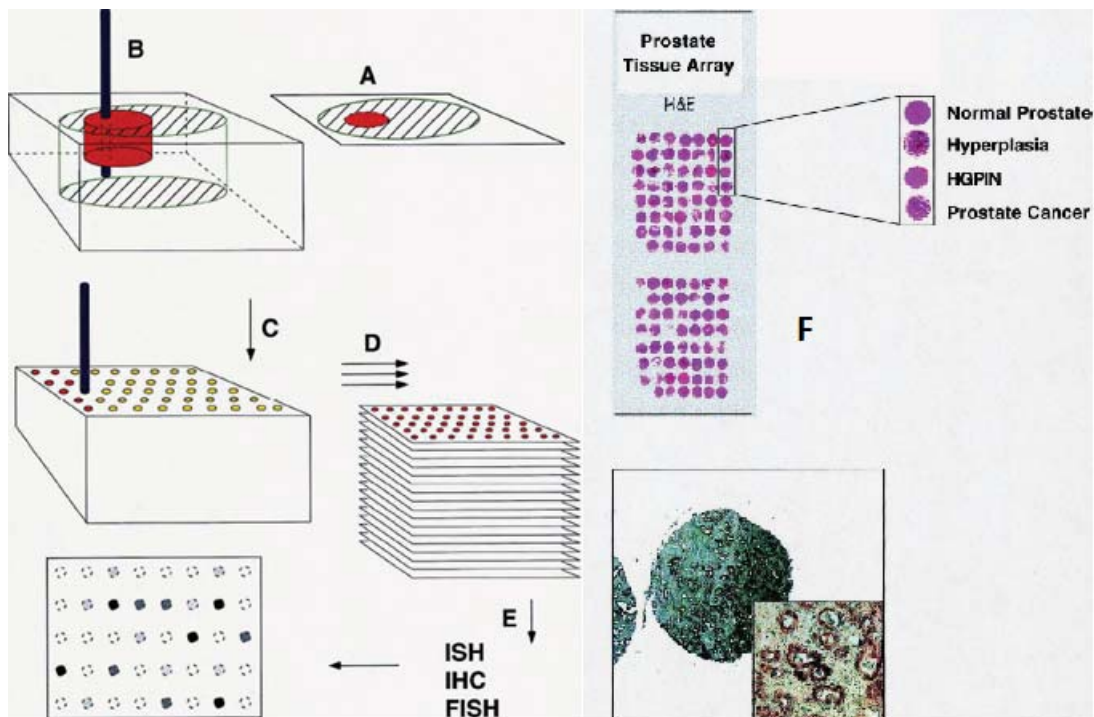
Apesar de estudos sugerirem relação entre a presença de TEM com disseminação mais precoce e pior desfecho, a literatura ainda dispõe de séries com número limitado de pacientes, e carece de evidência consistente que corrobore a pesquisa de marcadores de TEM como fatores prognósticos em câncer renal.

1.4 O TISSUE MICROARRAY (TMA)

Enquanto novas tecnologias possibilitaram um aumento exponencial no número de novos genes associados a carcinogênese, ainda há um

grande intervalo entre a descoberta e sua validação como marcador prognóstico. Isso está implicado principalmente pelo laborioso processo de avaliação da expressão gênica pelas técnicas convencionais. Tradicionalmente, a análise da expressão de uma proteína por imunohistoquímica ou hibridização in situ é feita com uma amostra individual de tecido, preparado em uma única lâmina. O desenvolvimento da técnica de *Tissue Microarray* (TMA) suplantou esta análise individual, e permite a análise rápida de vários marcadores moleculares, genéticos ou proteicos, em centenas de tumores, condensados em um único bloco amostral (HORVATH e HENSHALL 2001).

A técnica consiste na extração de amostras representativas de vários tumores através de cortes microscópicos cilíndricos a partir de blocos de parafina, depositados lado a lado em um único bloco receptor, que pode receber até 1000 amostras. Em seguida, são feitos cortes de 3 a 5µm, que são ordenados lado a lado para a confecção das lâminas de estudo (Figura 1). Cada lâmina contém as amostras de cada caso e sua duplicata (amostra representativa de diferente região tumoral) (KONONEN et al. 1998). As coordenadas das biópsias são registradas a partir do vértice das amostras, em geral região inferior esquerda, com tecido diferente do estudado, utilizado como marcador posicional. Assim, confecção de TMA possibilita maior eficácia na análise das amostras, economia de tempo e material (lâminas e reagentes).



Fonte: Extraído de HORVATH e HENSHALL (2001).

Figura 1 - Representação esquemática da construção de Tissue Microarray.

(A) a lesão histológica é identificada no bloco de parafina do doador após colocação com hematoxilina e eosina; (B) amostras teciduais cilíndricas (0,6 a 2mm) são extraídas do bloco doador para um bloco receptor, com as coordenadas da ordenação já definidas; (C) o processo de amostragem é repetido para diferentes regiões do mesmo tecido doador, ou centenas de outros blocos doadores; (D) o bloco receptor pode ser seccionado para a produção de cópias do mesmo conjunto de tumores; (E) a análise de DNA, RNA ou proteínas pode ser feita por imunohistoquímica, FISH (do inglês *fluorescence in situ hybridisation*) e ISH (do inglês *in situ hybridisation*); (F) aspecto da lâmina de TMA com áreas representativas de tumores, corada com hematoxilina e eosina (HE).

2 OBJETIVOS

- Objetivo primário: avaliar a presença de TEM em amostras de CCRcc através das expressões imuno-histoquímicas de e-caderina e vimentina, e correlacioná-las com parâmetros epidemiológicos, clínicos e patológicos.
- Objetivo secundário: avaliar o impacto prognóstico de suas expressões nas taxas de sobrevida global e sobrevida câncer-específica.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

3.1.1 Critérios de Inclusão

- pacientes com CCRcc comprovado histologicamente;
- tratamento cirúrgico exclusivo;
- ausência de comorbidade que reduza a expectativa de vida a menos de seis meses.

3.1.2 Critérios de Exclusão

- pacientes tratados em outro serviço;
- submetidos a outras técnicas não-cirúrgicas;
- expectativa de vida menor que seis meses;
- prontuários incompletos;
- material arquivado em parafina em más condições para avaliação imuno-histoquímica;
- pacientes que perderam seguimento.

3.2 METODOLOGIA

Foram analisados os dados clínicos em prontuários de 580 pacientes portadores de CCRcc tratados por cirurgia no Núcleo de Urologia do

A.C.Camargo Cancer Center, do período de julho de 1985 a outubro de 2015.

As variáveis consideradas foram sexo, antecedentes pessoais, como comorbidades (incluindo hipertensão arterial sistêmica, obesidade através do índice de massa corpórea – IMC), tabagismo, sinais e sintomas, *status performance* (ECOG), lateralidade, multifocalidade, presença de metástase ao diagnóstico, tipo de cirurgia e status da ressecção (se completa, ou margem positiva micro/macroscópica), linfadenectomia, tamanho tumoral, acometimento de veia renal, veia cava, gordura perirrenal, seio renal, pelve, cápsula renal, microinvasão linfática e vascular, presença de necrose tumoral e componente sarcomatóide, grau nuclear da ISUP 2013, estadiamento pelo TNM AJCC/UICC 2017, recidiva tumoral, situação clínica ao final do estudo, além da análise de expressão imuno-histoquímica de E-caderina e vimentina.

3.2.1 Diagnóstico e Estadiamento

Os pacientes foram inicialmente submetidos a exame clínico geral, e indagados quanto à presença de sinais e sintomas relacionados a neoplasia renal. Em todos os casos, utilizou-se a tomografia computadorizada como exame de imagem para a confirmação diagnóstica. O estadiamento clínico foi feito através do Sistema TNM. A presença de metástases pulmonares foi pesquisada através de radiografias de tórax nas incidências pósterio-anterior e perfil, e para os casos suspeitos foi feita tomografia computadorizada de tórax. A cintilografia óssea foi feita apenas para os casos suspeitos de

invasão óssea (presença de sintomas, alterações laboratoriais sugestivas ou presença de múltiplas metástases).

3.2.2 Tratamento

Todos os pacientes tiveram a cirurgia como indicação de terapia inicial. O tipo de cirurgia indicada e a via de acesso variaram de acordo com a extensão tumoral e a preferência do cirurgião. Os procedimentos realizados foram nefrectomia radical ou parcial (incluído nodulectomia), e utilizadas as técnicas aberta, laparoscópica ou com auxílio de robô. Para os casos submetidos a ressecções parciais, foi estudado o status da margem cirúrgica, e em alguns casos selecionados, técnica de patologia de congelação para afastar margem residual positiva.

