

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

MARCOS VINÍCIUS ODORÍSSIO FERRARI

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr Walter Henriques da Costa

Co-orientadora: Dra Isabela Werneck da Cunha

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Ferrari, Marcos Vinícius Odoríssio

Análise do valor prognóstico e da expressão imuno-histoquímica de ezrina e moesina em carcinoma de células renais do tipo células claras / Marcos Vinícius Odoríssio Ferrari –São Paulo, 2019.

43p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Walter Henriques da Costa

Descritores: 1. Neoplasias renais/Kidney Neoplasms. 2. Carcinoma de Células Renais/Carcinoma, Renal Cell. 3. Biomarcadores/Biomarkers. 4. Imuno-Histoquímica/ Immunohistochemistry. 5. Prognóstico/Prognosis

DEDICATÓRIA

À minha família, fonte de amor, orientação e educação

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

AGRADECIMENTOS

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

À Dra Isabela Werneck da Cunha, minha co-orientadora, pela participação atuante e pelos ensinamentos valiosos durante o decorrer do estudo.

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

À Dra Mariana Morini por toda orientação que recebi, pela dedicação e disponibilidade no trabalho de bancada no Departamento de Patologia.

Ao Dr Vinícius Calsavara, por todos os ensinamentos em estatística que me proporcionaram realizar análises precisas durante este estudo.

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

RESUMO

Ferrari MVO. **Análise do valor prognóstico e da expressão imuno-histoquímica de ezrina e moesina em carcinoma de células renais do tipo células claras.** São Paulo; 2019. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

O objetivo deste estudo foi avaliar o papel prognóstico da expressões imuno-histoquímicas (IHQ) de ezrina e moesina em pacientes portadores de carcinoma de células renais do tipo células claras (ccRCC). Os prontuários de 575 pacientes tratados pelo Núcleo de Urologia do A.C Camargo Cancer Center foram revisados. Todos os pacientes foram submetidos a tratamento cirúrgico de 1985 a 2016. Os tumores foram revisados por patologista da instituição, reclassificados e escolhidas suas áreas mais representativas para construção de lâmina de *tissue microarray* (TMA). A análise imuno-histoquímica mostrou que 106 (18.3%) pacientes não apresentaram expressão de ezrina, enquanto 469 (81.7%) pacientes exibiram expressão positiva do marcador. Para moesina, 16 (2.8%) pacientes não apresentaram expressão IHQ, e 559 (97.2%) evidenciaram expressão positiva do marcador. A expressão de ezrina foi associada ao estágio patológico T ($p<0,001$), ao estágio clínico agrupado ($p=0,012$), à presença de metástases sincrônicas ($p<0,001$), à tumores sintomáticos ($p=0,007$) e grau histológico (ISUP) ($p=0,025$). Houve associação entre expressão de moesina e estadio clínico agrupado ($p=0,027$), estadio patológico T ($p=0,025$) e estadio patológico N ($p=0,007$). Expressão de ezrina influenciou significativamente sobrevida câncer específica (SCE). Na análise multivariada, expressão negativa de ezrina foi fator de risco independente para SCE (HR 1,89 [IC95% 1,11 – 3,20]).

Descritores: Neoplasias renais. Carcinoma de Células Renais. Biomarcadores. Imuno-Histoquímica. Prognóstico

SUMMARY

Ferrari MVO. **[Prognostic evaluation and immunohistochemical expression analysis of ezrin and moesin in clear cell renal cell carcinoma]**. São Paulo; 2019. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

The aim of the study was to evaluate the prognostic role of immunohistochemical expression of ezrin and moesin proteins in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). The charts of 575 patients treated at Department of Urology of the A.C. Camargo Cancer Center were reviewed. All patients underwent surgical treatment from 1985 and 2016. A single pathologist reviewed all cases to make a uniform reclassification and determined the most representative tumor areas for construction of a tissue microarray (TMA). Of all ccRCC specimens, 106 (18.3%) had ezrin negative expression and 469 (81.7%) had positive ezrin expression; for moesin, 16 (2.8%) had negative expression and 559 (97.2%) had positive expression. The expression of ezrin was associated with pT stage ($P<0.001$), clinical stage ($P=0.012$), synchronic metastasis ($P<0.001$), incidental tumor ($P=0.007$) and ISUP histological grade ($P = 0,025$). There was association between moesin expression and clinical stage ($P=0.027$), pT stage ($P=0.025$) and pN stage ($P=0.007$). Ezrin expression significantly influenced tumor related death. In multivariate analysis, ezrin negative expression was an independent risk factor for disease specific survival (DSS) – HR 1,89 [IC 95% 1.11 – 3.20]