3.2.3 Seguimento

Os pacientes tiveram seguimento ambulatorial após os procedimentos cirúrgicos, com visitas trimestrais nos dois primeiros anos, semestrais do terceiro ao quinto ano, e anuais após cinco anos. Os casos metastáticos ou com diagnóstico de recidiva tumoral tiveram acompanhamento da equipe de Oncologia Clínica, e seguimentos em períodos mais curtos, individualizados de acordo com cada caso. Para os casos com suspeita de recidiva local ou sistêmica, foi realizada tomografia computadorizada para confirmação diagnóstica. A partir do seguimento, os pacientes foram classificados em:

- a) Vivos sem câncer;
- b) Vivos com câncer;

- c) Mortos por câncer, ou por complicações de seu tratamento (incluindo óbitos por complicações cirúrgicas, até 30 dias de pós-operatório);
- d) Mortos por outras causas;
- e) Pacientes com perda de seguimento.

3.2.4 Análise Imuno-histoquímica

As lâminas histológicas contendo amostras de CCRcc referentes às peças cirúrgicas foram revistas por um único especialista, que selecionou as áreas mais representativas das regiões mais indiferenciadas dos tumores para a confecção das lâminas de TMA. Após a confecção do TMA, as lâminas foram revistas por um único especialista.

As secções foram montadas em lâminas de vidro carregadas positivamente e secas durante 30 minutos a 37° C. As secções foram desparafinadas em xileno e reidratadas através de uma série de álcoois graduados. Foram então incubadas com um anticorpo monoclonal de rato primário contra a E-caderina 36 (Ventana, Medical Systems, INC) a uma diluição de 1: 500 durante 60 minutos. Para as reações de vimentina, as secções foram incubadas com um anticorpo monoclonal de coelho primário 790-2917 contra vimentina-clone V9 (Ventana, Medical Systems, INC) a uma diluição de 1: 100 durante 60 minutos. Todos os procedimentos imuno-histoquímicos foram realizados automaticamente no Benchmark ULTRA (VENTANA) auto-stainer, utilizando o sistema de visualização FlexPlus de acordo com as especificações do fornecedor. Dois uropatologistas pontuaram semiquantitativamente a intensidade da coloração na membrana e

citoplasma da e-caderina e vimentina em todas as amostras, de acordo com o número de células positivas e variou de 0% a 100%. Para a avaliação do escore imuno-histoquímico, todas as amostras foram avaliadas em duplicata (amostra na mesma região do bloco de parafina, em profundidade diferente) e, em seguida, uma média dos dois pontos para cada caso foi usada para análise. Como controle positivo da reação, foi utilizado tecido não renal não neoplásico com coloração positiva para ambos os marcadores. Como controle negativo, foi utilizado o protocolo de coloração padrão, com exceção da supressão do anticorpo primário. O critério de positividade utilizado foi o achado de e-caderina ou vimentina, em membrana ou citoplasma, positividade de qualquer intensidade. Utilizou-se anticorpo de controle não primário. Para melhor interpretação, as categorias “ausente”, “baixa expressão” ou “alta expressão” foram utilizadas com base na ausência (0%), expressão parcial (1-99%) ou expressão total (100%) da e-caderina, e “expressão negativa” e “expressão positiva” foram usadas com base na ausência (0%) ou presença (1% -100%) de coloração de tecido de vimentina, respectivamente.

3.3 ESTATÍSTICA

As variáveis estudadas de cada paciente foram coletadas, organizadas e arquivadas em um banco de dados, com o auxílio do programa *Microsoft® Excel® 2016*.

A análise estatística foi feita através do software IBM® SPSS Statistics, versão 23.0.0.0, 2015. A distribuição das variáveis clínicas e patológicas foi apresentada em forma de tabelas de contingência.

A perda de expressão de E-caderina foi comparada entre a lâmina e sua duplicata, e a divergência entre elas foi considerada como perda parcial, recebendo um ponto. Foi considerada a ausência ou presença de expressão de vimentina para a análise estatística. Entretanto, para a análise de SG e SCE, foi feita análise através da dicotomização em expressão ausente ou fraca (até 1,5 ponto de média) *versus* expressão média ou forte (acima de 1,5 ponto).

Para verificar a associação dos marcadores E-caderina e Vimentina às demais variáveis, foi utilizado o teste de Qui-Quadrado. Para os casos em que a frequência foi inferior a 5, foi utilizado o Teste Exato de Fisher. O nível de significância adotado foi o de 5%.

A identificação de fatores de risco independentes associados a SG e SCE foi feita através do teste de regressão de COX (1972). As variáveis utilizadas para este teste foram as que atingiram significância estatística na análise univariada.

As análises de SG e SCE foram feitas através do estimador de KAPLAN e MEIER (1958) para estimar a chance de um paciente com CCRcc estar vivo ou não apresentar recidiva tumoral, após o instante de tempo truncado em 10 anos. Através da representação gráfica do estimador, conseguimos avaliar, para cada variável estudada, a probabilidade de um paciente não morrer ou desenvolver recidiva tumoral no mesmo período

descrito acima. Quanto mais superior for a curva no gráfico, maior é a chance de estar vivo ou livre de recidiva até o tempo considerado. A comparação entre as curvas foi feita através do teste não-paramétrico de Log-Rank, e o nível de significância adotado foi o de 5%. Os pacientes que tiveram perda de seguimento foram considerados censurados nos gráficos.

3.3.1 Análise de Riscos e aspectos Éticos

Em relação aos aspectos éticos, não foi necessária a aplicação de termo de consentimento informado aos pacientes, pois trata-se de estudo retrospectivo, onde não houve a participação direta dos pacientes, ou alteração na estratégia de seguimento dos mesmos tanto em relação à indicação cirúrgica, quanto no seguimento pós-operatório e indicação de terapia subsequente, se realizada. Foram utilizados os dados de prontuários e materiais de blocos de parafina arquivados no Serviço de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center. O uso destes materiais não acarretou prejuízo aos pacientes, pois houve sempre material residual significativo nos blocos.

O projeto foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital, e foi aprovado em 04/10/2016, e protocolado sob o número 2244/16. (Anexo 1)

4 RESULTADOS

4.1 PACIENTES

As Tabelas de 1 a 4 apresentam as características epidemiológicas, clínicas e patológicas e de estadiamento dos pacientes.

Foram analisados os dados de 580 pacientes operados de CCRcc no A.C.Camargo Cancer Center. Dentre eles, havia 374 homens (64,5%) e 206 mulheres (35,5%). A idade variou de 21 a 85 anos, com mediana de 55. Do total, 106 tinham menos de 45 anos, 299 tinham entre 45 e 60, e 175 tinham mais de 60 anos no momento do diagnóstico. Tabagismo foi observado em 218 (37,6%) pacientes. Duzentos e sessenta e seis pacientes (45,9%) eram hipertensos, e 31 (5,3%) eram obesos, com IMC acima de 30. Cento e oitenta e oito pacientes (32,4%) apresentavam sintomas. Em relação à classificação de performance-status (P/S), 487 pacientes (83,9%) foram classificados como ECOG 0 ou 1. Quarenta e cinco pacientes (7,8%) apresentavam metástases no momento do diagnóstico.

A nefrectomia radical foi realizada em 303 pacientes (52,2%), e a nefrectomia parcial em 277 (47,8%). A via de acesso aberta lombotomia ou subcostal) foi realizada em 367 pacientes (63,3%), e a laparoscópica ou robótica em 213 (36,7%). O maior diâmetro tumoral variou de 0,6 a 25cm, com média de 5,4cm.

Tabela 1 – Variáveis clínico-epidemiológicas de 580 pacientes portadores de CCRcc – A.C.Camargo Cancer Center

Variável	Categoria	N	%
Raça	Branco	222	38,3
	Não-branco	49	8,5
Sexo	Masculino	374	64,5
	Feminino	206	35,5
	Total	580	100
Idade	<45	106	18,3
	45-60	299	51,6
	>60	175	30,2
Tabagismo	Não	362	62,4
	Sim	218	37,6
Hipertensão arterial	Não	314	54,1
	Sim	266	45,9
IMC	até 25	425	73,3
	26 a 30	50	8,6
	31 a 40	28	4,8
	acima de 40	3	0,52
Sintomas	Não	392	67,6
	Sim	188	32,4
KPS	60	3	0,52
	70	11	1,9
	80	30	5,2
	90	50	8,6
	100	34	5,9
ECOG	0	336	57,9
	1	151	26
	2	14	2,4
	3	1	0,17
História familiar	não	487	84
	sim	22	3,8
Metástase ao diagnóstico	Não	535	92,2
	Sim	45	7,8
Total		580	100

*Excluídos os casos faltantes.

Tabela 2 - Variáveis terapêuticas de 580 pacientes com CCRcc – A.C.Camargo Cancer Center

Variável	Categoria	N	%
Tipo de cirurgia	Nefrectomia parcial	277	47,8
	Nefrectomia radical	303	52,2
Incisão cirúrgica	Subcostal	364	45,5
	Lombotomia	103	17,8
	Laparoscopia	178	30,7
	Robótica	35	6,0
Ressecção	Irressecável	1	0,2
	Ressecção Total	534	92,1
	Ressecção parcial	4	6,0
Status da margem	Livre	518	89,3
	Comprometida	33	5,7
Linfadenectomia	Não	381	65,7
	Sim	158	27,2
Linfonodo positivo	0	140	24,1
	1	7	1,2
	2	2	0,3
	3	6	1,0
	4	1	0,2
	12	1	0,2
Tamanho tumoral	0-4	253	43,6
	4,1-7	179	30,9
	7,1-10	77	13,3
	>10	49	8,4
Total		580	100,0

*Excluídos os casos faltantes.