Key-words: Kidney Neoplasms. Carcinoma, Renal Cell. Biomarkers. Immunohistochemistry. Prognosis

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ASA	American Society of Anesthesiology
CCR/RCC	Carcinoma de células renais
ccRCC	Carcinoma de células renais do tipo células claras
CEC	Carcinoma espinho-celular
CTLA-4	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
DSS	Disease specific survival
ECOG	Eastern Cooperative Oncologic Group
HR	Hazard Ratio
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
IMDC	International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium
IHQ	Imuno-histoquímica
MLI	Invasão linfática microscópica
MVI	Invasão vascular microscópica
MSKCC	Memorial Sloan Kettering Cancer Center
mTOR	mammalian target of rapamycin
OS	Overall survival
PD-1	Receptor 1 de morte celular programada
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
SCE	Sobrevida câncer específica
SG	Sobrevida global
SRM	Small renal mass
TMA	Tissue microarray
TNM	Tumor-node-metastasis
VEGF	Vascular endothelial growth factor

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O Carcinoma de Células Renais (CCR)	1
1.2	Os Marcadores	7
1.2.1	Ezrina e Moesina.....	7
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo Geral.....	13
2.2	Objetivos Específicos	13
3.	ARTIGO.....	14
4	CONCLUSÕES	35
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

ANEXOS

Anexo 1 Revisão de dados pós-publicação

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

Anexo 3 Classificação TNM de 2002 da “American Joint Committee on Cancer”

Anexo 4 Estadiamento clínico de 2002 da “American Joint Committee on Cancer”

Anexo 5 Classificação TNM de 2009 da “American Joint Committee on Cancer”

Anexo 6 Estadiamento clínico de 2009 da “American Joint Committee on Cancer”

Anexo 7 Carta de aceitação do Artigo (19.09.2019)

Anexo 8 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 9 Classificação de risco em CCR metastático do IMDC

Anexo 10 Critérios de inclusão/exclusão de pacientes e de
positividade da expressão IHQ dos marcadores

APÊNDICE

Apêndice 1 Ficha de levantamento de dados

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS (CCR)

O CCR corresponde a 2,2% do total de neoplasias malignas, e a 90% das neoplasias renais. Em 2018 foi o décimo sexto câncer mais incidente, em estatística mundial com mais de 403 mil casos novos (BRAY et al. 2018). É mais incidente no sexo masculino na proporção de 1,5:1, predominantemente na sétima década de vida (CAPITANIO e MONTORSI 2016). O câncer renal foi responsável por 175 mil mortes no mundo em 2018 (BRAY et al. 2018). No Brasil, estima-se 6.270 novos casos para o mesmo ano, de acordo com o INCA. A base de dados mais recente do DATASUS mostra uma evolução crescente anual do número de óbitos por câncer renal desde 2010 até 2016, quando ocorreram 3.286 óbitos (2016); os dados nacionais e mundiais acima ressaltam que a despeito da baixa incidência, sua letalidade é alta.

Um terço dos pacientes é diagnosticado através de sinais e sintomas clínicos (CAPITANIO e MONTORSI 2016), porém a grande maioria dos casos de câncer renal é de achado incidental, devido ao aumento da realização de exames de imagem como ultrassonografia e tomografia computadorizada para outras queixas abdominais ou como rastreamento, elevando o percentual de neoplasias renais em estagio inicial (CAPITANIO e MONTORSI 2016). Em nossa instituição, o valor mediano do diâmetro tumoral em meados

da década de 1990 foi 2,3cm menor que na metade da década de 1980 (9,0 versus 6,7cm, respectivamente) (ZEQUI 2000).

Fatores de risco clínicos para a neoplasia renal como o tabagismo, obesidade e hipertensão arterial sistêmica já estão consistentemente bem estabelecidos (MCLAUGHLIN et al. 2006). A doença renal cística adquirida, que leva o paciente à insuficiência renal crônica também tem associação com CCR, particularmente no subgrupo submetido a diálise, com risco relativo de 3 a 6 vezes em relação ao risco de população geral (PORT et al. 1989).