Tabela 3 - Variáveis patológicas de 580 pacientes com CCRcc no A.C.Camargo Cancer Center

Variável	Categoria	N	%
Invasão de veia renal	Não	439	75,7
	Sim	43	7,4
Invasão de gordura perirrenal	Não	459	79,1
	Sim	88	15,2
Invasão de seio renal	Não	395	68,1
	Sim	88	15,2
Invasão de cápsula	Não	415	71,6
	Sim	114	19,7
Invasão de pelve renal	Não	410	70,7
	Sim	11	1,9
Invasão de ureter	Não	466	80,3
	Sim	8	1,4
Invasão vascular	Não	508	87,6
	Sim	60	10,3
Invasão linfática	Não	545	94,0
	Sim	19	3,3
Invasão de veia cava inferior	Não	387	66,7
	Sim	14	2,4
Necrose tumoral	Não	345	59,5
	Sim	145	25,0
Acometimento de adrenal	Não	406	70,0
	Sim	13	2,2
Componente sarcomatóide	Não	425	73,3
	Sim	24	4,1
Total		580	100,0

*Excluídos os casos faltantes.

Tabela 4 - Variáveis relacionadas a estadiamento patológico de 580 pacientes com CCRcc no A.C.Camargo Cancer Center

Variável	Categoria	N	%
Estadio T	pT0	1	0,2
	pT1a	230	39,7
	pT1b	124	21,4
	pT2a	43	7,4
	pT2b	18	3,1
	pT3a	72	12,4
	pT3b	9	1,6
	pT4	9	1,6
Estadio N	pN0	163	28,1
	pN1	17	2,9
	pNx	399	68,8
Estadio M	pM0	120	20,7
	pM1	26	4,5
	pMx	346	59,7
Total		580	100,0

*Excluídos os casos faltantes.

4.2 REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS DA E-CADERINA

Do total de 580 pacientes estudados, 20 (3,4%) não tiveram perda de expressão, 180 (31%) tiveram perda parcial e 380 (65,5%) tiveram perda total de expressão (Tabela 5). A E-caderina apresentou um padrão de expressão na membrana citoplasmática. As figuras 2 e 3 ilustram os achados da imuno-histoquímica.

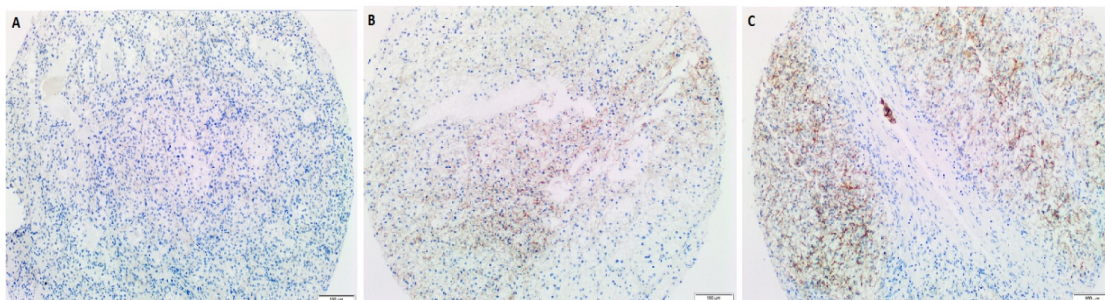


Figura 2 - Lâminas da imuno-histoquímica da E-caderina. A: expressão negativa; B: perda parcial de expressão; C: expressão positiva.

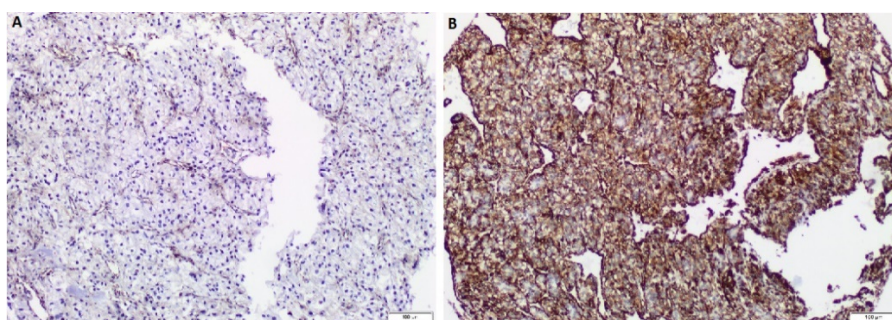


Figura 3 - Lâminas da imuno-histoquímica da vimentina. A: vimentina negativo; B: vimentina positivo.

Tabela 5 – Grau de expressão de E-caderina e vimentina em 580 pacientes portadores de CCRcc – A.C.Camargo Cancer Center

Marcador	Expressão	N	%
E-caderina	perda total	380	65,5
	perda parcial	180	31,0
	ausência de perda	20	3,4
Vimentina	ausente	42	7,2
	presente	538	92,8

Foi observado associação entre perda de expressão de e-caderina e maior tamanho tumoral ($p=0,03$), margem comprometida ($p<0,001$) e necrose tumoral ($p=0,02$), conforme ilustrado nas Tabelas 6 a 8.

Tabela 6 – Variáveis demográficas relacionadas à expressão de E-caderina em 580 pacientes portadores de CCRcc – A.C.Camargo Cancer Center

Variável	Categoria	Expressão de E-caderina			valor p
		perda total	perda parcial	sem perda	
RAÇA	Branco	150	62	10	0,08
	Negro	1	3	0	
	Pardo	20	8	0	
	Amarelo	16	1	0	
SEXO	Masculino	248	111	15	0,42
	Feminino	132	69	5	
KPS	100	26	8	0	0,59
	90	35	14	1	
	80	18	10	2	
	70	9	2	0	
	60	3	0	0	
ECOG	0	213	111	12	0,73
	1	105	39	7	
	2	10	4	0	
	3	1	0	0	
ASA	1	37	23	2	0,17
	2	251	118	10	
	3	58	24	5	
	4	4	0	1	
História de tabagismo	não	238	111	12	0,95
	sim	142	69	8	

*Excluídos os casos faltantes.

Tabela 7 – Variáveis clínicas relacionadas à expressão de E-caderina em 580 pacientes portadores de CCRcc – A.C.Camargo Cancer Center

Variável	Categoria	Expressão de E-caderina				valor p
		perda total	perda parcial	sem perda	Total	
ISUP	1	9	3	1	13	0,22
	2	220	92	8	320	
	3	108	67	6	181	
	4	41	18	5	64	
Metástase ao diagnóstico	Não	347	167	18	532	0,96
	Sim	31	12	2	45	
Ressecção	Irressecável	0	1	0	1	0,12
	Ressecção total	350	168	16	534	
	Ressecção incompleta	3	1	0	4	
Margem cirúrgica	Livre	339	165	14	518	<0,001
	Comprometida	24	9	0	33	
Tamanho tumoral (cm)	0-4	164	82	7	253	0,03
	4,1-7	126	48	5	179	
	7,1-10	54	17	6	77	
	>10	25	22	2	49	
Recidiva	Não	311	144	15	470	0,8
	Sim	51	24	4	79	

*Excluídos os casos faltantes.

Tabela 8 – Variáveis patológicas relacionadas à expressão de E-caderina em 580 pacientes portadores de CCRcc – A.C.Camargo Cancer Center

Variável	Categoria	Expressão de E-caderina				valor p
		perda total	perda parcial	sem perda	Total	
Inv. Veia renal	Não	295	130	14	439	0,65
	Sim	25	16	2	43	
Inv. Gordura perirrenal	Não	305	141	13	459	0,32
	Sim	56	26	6	88	
Inv. Seio renal	Não	263	118	14	395	0,8
	Sim	55	29	4	88	
Inv. Cápsula renal	Não	268	134	13	415	0,21
	Sim	82	29	3	114	
Inv. Pelve renal	Não	266	130	14	410	0,84
	Sim	7	3	1	11	
Inv. microvascular	Não	336	157	15	508	0,47
	Sim	36	20	4	60	
Inv. Linfática	Não	355	171	19	545	0,72
	Sim	13	6	0	19	
Inv. Veia cava inferior	Não	251	123	13	387	0,23
	Sim	8	4	2	14	
Necrose tumoral	Não	229	99	17	345	0,02
	Sim	87	57	1	145	
Inv. Adrenal	Não	263	128	15	406	0,93
	Sim	9	4	0	13	
Componente sarcomatóide	Não	277	133	15	425	0,66
	Sim	14	10	0	24	
Estadio clínico	I e II	250	119	10	379	0,77
	III e IV	44	20	2	66	

*Excluídos os casos faltantes.

4.3 REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS DA VIMENTINA

Do total de 580 pacientes estudados, 42 (7,2%) tiveram expressão ausente, e 538 (92,8%) tiveram expressão da vimentina (Tabela 5), com um padrão de expressão no citoplasma.