O tratamento do CCR é essencialmente cirúrgico. Historicamente, a nefrectomia radical inclui a ligadura precoce dos vasos renais, remoção do rim externamente à fáscia de Gerota, incluindo a glândula adrenal ipsilateral, além da linfadenectomia estendida (O'MALLEY et al. 2009). A cirurgia poupadora de néfrons tem se mostrado eficiente no controle tumoral local e apresenta resultados oncológicos comparáveis à cirurgia radical (RUSSO e HUANG 2008). O interesse sobre a nefrectomia parcial cresceu devido a alguns fatores como o avanço imagiológico renal, o aumento da detecção incidental dos tumores em estádios iniciais, a melhora dos métodos para prevenção de isquemia renal e o aumento da experiência cirúrgica em relação à vasculatura renal (UZZO e NOVICK 2001). Atualmente a nefrectomia parcial é o tratamento cirúrgico padrão para tumores menores de 4cm (estadio T1a) (HUANG et al. 2009). Estudos também demonstraram resultados oncológicos equivalentes para nefrectomia radical ou parcial nos tumores entre 4 e 7 cm (estádio T1b); com benefício para a nefrectomia parcial em relação a

preservação de função renal e prevenção de IRC (JONIAU et al. 2009; THOMPSON et al. 2009).

A vigilância ativa é uma opção terapêutica no tratamento de tumores renais até 4cm, principalmente em paciente idosos e com baixa performance (VAN POPPEL et al. 2011). Do total de tumores até 3cm, 20% deles se mostram benignos à biopsia renal enquanto apenas 20-25% são carcinomas de células renais de comportamento potencialmente agressivo (ISUP 3 ou 4) (REMZI et al. 2006). Além disso, as técnicas ablativas como radiofrequência e crioablação são também opções terapêuticas para tumores pequenos, idealmente até 3cm em pacientes idosos e com múltiplas comorbidades as quais elevem o risco para o tratamento cirúrgico, e também para síndromes familiares, tumores bilaterais ou portadores de rim único. Estes 3 últimos exemplos também podem ser tratados com cirurgia poupadora de néfrons, caso o paciente for elegível para tratamento cirúrgico. Estudos sugerem uma taxa de recorrência local mais alta em paciente submetidos a ablação com radiofrequência em relação aos paciente operados com técnicas preservadora de néfrons (LJUNGBERG et al. 2015).

O CCR metastático cursa com prognóstico extremamente reservado. Historicamente, a sobrevida em pacientes com tumores metastáticos foi menor que 5% em 10 anos (MOTZER et al. 1999). A terapia alvo molecular com os inibidores de tirosina-kinase (especificamente VEGF e mTOR) impactou positivamente esta sobrevida, porém predominantemente de modo parcial, sendo raros os casos de respostas completas. Mais recentemente, o advento da classe de drogas inibidoras de *checkpoint* imunológico vem

apresentando melhores resultados em sobrevida nos casos metastáticos. Drogas como o nivolumab (inibidor de PD-1) associado ao ipilimumab (anticorpo anti-CTLA4) são atualmente escolhas de primeira linha para CCR metastático de prognóstico ruim ou intermediário, de acordo com a classificação do *Memorial Sloan Kettering Cancer Center-MSKCC* ou *International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium- IMDC*. Para os casos de prognóstico favorável, as drogas de escolhas são o sunitinib ou pazopanib, em primeira linha (POWLES et al. 2018).

A nefrectomia citorrredutora, que antes era relacionada à uma maior sobrevida nos pacientes metastáticos, após o início do uso da terapia alvo e mais recentemente da imunoterapia, não teve seu papel bem estabelecido (MÉJEAN et al. 2018; BEX et al. 2019).

Os fatores prognósticos classicamente utilizados para neoplasia renal foram descritos inicialmente por ROBSON et al. em 1969: estadio clínico, o grau histológico de malignidade, o envolvimento linfonodal e a presença de metástases a distância.

O sistema prognóstico mais amplamente utilizado no CCR atualmente é o *Tumor-Node-Metastasis* (TNM). Está em sua oitava edição pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e constitui importante ferramenta para estratificação dos pacientes. Baseia-se na avaliação de características tumorais anatômicas como tamanho do tumor e invasão de estruturas hilares e peri-renais, bem como invasão vascular macroscópica, disseminação linfonodal e metástases à distância (PANER et al. 2018). O tamanho do tumor é fator prognóstico importante e independente de sobrevida. O acometimento

linfonodal também tem impacto no prognóstico: as taxas de sobrevida câncer específica (SCE) em 5 anos variam entre 11 a 30%, sendo que metade destes casos já cursam com metástases à distância (CHAPIN et al. 2011). Os casos metastáticos cursam prognóstico mais reservado. Apesar do advento da terapia alvo-molecular anti-angiogênica, os pacientes metastáticos classificados como de prognóstico ruim (pelo IMDC ou MSKCC) apresentam sobrevida global em média de apenas 19 meses (VOOG et al. 2019).

A despeito de fatores prognósticos bem estabelecidos para a neoplasia renal, pacientes cujos tumores têm características semelhantes podem apresentar desfechos distintos. Fatores biológicos e genéticos podem explicar esta diferença (SAKAI et al. 2009). O estudo de biomarcadores pode ser importante neste cenário para prever desfechos clínicos e indicar as melhores terapias sistêmicas para cada paciente

Dentre as alterações genéticas presentes na gênese do carcinoma de células renais subtipo células claras, a deleção do *VHL* foi a primeira ser estudada. É um gene supressor de tumor localizado no braço curto do cromossomo 3, e sua perda de expressão provoca uma elevação dos fatores induzidos por hipóxia ($HIF-1\alpha$ e $HIF-2\alpha$) os quais regulam processos celulares envolvidos em progressão tumoral e metástases, como apoptose, proliferação celular e angiogênese, principalmente através do aumento de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (SHEN e KAEILIN 2013). É causa da doença de von Hippel-Lindau, bem como está presente em grande maioria dos tumores renais esporádicos. A terapia alvo molecular (inibidores de tirosina kinase) é baseada nestes estudos (JOOSTEN et al. 2018).

Diferentemente do gene *VHL*, os demais genes mais frequentemente mutados no ccRCC, *PBRM1*, *BAP1* e *SETD2*, estão envolvidos na remodelação da cromatina e metilação de histonas (DALGLIESH et al. 2010; VARELA et al. 2011). HSIEH et al. (2017) publicaram em 2017 uma análise de 341 genes em 220 amostras tumorais de pacientes com ccRCC metastático que foram submetidos a terapia anti-angiogênica, e foi observado que 73% dos tumores tinham até 10 mutações genéticas sendo as mais frequentes *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, *BAP1*, *KDM5C* e *PTEN*, estes últimos, genes envolvidos na biologia da cromatina e das histonas. Observou-se que os pacientes com mutação de *BAP1* tratados com everolimus seguido de sunitinib apresentaram menor sobrevida global (9,8 meses) em relação aos pacientes portadores da mutação de *PBRM1* (43,5 meses) ou do tumor tipo selvagem (18,1 meses). Quando a terapia foi invertida (sunitinib seguido por everolimus), a sobrevida foi semelhante entre os grupos (*BAP1*, 29,9 meses; *PBRM1*, 33,2 meses e selvagem, 33,1 meses). Este estudo infere que a análise de biomarcadores pode influenciar na escolha da terapia anti-angiogênica, almejando maior sobrevida. DA COSTA et al. (2012) analisaram as expressões imuno-histoquímica e por RT-PCR dos genes *BAP1* e *PBRM1* em 604 amostras de tumores localizados, e observaram que a perda de expressão destes marcadores correlacionou-se com piores sobrevidas global e câncer específica.

1.2 OS MARCADORES

1.2.1 Ezrina e Moesina

Ezrina e moesina são proteínas da família ERM (Ezrina-Radixina-Moesina), amplamente conhecidas por seu papel de ligação do citoesqueleto de actina à membrana da célula (CLUCAS e VALDERRAMA 2015). Por este motivo, são proteínas envolvidas em diversos processos celulares tais como adesão, mobilidade, polaridade e sobrevivência celular, características que podem estimular invasão local e metástases em tecidos neoplásicos.