Observou-se associação da vimentina com ASA ($p < 0,001$), e curiosamente, com menor grau ISUP (I e II: 95% de expressão; III e IV: 89%) ($p = 0,03$). As demais variáveis analisadas e descritas anteriormente não tiveram associação estatisticamente significativa com os marcadores estudados (Tabelas 9 a 11).

Tabela 9 - Variáveis demográficas relacionadas à expressão de vimentina em 580 pacientes portadores de CCRcc – A.C.Camargo Cancer Center

Variável	Categoria	Expressão de vimentina			valor p
		Ausente	Presente	Total	
RAÇA	Branco	14	208	222	<0,001
	Negro	2	2	4	
	Pardo	4	24	28	
	Amarelo	0	17	17	
SEXO	Masculino	26	348	374	0,73
	Feminino	16	190	206	
ECOG	0	23	313	336	0,66
	1	11	140	151	
	2	0	14	14	
	3	0	1	1	
ASA	1	6	56	62	<0,001
	2	28	351	379	
	3	4	83	87	
	4	0	5	5	
Tabagismo	não	27	334	361	0,86
	sim	15	204	219	
Metástase ao diagnóstico	Não	38	494	532	0,8
	Sim	4	41	45	
Recidiva	Não	32	438	470	0,1
	Sim	8	71	79	

*Excluídos os casos faltantes.

Tabela 10 - Variáveis clínicas relacionadas à expressão de vimentina em 580 pacientes portadores de CCRcc – A.C.Camargo Cancer Center

Variável	Categoria	Expressão de vimentina			valor p
		Ausente	Presente	Total	
ISUP	1	1	12	13	0,03
	2	14	306	320	
	3	22	159	181	
	4	5	59	64	
Ressecção	Irressecável	0	1	1	0,92
	Ressecção Total	40	494	534	
	Margem macroscópica +	0	4	4	
Margem cirúrgica	Livre	39	479	518	0,65
	Comprometida	1	32	33	
Tamanho tumoral	0-4	18	235	253	0,62
	4,1-7	13	166	179	
	7,1-10	2	75	77	
	>10	7	42	49	

*Excluídos os casos faltantes.

Tabela 11 - Variáveis patológicas relacionadas à expressão de vimentina em 580 pacientes portadores de CCRcc – A.C.Camargo Cancer Center

Variável	Categoria	Expressão de vimentina			valor p
		Ausente	Presente	Total	
Inv.** veia renal	Não	29	410	439	0,44
	Sim	5	38	43	
Inv. gordura perirrenal	Não	33	426	459	0,93
	Sim	7	81	88	
Inv. seio renal	Não	25	370	395	0,38
	Sim	7	81	88	
Inv. Cápsula renal	Não	29	386	415	0,14
	Sim	6	108	114	
Inv. pelve renal	Não	29	381	410	0,95
	Sim	1	10	11	
Inv. microvascular	Não	37	471	508	0,59
	Sim	5	55	60	
Inv. linfática	Não	41	504	545	0,49
	Sim	1	18	19	
Inv. veia cava inferior	Não	31	356	387	0,41
	Sim	0	14	14	
Necrose tumoral	Não	29	316	345	0,42
	Sim	8	137	145	
Inv. adrenal	Não	27	379	406	0,69
	Sim	1	12	13	
Componente sarcomatóide	Não	35	390	425	0,2
	Sim	0	24	24	
Estadio clínico	I e II	32	413	445	0,53
	III e IV	10	125	135	

*Excluídos os casos faltantes; **Inv. = invasão

4.4 ANÁLISE DE SOBREVIDA

Durante o seguimento ocorreram 72 óbitos (12,4%), sendo 58 por câncer renal (Tabela 12). Ao truncar a sobrevida num seguimento de 10 anos, houve 48 óbitos, 37 por câncer.

Tabela 12 – Variáveis relacionadas ao desfecho clínico após o tratamento do primário aos 10 anos do estudo de 580 pacientes portadores de CCRcc – A.C.Camargo Cancer Center

Variável	Categoria	N	%
Situação clínica ao término do estudo	Vivo sem doença	461	79,5
	Vivo com doença	37	6,4
	Vivo sem outras especificações	9	1,6
	Morto por câncer	58	10
	Morto por outras causas	14	2,40
	Perda de seguimento	1	0,2
Total		580	100

4.4.1 Sobrevida Global (SG)

Dentre as variáveis clínicas analisadas, as que influenciaram a SG são ECOG ($p<0,001$), ASA ($p<0,001$), presença de sintomas ($p<0,001$), presença de metástase ao diagnóstico ($p<0,001$), tipo de cirurgia realizada ($p<0,001$), status da margem cirúrgica ($p=0,03$), tamanho tumoral ($p<0,001$), recidiva tumoral ($p<0,001$). Já dentre as variáveis patológicas, influenciaram a SG as invasões de gordura perirrenal ($p=0,001$), seio renal ($p=0,001$), cápsula renal ($p<0,001$), pelve renal ($p<0,019$), invasão microvascular ($p<0,001$) e linfática ($p=0,012$), necrose tumoral ($p<0,001$) e estadiamento clínico ($p<0,001$), conforme ilustrado nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13 - Probabilidade acumulada de sobrevida global em 10 anos de acordo com variáveis clínicas em 580 pacientes portadores de CCRcc.

Variável	Categoria	N	SV em 10 anos	valor p
Sexo	Masculino	308	89,9%	0,39
	Feminino	177	90,4%	
Tabagismo	Não	299	89,3%	0,4
	Sim	186	91,4%	
Sintomas	Não	336	93,8%	<0,001
	Sim	148	81,8%	
ECOG	0	293	94,2%	<0,001
	1	120	82,5%	
	2	11	63,6%	
	3	1	100,0%	
ASA	1	56	94,6%	<0,001
	2	324	93,8%	
	3	66	78,8%	
	4	3	100,0%	
Metástase ao diagnóstico	Não	535	93,4%	<0,001
	Sim	45	45,2%	
Tipo de cirurgia	Nefrectomia parcial	303	97,4%	<0,001
	Nefrectomia radical	277	87,6%	
Status da margem	Livre	439	90,4%	0,03
	Comprometida	23	95,7%	
Tamanho tumoral	0-4	218	94,5%	<0,001
	4,1-7	153	92,8%	
	7,1-10	58	74,1%	
	>10	35	71,4%	
Recidiva	Não	411	95,1%	<0,001
	Sim	65	56,9%	
ISUP	1	11	100,0%	0,5
	2	275	91,6%	
	3	139	91,4%	
	4	57	96,5%	

*Excluídos os casos faltantes.

Tabela 14 - Probabilidade acumulada de sobrevida global em 10 anos de acordo com variáveis patológicas em 580 pacientes portadores de CCRcc.

Variável	Categoria	N	SV em 10 anos	valor p
Invasão de veia renal/cava	Não	374	89,3%	0,002
	Sim	32	78,1%	
Invasão de gordura perirrenal	Não	390	91,3%	0,001
	Sim	66	78,8%	
Invasão de seio renal	Não	342	88,9%	0,001
	Sim	62	83,9%	
Invasão de cápsula renal	Não	355	93,5%	<0,001
	Sim	92	78,3%	
Invasão de pelve renal	Não	344	88,1%	0,019
	Sim	8	75,0%	
Invasão microvascular	Não	433	91,7%	<0,001
	Sim	43	72,1%	
Invasão linfática	Não	460	90,4%	0,012
	Sim	12	66,7%	
Necrose tumoral	Não	295	92,2%	<0,001
	Sim	113	80,5%	
Estadio T	pT0	1	100,0%	<0,001
	pT1	18	100,0%	
	pT1a	192	97,9%	
	pT1b	97	95,9%	
	pT2	2	100,0%	
	pT2a	34	88,2%	
	pT2b	15	66,7%	
	pT3	3	100,0%	
	pT3a	55	90,9%	
	pT3b	5	40,0%	
	pT4	7	71,4%	
Estadio N	pN0	197	90,9%	<0,001
	pN1	12	66,7%	
	pNx	246	92,3%	

Cont/ Tabela 14

Variável	Categoria	N	SV em 10 anos	valor p
Estadio M	pM0	87	98,9%	<0,001
	pM1	18	55,6%	
	pMx	310	93,2%	
Estadio clínico	I e II	384	93,80%	<0,001
	III e IV	101	76,20%	

*Excluídos os casos faltantes.

Não se observou impacto da E-caderina e da Vimentina na SG ($p=0,69$ e $p=0,93$ respectivamente), conforme ilustrado nas figuras 4 e 5. Foi analisado ainda se o grau de expressão de vimentina teve impacto na SG, porém não houve significância estatística ($p=0,85$), conforme ilustrado na Figura 6.