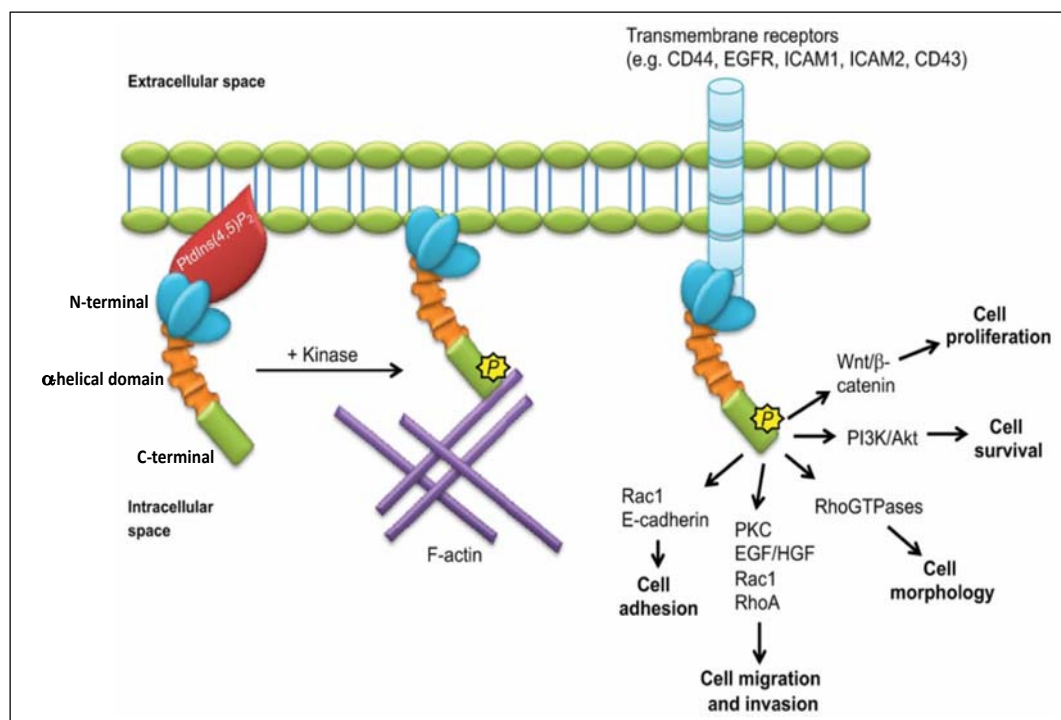
Ezrina é uma proteína codificada pelo gene *EZN* localizado no braço longo do cromossomo 6, tem aproximadamente 80 kDa e foi descoberta primeiramente em células que formam microvilosidades intestinais na borda em escova e também nas microvilosidades placentárias. Foram realizados estudos associando a hiperexpressão de ezrina com neoplasias do trato gastrointestinal (estômago, pâncreas, cólon) e também de mama (TANG et al. 2016).

Moesina é uma proteína codificada pelo gene *MSN* localizado no cromossomo X, também tem aproximadamente 80 kDa foi primeiramente estudada como uma proteína ligante da heparina (BRETSCHER et al. 2002), difere das outras proteínas do complexo ERM principalmente por não apresentar um trecho de poliprolina na região do domínio α helicoidal (TSUKITA 1997).

Radixina foi isolada, em estudo prévios, em hepatócitos na junção célula-célula, porém parece estar primariamente concentrada nas células das

microvilosidades dos canalículos biliares, sendo pouco expressa em outros tecidos

As proteínas do complexo ERM exibem duas extremidades: carboxi-terminal e amino-terminal, ligadas por um centro α helicoidal. O domínio carboxi-terminal se liga ao filamento de actina com alta afinidade *in vitro* e o domínio amino-terminal se liga à membrana celular através da extremidade citoplasmática de proteínas transmembrana, como CD44 e CD43 (TSUKITA 1997). Desta forma podem gerar ou estabilizar protrusões de superfície celular em resposta a sinalização extracelular (CHEN et al. 2015). Ezrina e moesina podem existir dentro da célula sobre a forma ativada ou inativada, sendo reguladas por fosforilação e pela ligação com fosfatidilinositol 4,5-bifosfato [Ptdins(4,5)P₂], como ilustrado na figura abaixo:



Fonte: CLUCAS e VALDERRAMA (2015)

Figura 1 - Mecanismo de ação das proteínas da família ERM promovendo a ligação dos filamentos de actina à membrana plasmática e seu papel na sinalização celular

As proteínas do complexo ERM juntamente com os receptores na membrana plasmática são também importantes para sinalização celular, em particular na associação com CD44, receptor do fator de crescimento epidermóide (EGFR) e receptor do fator de crescimento de hepatócitos (HGFR) cujos papéis no processo de migração celular estão associado à invasão de células neoplásicas e metástases (CLUCAS e VALDERRAMA 2015).