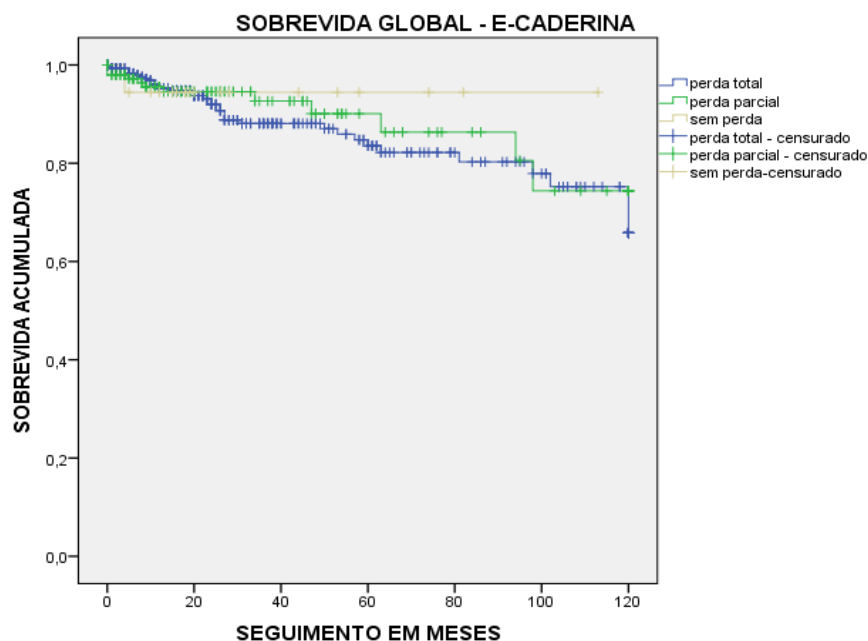


Figura 4 - Curva de sobrevida global em 120 meses para pacientes portadores de CCRcc, estratificados em ausência de perda, perda parcial ou total de expressão de E-caderina ($p=0,69$).

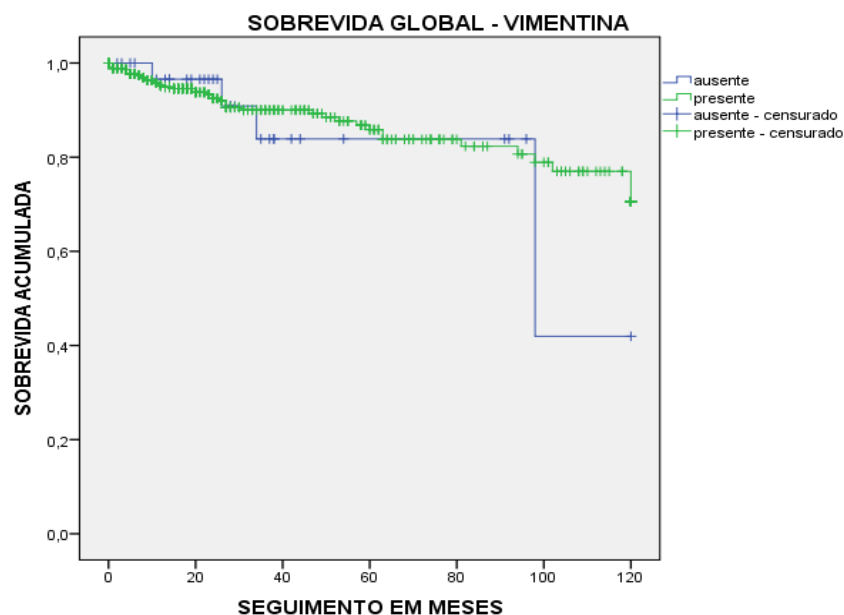


Figura 5 - Curva de sobrevida global em 120 meses para pacientes portadores de CCRcc, estratificados em presença ou ausência de expressão de vimentina ($p=0,93$).

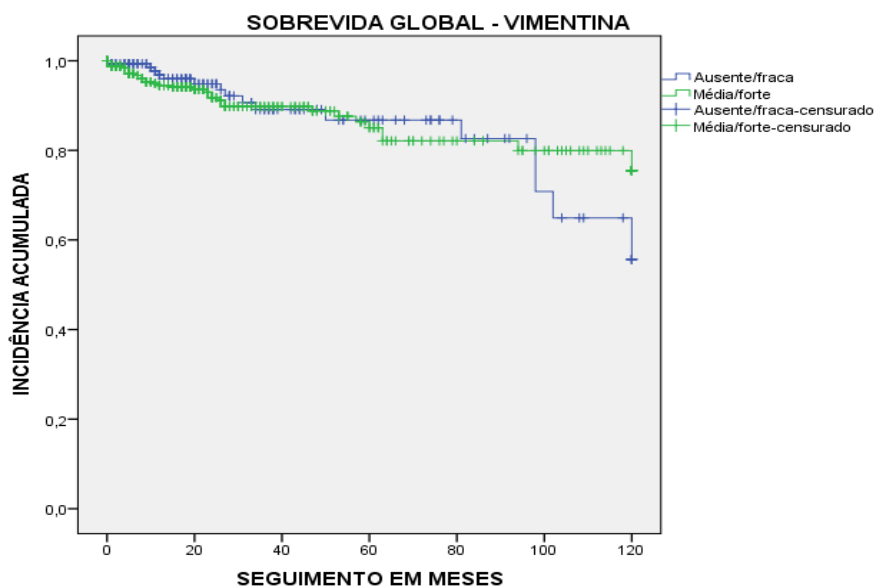


Figura 6 - Curva de sobrevida global em 120 meses para pacientes portadores de CCRcc, estratificados em expressão ausente/fraca ou média/forte de vimentina ($p=0,85$).

- **Análise multivariada**

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada de SG foram selecionadas para a análise multivariada.

No modelo multivariado, mostraram-se fatores independentes para o risco de óbito global a presença de metástases ao diagnóstico (RR=11,1; IC 95% [4,3 - 28,7]), invasão de cápsula renal (RR=4,3; IC 95% [1,8 - 10,6]), invasão microvascular (RR=5,3; IC 95% [1,01 - 27,7]), presença de necrose tumoral (RR=3,1; IC 95% [1,2 - 7,7]), e recidiva tumoral (RR=3,8; IC 95% [1,5 - 9,3]) (Tabela 15).

Tabela 15 - Risco de óbito em 580 pacientes portadores de CCRcc. Modelo multivariado por variáveis selecionadas

Variável	RR	IC 95%
Metástase ao diagnóstico	1 11,1	ref 4,3 – 28,7
Inv. Cápsula renal	1 4,3	ref 1,8 – 10,6
Inv. Vascular	1 5,3	ref 1,01 – 27,7
Necrose Tumoral	1 3,1	ref 1,2 – 7,7
Recidiva	1 3,8	ref 1,5 – 9,3

*Excluídos os casos faltantes.

4.4.2 Sobrevida Câncer-Específica (SCE)

Dentre as variáveis analisadas, as que influenciaram a SCE foram ECOG ($p<0,001$), ASA ($p=0,001$), presença de sintomas ($p<0,001$), metástase ao diagnóstico ($p<0,001$), tipo de cirurgia ($p<0,001$), tamanho tumoral ($p<0,001$), invasões de gordura perirrenal ($p=0,01$), cápsula renal ($p<0,001$), microvascular ($p<0,001$), linfática ($p=0,01$), presença de necrose tumoral ($p<0,001$), estadió clínico ($p<0,001$) e recidiva tumoral ($p<0,001$), conforme ilustrado nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16 - Probabilidade acumulada de sobrevida câncer-específica em 10 anos de acordo com variáveis clínicas em 580 pacientes portadores de CCRcc

Variável	Categoria	N	SV em 10 anos	valor p
ECOG*	0	293	94,2%	<0,001
	1	120	82,5%	
	2	11	63,6%	
	3	1	100,0%	
ASA*	1	56	94,6%	0,001
	2	324	93,8%	
	3	66	78,8%	
	4	3	100,0%	
Sintomas*	Não	336	95,8%	<0,001
	Sim	148	84,5%	
Tabagismo*	Não	298	92,3%	0,89
	Sim	186	92,5%	
Metástase ao diagnóstico*	Não	452	93,4%	<0,001
	Sim	31	45,2%	
Tipo de cirurgia	Nefrectomia parcial	235	95,3%	<0,001
	Nefrectomia radical	249	85,1%	
Tamanho tumoral	0-4	218	94,5%	<0,001
	4,1-7	153	92,8%	
	7,1-10	58	74,1%	
	>10	35	71,4%	

*Excluídos os casos faltantes.

Tabela 17 - Probabilidade acumulada de sobrevida câncer-específica em 10 anos de acordo com variáveis patológicas em 580 pacientes portadores de CCRcc.

Variável	Categoria	N (%)	SV em 10 anos	valor p
Inv. de gordura perirrenal*	Não	390 (85,7)	91,3%	0,01
	Sim	65 (14,3)	78,5%	
Inv. Cápsula renal*	Não	355 (79,6)	93,5%	<0,001
	Sim	91 (20,4)	78,0%	
Inv. Vascular*	Não	433 (91,1)	91,7%	<0,001
	Sim	42 (8,9)	71,4%	
Inv. Linfática*	Não	459 (97,4)	90,4%	0,01
	Sim	12 (2,6)	66,7%	
Necrose tumoral*	Não	295 (72,5)	92,2%	<0,001
	Sim	112 (27,5)	80,4%	
Estadio clínico*	I e II	383 (79,1)	93,7%	<0,001
	III e IV	101 (20,9)	76,2%	
Recidiva*	Não	411 (86,3)	95,1%	<0,001
	Sim	65 (13,7)	56,9%	

*Excluídos os casos faltantes.

Não houve associação entre perda de expressão de e-caderina e expressão de vimentina e SCE ($p=0,79$ e $0,36$ respectivamente), conforme ilustrado nas Figuras 7 e 8. Foi analisado ainda se o grau de expressão de vimentina teve impacto na SCE, porém não houve significância estatística ($p=0,85$), conforme ilustrado na Figura 9.

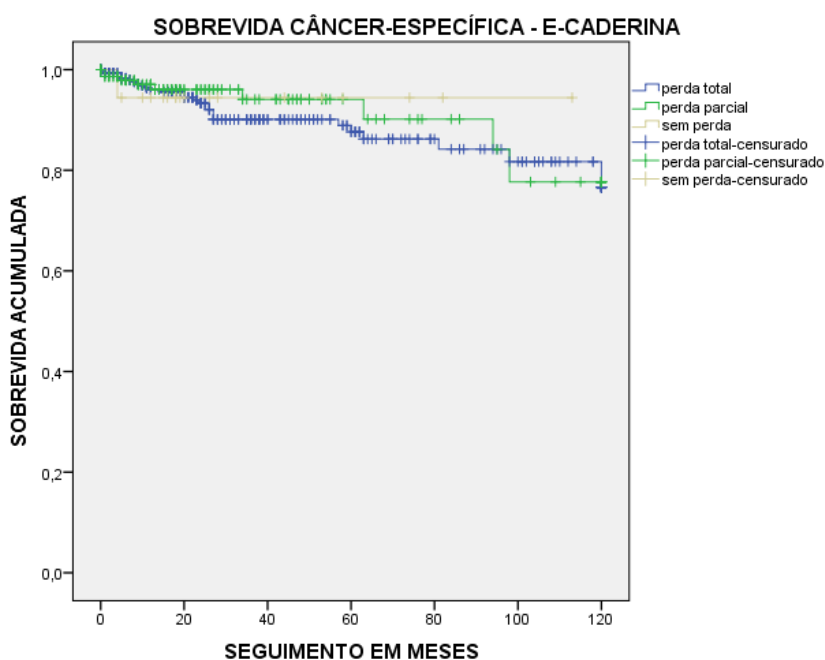


Figura 7 - curva de sobrevida câncer-específica em 120 meses para pacientes portadores de CCRcc, estratificados em ausência de perda, perda parcial ou total de expressão de E-caderina ($p=0,79$).

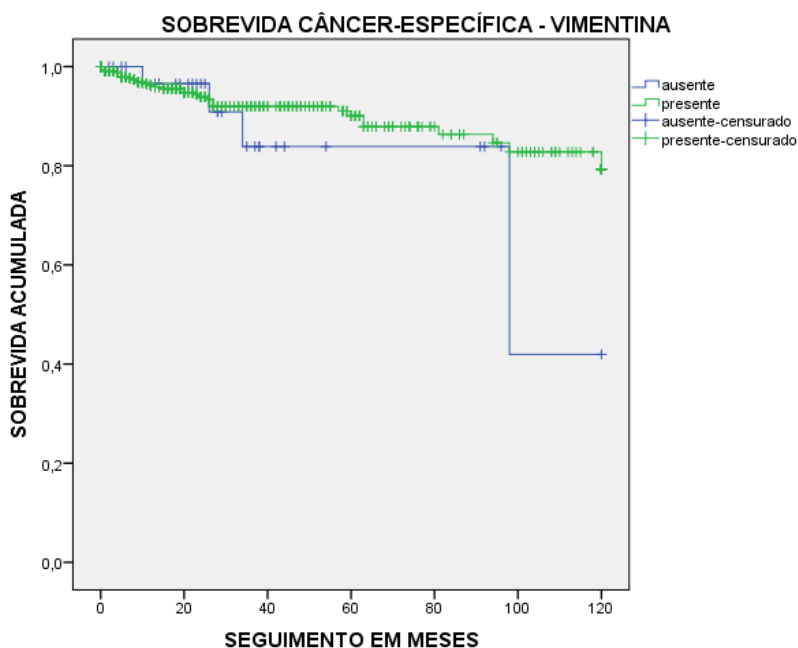


Figura 8 - Curva de sobrevida câncer-específica em 120 meses para pacientes portadores de CCRcc, estratificados em presença ou ausência de expressão de vimentina ($p=0,36$).

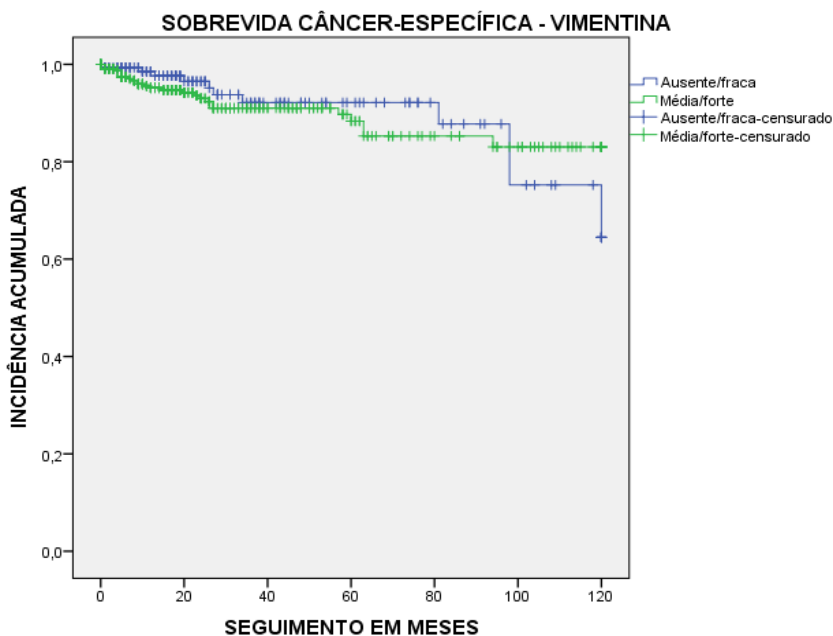


Figura 9 - Curva de sobrevida câncer-específica em 120 meses para pacientes portadores de CCRcc, estratificados em expressão ausente/fraca ou média/forte de vimentina ($p=0,75$).

- **Análise multivariada**

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada de SCE foram selecionadas para a análise multivariada.

No modelo multivariado, os fatores independentes para o risco de óbito por câncer foram a presença de metástase ao diagnóstico (RR=9,6; IC 95% [4,19 – 21,83]), a invasão de cápsula renal (RR=2,7; IC 95% [1,23 – 5,89]), a invasão microvascular (RR=3,4; IC 95% [1,04 – 11,37]), presença de necrose tumoral (RR=4,2; IC 95% [1,91 – 9,38]) e recidiva tumoral (RR=7,4; IC 95% [3,32 – 16,55]) (Tabela 18).

Tabela 18 - Risco de óbito por câncer em 580 pacientes portadores de CCRcc. Modelo multivariado por variáveis selecionadas

Variável	Categoria	RR	IC 95%
Metástase ao diagnóstico	Não	1	Ref
	Sim	9,6	4,19 – 21,83
Inv. Cápsula renal	Não	1	Ref
	Sim	2,7	1,23 – 5,89
Inv. Vascular	Não	1	Ref
	Sim	3,4	1,04 – 11,37
Necrose tumoral	Não	1	Ref
	Sim	4,2	1,91 – 9,38
Recidiva	Não	1	Ref
	Sim	7,4	3,32 – 16,55

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos houve um grande avanço no conhecimento da biologia molecular tumoral. O estudo clássico de HANAHAN e WEINBERG (2000) mostrou que a tumorigênese é constituída de várias etapas, com alterações genômicas como aumento da função e síntese de oncogenes e perda de função de genes supressores tumorais, além de alterações moleculares, bioquímicas e celulares, observadas na maioria dos tipos de tumores, levando a alterações progressivas que afetam o controle do ciclo celular e sua homeostase. Segundo este estudo, as seis principais etapas para a malignização são o aumento dos sinais de crescimento, inibição dos sinais inibidores do crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial de replicação ilimitado, angiogênese sustentada e invasão tecidual e metástase. Esta última tem como evento-chave a perda de moléculas de adesão célula-célula, sendo a e-caderina a principal delas.

A melhor compreensão dos mecanismos de progressão tumoral e surgimento de metástases permitiu o desenvolvimento de drogas-alvo, que agem interrompendo cascatas de eventos cruciais para os mesmos. Neste sentido, é importante predizer com maior precisão o prognóstico e os riscos de recidiva e metástases no pós-operatório de ressecção de tumores renais, de modo a auxiliar o seguimento e escolha do tratamento complementar adequado, se necessário.

Nosso estudo foi realizado para avaliar a presença de TEM em CCRcc, através da perda de expressão da e-caderina e da expressão de

vimentina, dois eventos considerados fundamentais neste processo. Deste modo, avaliamos seu papel prognóstico e sua possível correlação com características tumorais adversas, com a maior casuística descrita até o presente momento, com 580 pacientes estudados.

A e-caderina é considerada um evento-chave no processo de TEM. Embora a perda de sua expressão ter sido bem estudada e correlacionada com pior prognóstico e biologia tumoral agressiva, seu papel em CCRcc ainda é incerto. Em nosso estudo, na maioria dos casos (96,5%) houve algum grau de perda de expressão. Tal achado foi condizente com a literatura, que mostra que a maioria dos tumores de células claras expressa parcialmente a e-caderina. KATAGIRI et al. (1995) analisaram a expressão de e-caderina em CCR e observaram sua expressão imuno-histoquímica em 20% dos mesmos. Além disso, a e-caderina teve menor expressão nos túbulos contorcidos proximais, onde se origina a maioria dos CCRcc, em comparação com os túbulos contorcidos distais e coletores. Em seu estudo, ZHANG et al. (2017) observaram que houve perda parcial ou total da expressão de e-caderina em praticamente todas as amostras de TMA de 125 pacientes estudados.

Observamos associação entre a perda de expressão de e-caderina e tamanho tumoral, margem positiva e necrose tumoral, características adversas classicamente relacionadas a prognóstico adverso. Tais achados corroboram a hipótese de que a diminuição da e-caderina favorece a migração celular e o desenvolvimento de metástases devido a dois fatores principais. Primeiro, a perda de junção célula-célula facilita o desprendimento de células do tecido tumoral e da matriz extracelular,

podendo estas atingir a corrente sanguínea e assim alcançar e colonizar outros sítios. Segundo, a perda da e-caderina na membrana leva a um aumento da beta-catenina citoplasmática. Esta proteína tem função estrutural no citoesqueleto e ajuda na junção intercelular quando ligada àquela. Assim, uma vez acumulada no citoplasma, pode ser degradada, ou ativar a via WNT/beta-catenina, que promove seu deslocamento para o núcleo, onde forma complexos com fatores de ligação específicos de células T e linfóide, e promove a transcrição de genes-alvo, como os oncogenes ciclina-D1 e MYC (JOOSTEN et al. 2018). Além disso, participa do processo de TEM ao promover a transcrição de *TWIST*, *SNAIL1* e *SLUG*, inibidores da expressão de e-caderina. Snail1 pode também interagir diretamente com a beta-catenina e amplificar a via do WNT, através de mecanismo de feedback positivo. Outro fator de transcrição estimulado pela beta-catenina é ZEB1, que reprime marcadores epiteliais como a e-caderina, e estimula a expressão de marcadores mesenquimais (VALENTA et al. 2012). ZHANG et al. em um estudo com 125 pacientes, observaram que a ausência de e-caderina teve impacto significativo na sobrevida livre de doença ($p=0.031$), e a associação entre esta e o acúmulo de beta-catenina citoplasmática teve impacto tanto em SG ($p=0.014$) como SCE ($p=0.011$).

Não observamos relação entre a expressão de e-caderina e sobrevida global ou câncer-específica. Os achados na literatura em relação a sobrevida são conflitantes. KATAGIRI et al. (1995) analisaram a expressão de e-caderina em tumores primários e metástases, e observaram perda de expressão em ambos os tecidos, e associação com estádios mais avançados da doença (III e IV). Houve também diferença significativa na

sobrevida global ($p=0.022$), porém sem significância em relação a sobrevida livre de doença ($p=0.078$). HARADA et al. (2012) ao analisarem expressão forte ou fraca de e-caderina em 122 pacientes com CCR, não observaram associação com fatores clínico-patológicos adversos. A expressão fraca de e-caderina foi fator significativo para a sobrevida livre de recidiva na análise univariada, mas não mostrou ser um fator independente de prognóstico na análise multivariada.

A vimentina é uma proteína estrutural encontrada em células mesenquimais, responsável por múltiplas funções celulares. Ela liga-se aos filamentos de actina e microtúbulos, e tem papel crucial na motilidade, transporte intracelular e ciclo regulatório celular, ao conectar-se ao núcleo. Durante a TEM ocorrem alterações na composição dos filamentos intermediários, com a repressão de citokeratina e ativação de vimentina. Tais alterações permitem o aumento da motilidade celular, possivelmente pela interação da vimentina com proteínas motoras.

Em nossa casuística, não observamos impacto da expressão de vimentina em SG e SCE. Curiosamente, os tumores com menor grau ISUP tiveram maior expressão (I e II tiveram expressão em 95%, enquanto III e IV em 89%), apesar de a expressão ser predominante em ambos. Tal achado confronta os dados da literatura, que associa sua expressão a características tumorais agressivas e a tumores indiferenciados. SHI et al. (2015) em um estudo com 65 casos, observaram que tumores com maior grau, estádios mais avançados e invasão linfática apresentaram maior expressão de vimentina, com impacto nas taxas de sobrevida. CHEN et al. (2014) analisaram 28 amostras tumorais de CCRcc e observaram que maior

expressão de vimentina foi associada a menor SCE. Entretanto, HARADA et al. (2012) não observaram associação da expressão de vimentina e variáveis clínicas ou patológicas, e esta não mostrou-se um fator independente de sobrevida na análise multivariada.

MOCH et al. em 1999, estudaram as expressões gênica e imuno-histoquímica de proteínas com o objetivo de tentar diferenciar CCRcc, CCR cromóforo e oncocitoma. Os autores observaram que a vimentina foi expressa em 51% dos CCRcc e teve associação com pior prognóstico. YOUNG et al. em 2001, também estudaram as expressões gênica e imunohistoquímica de proteínas com o mesmo objetivo. A vimentina não foi expressa em CCR cromóforo e oncocitoma, mas foi expressa em 85% dos CCRcc, sendo então um parâmetro utilizado para diagnóstico do mesmo. Estes estudos mostraram que há predominância da expressão de vimentina em CCRcc de maneira geral, porém apenas o primeiro correlacionou a mesma com prognóstico.

As divergências encontradas na literatura também podem ser explicadas pelo fato de que os tumores renais são lesões complexas, com um padrão molecular heterogêneo, o que contribui com seu comportamento imprevisível. Tal heterogeneidade intratumoral (HIT) parece estar relacionada a comportamento agressivo, e parece ser maior em tumores de alto grau e grande volume. ZALDUMBIDE et al. (2015) estudaram prospectivamente 48 casos de CCRcc órgão-confinados, e observaram que 54% dos mesmos eram heterogêneos em pelo menos um dos 7 parâmetros analisados (tamanho tumoral, tipo celular, grau nuclear de Fuhrman, expressão imuno-histoquímica de CAIX, BAP-1, COX-2, Ki-67). A HIT

permaneceu pouco compreendida, porém os autores concluíram que tumores maiores que 3,8cm tendem a ser heterogêneos.

Em um estudo recente, GUARCH et al. (2018) analisaram amostras tumorais usando técnicas rotineiras de amostragem (com média de 7.3 amostras por caso) e métodos com amostras em múltiplos sítios tumorais (com média de 43.3 amostras por caso), e observaram que os tumores de alto grau tiveram maior heterogeneidade que os de baixo grau, quando analisados através de imuno-histoquímica. Neste estudo, a e-caderina foi significativamente mais expressa em tumores de baixo grau. Já a vimentina teve expressão predominante tanto em amostras de baixo quanto de alto grau (>95%), sugerindo que a vimentina talvez não seja um bom marcador prognóstico em CCRcc. Em nosso estudo, os materiais utilizados para a confecção dos TMAs foram feitos com duas amostras representativas de cada caso, com a vimentina mais expressa em tumores de alto grau, porém sem diferença em relação à expressão de e-caderina. Assim, o uso de TMAs com número limitado de material (em nosso estudo, foram 2 amostras representativas de cada caso) talvez não seja suficiente para o entendimento do complexo padrão de comportamento dos tumores renais devido à HIT.

6 CONCLUSÕES

- A e-caderina teve associação com características tumorais agressivas, como necrose tumoral, tamanho e margem positiva, o que sugere relação com doença de pior prognóstico.
- A vimentina não teve correlação com variáveis adversas.
- Apesar de estarem relacionadas a TEM, estes marcadores não tiveram associação com sobrevida global ou câncer-específica, portanto não se mostraram bons marcadores prognósticos em nosso estudo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Becker F, Siemer S, Kamradt J, Zwergel U, Stöckle M. Important aspects of organ preserving surgery for renal tumors: indications, new standards, and oncological outcomes. **Dtsch Arztebl Int** 2009; 106:117-22.

Bekema HJ, MacLennan S, Imamura M, et al. Systematic review of adrenalectomy and lymph node dissection in locally advanced renal cell carcinoma. **Eur Urol** 2013; 64:799-810.

Bremnes RM, Veve R, Gabrielson E, et al. High-throughput tissue microarray analysis used to evaluate biology and prognostic significance of the E-cadherin pathway in non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol** 2002; 20:2417-28.

Chang L, Goldman RD. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2004; 5:601-13.

Chen D, Gassenmaier M, Maruschke M, et al. Expression and prognostic significance of a comprehensive epithelial-mesenchymal transition gene set in renal cell carcinoma. **J Urol** 2014; 191:479-86.

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

Da Costa WH, Moniz RR, da Cunha IW, Fonseca FP, Guimaraes GC, de Cássio Zequi S. Impact of renal vein invasion and fat invasion in pT3a renal cell carcinoma. **BJU Int** 2012; 109:544-8.

Dall'Oglio MF, Antunes AA, Sarkis AS, et al. Microvascular tumour invasion in renal cell carcinoma: the most important prognostic factor. **BJU Int** 2007; 100:552-5.

Eble JN, Togashi K, Pisani P. Renal cell carcinoma. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. **Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs**. Lyon: WHO; 2004. p.12-4.

Fan CC, Wang TY, Cheng YA, et al. Expression of E-cadherin, Twist, and p53 and their prognostic value in patients with oral squamous cell carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol** 2013; 139:1735-44.

Ficarra V, Galfano A, Mancini M, Martignoni G, Artibani W. TNM staging system for renal-cell carcinoma: current status and future perspectives. **Lancet Oncol** 2007; 8:554-8.

Guarch R, Lawrie CH, Larrinaga G, Angulo JC, Pulido R, López JI. High levels of intratumor heterogeneity characterize the expression of epithelial-mesenchymal transition markers in high-grade clear cell renal cell carcinoma. **Ann Diagn Pathol** 2018; 34:27-30.

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

Harada K, Miyake H, Kusuda Y, Fujisawa M. Expression of epithelial-mesenchymal transition markers in renal cell carcinoma: impact on prognostic outcomes in patients undergoing radical nephrectomy. **BJU Int** 2012; 110:E1131-7.

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.

Horvath L, Henshall S. The application of Tissue Microarray to cancer research. **Pathology** 2001; 33:125-9.

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.

Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. **Cancer Sci** 2010; 101:293-9.

Joosten SC, Smits KM, Aarts MJ et al. Epigenetics in renal cell cancer: mechanisms and clinical applications. **Nat Rev Urol** 2018;15(7):430-451.

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

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.

Kim DY, Karam JA, Wood CG. Role of metastasectomy for metastatic renal cell carcinoma in the era of targeted therapy. **World J Urol** 2014; 32:631–42.

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

Li L, Li W. Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and Differentiation. **Pharmacol Ther** 2015;150:33-46.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell** 2008; 133:704-15.

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

Moch H, Schraml P, Bubendorf L et al. High-Throughput Tissue Microarray Analysis to Evaluate Genes Uncovered by cDNA Microarray Screening in Renal Cell Carcinoma. **Am J Pathol** 1999; 154(4): 981–986.

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

Paul R, Necknig U, Busch R, Ewing CM, Hartung R, Isaacs WB. Cadherin-6: a new prognostic marker for renal cell carcinoma. **J Urol** 2004; 171:97-101.

Powles T, Albiges L, Staehler M, et al. Updated European Association of Urology Guidelines recommendations for the treatment of first-line metastatic clear cell renal cancer. **Eur Urol** 2018; 73:311-5.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature** 2001; 414:105-11.

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

Sakai I, Miyake H, Takenaka A, et al. Expression of potential molecular markers in renal cell carcinoma: impact on clinicopathological outcomes in patients undergoing radical nephrectomy. **BJU Int** 2009; 104:942-6.

Sella A, Wang K, Sella T. The evolution of nephrectomy and patient characteristics in metastatic renal cell carcinoma patients enrolled into first-line tyrosine kinase inhibitors clinical trials. **Clin Genitourin Cancer** 2016; 14:415-9.

Shi ZG, Li SQ, Li ZJ, Zhu XJ, Xu P, Liu G. Expression of vimentin and survivin in clear cell renal cell carcinoma and correlation with p53. **Clin Transl Oncol** 2015; 17:65-73.

Takeichi M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. **Annu Rev Biochem** 1990; 59:237-52.

Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. **Nat Med** 2013;19(11):1438-49.

Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of β -catenin. **EMBO J** 2012; 31:2714-36.

Weight CJ, Lieser G, Larson BT, et al. Partial nephrectomy is associated with improved overall survival compared to radical nephrectomy in patients with unanticipated benign renal tumours. **Eur Urol** 2010; 58:293-8.

Williams AA, Higgins JP, Zhao H, Ljunberg B, Brooks JD. CD9 and vimentin distinguish clear cell from chromophobe renal cell carcinoma. **BMC Clin Pathol** 2009; 9:9.

Woldrich JM, Mallin K, Ritchey J, Carroll PR, Kane CJ. Sex differences in renal cell cancer presentation and survival: an analysis of the National Cancer Database, 1993-2004. **J Urol** 2008; 179:1709-13.

Young AN, Amin MB, Moreno CS, et al. Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers. **Am J Pathol** 2001; 158:1639-51.

Zaldumbide L, Erramuzpe A, Guarch R, Cortés JM, López JI. Large (>3.8 cm) clear cell renal cell carcinomas are morphologically and immunohistochemically heterogeneous. **Virchows Arch** 2015; 466:61-6.

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



A.C. Camargo
Cancer Center

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

APROVAÇÃO

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 **04/10/2016**, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de **23/08/2016**, **aprovaram** a realização do projeto nº **2244/16** intitulado: **“Avaliação do valor prognóstico da presença de transição epitélio-mesenquima através das expressões imuno-histoquímicas de E-Caderina e Vimentina em carcinomas de células renais do tipo células claras”**.

Pesquisador responsável: Dr. Walter Henrique da Costa.
Aluno: Bruno Hurtado Rodrigues (Mestrado).

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

São Paulo, 13 de outubro de 2016.

Atenciosamente,

Dra. Sandra Caíres Serrano
2ª Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 - Classificação de Performance-Status da ECOG.

ECOG	Descrição
0	Completamente ativo; capaz de realizar todas as suas atividades sem restrição
1	Restrição a atividades físicas rigorosas; é capaz de trabalhos leves e de natureza sedentária
2	Capaz de realizar todos os auto-cuidados, mas incapaz de realizar qualquer atividade de trabalho; em pé aproximadamente 50% das horas em que o paciente está acordado
3	Capaz de realizar somente auto-cuidados limitados, confinado ao leito ou cadeira mais de 50% das horas em que o paciente está acordado
4	Completamente incapaz de realizar auto-cuidados básico, totalmente confinado ao leito ou à cadeira

Anexo 3 - Classificação TNM da “*American Joint Committee on Cancer*” (AJCC).

Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T1	Tumor com até 7cm de diâmetro, limitado ao rim
T1a	Tumor <4cm no maior diâmetro
T1b	Tumor >4 e <7cm no maior diâmetro
T2	Tumor com mais de 7cm de diâmetro, limitado ao rim
T2a	Tumor >7 e <10cm no maior diâmetro
T2b	Tumor >10cm no maior diâmetro
T3	Tumor com extensão até grandes vasos, glândula adrenal ipsilateral ou tecido perinefrético, sem ultrapassar a fáscia de Gerota
T3a	Tumor com extensão até glândula adrenal ipsilateral, ou tumor invade seio e/ou gordura perinéfrica mas não ultrapassa fáscia de Gerota
T3b	Tumor com extensão até veia renal e seus ramos segmentares ou veia cava infra-diafragmática
T3c	Tumor com extensão até veia cava supra-diafragmática ou infiltração da parede da veia cava
T4	Tumor com invasão além da Fáscia de Gerota
Nx	Linfonodos não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases linfonodais
N1	Presença de metástase em 1 linfonodo regional
N2	Presença de metástase em mais de 1 linfonodo regional
Mx	Metástases não podem ser avaliadas
M0	Ausência de metástases a distância
M1	Presença de metástases a distância

Anexo 4 - Estadiamento Clínico da “*American Joint Committee on Cancer*” (AJCC).

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

Anexo 5 - Classificação de risco do Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC).

Critérios do MSKCC para câncer renal metastático
Hemoglobina sérica < limite do valor normal
Cálcio sérico > 10mg/dL
DHL > 1,5x o valor normal
Tempo diagnóstico-metástase < 1 ano
Karnofsky performance-status < 80%

A presença de cada variável acima equivale a um ponto

Anexo 6 - Estadiamento segundo a Classificação do MSKCC.

Grupo de risco	Pontos	Sobrevida Mediana
Favorável	0	20 meses
intermediário	1 - 2	10 meses
desfavorável	>2	4 meses

Anexo 7 - Classificação de risco do IMDC.

Anemia Hemoglobina < 10g/dl

Neutrófilos > 7500

Cálcio corrigido > 5.5

Karnofsky performance-status < 80%

Tempo diagnóstico-metástase < 1 ano