Estudos que analisaram as proteínas quinases responsáveis pela ativação do complexo ERM, avaliaram que elas também participam, *in vitro*, da regulação de ezrina e moesina, como por exemplo, Rho-quinase (ROCK)

(HÉBERT et al. 2008) e proteína quinase Ca (PKCa) (NG 2001). Entretanto os estudos mais relevantes *in vivo*, avaliam que tais quinases não são essenciais para o evento da fosforilação e sugerem que mais importante do que a concentração celular de uma quinase específica é sua expressão têmporo-espacial em diferentes células, órgãos e tecidos (CLUCAS e VALDERRAMA 2015).

Ezrina e moesina também têm sido analisadas como proteínas de suporte (*scaffold molecules*) na ativação da superfamília Ras de pequenas GTPases, incluindo os subgrupos Ras e Rho, por interação dos fatores trocadores de guanina (GEFs) e inibidores dissociados de guanina (GDIs) (SPERKA et al. 2011). É de conhecimento que mutações oncogênicas no Ras, bem como em receptores tirosina-quinase EGFR e HGFR, podem incorrer na gênese tumoral (BONACCORSI et al. 2004). Alguns estudos têm relacionado alta expressão de ezrina com prognóstico ruim em diversas neoplasias com sítios primários em mama, próstata e pulmão. A mudança da expressão de proteínas do complexo ERM pode interferir na sua ligação com receptores de membrana e levar a alterações nas vias de sinalização celular, o que pode levar a tumorigênese.

A expressão de ezrina e moesina foi estudada em tecidos tumorais específicos, principalmente carcinomas espino-celulares (CEC) de orofaringe.

Em 2012, SCHLECHT et al. compararam a expressão de ezrina e moesina em 131 casos de CEC de orofaringe, através de Tissue microarray (TMA) com seguimento de 52 meses. Os autores demonstraram que o aumento de expressão citoplasmática de ambas as proteínas apresentou

impacto prognóstico negativo nas taxas de sobrevida livre de doença e presença de metástases. Para alta expressão de ezrina, observou-se menor sobrevida livre de doença [HR=4,1 (p=0,013)] e maior presença de metástases [HR=2,0 (p=0,176)]. Também na análise de moesina, a positividade na expressão levou a uma menor sobrevida livre de doença [HR=2,0 (p=0,310)] e cursou com maior presença de metástases [HR=2,2 (p=0,138)].

Um estudo de 2014 em CEC de laringe avaliou a presença de ezrina e moesina a partir de ensaios imuno-histoquímicos e de *real time polymerase chain reaction* (qRT-PCR) comparando os tecidos do tumor primário, de metástases linfonodais e de tecido normal do próprio paciente. Observaram maior expressão das referidas proteínas em ordem decrescente: em linfonodos metastáticos, no tumor primário e em tecido normal. Sendo esta expressão fator prognóstico para pior estadio clínico e presença de metástases, apresentando também, como esperado, piores resultados em sobrevida global, principalmente nos pacientes cujos tecidos neoplásicos apresentavam expressão intensa de ezrina e moesina (WANG et al. 2014).

Em neoplasia renal, como marcador diagnóstico, a ezrina pode auxiliar na diferenciação entre os diversos subtipos de carcinoma de células renais. Tuna et al em 2009, identificaram que a expressão de ezrina foi positiva principalmente nos subtipos células claras e papilífero, enquanto no subtipo cromóforo foi negativa (TUNA et al. 2009).

Um estudo publicado em 2015 avaliou a expressão imuno-histoquímica de ezrina, anidrase carbônica IX e neuropilina-2 em tecidos de nefrectomias

de pacientes com câncer renal metastático, de histologias variadas e risco intermediário, que falharam ao tratamento sistêmico primário com interferon alfa e receberam posteriormente algum inibidor de tirosina quinase em segunda linha (sunitinib, sorafenib, pazopanib). Os resultados mostraram que dentre os tumores dos 45 pacientes investigados, os que apresentaram hiperexpressão de ezrina cursaram com menor sobrevida livre de progressão (sobrevida média 3 meses vs 7 meses, $p=0,01$) e menor sobrevida global (sobrevida média 13 meses vs 26 meses, $p=0,009$) (CETIN et al. 2015).

YU et al. (2015) publicaram, também em 2015, estudo sobre a avaliação da expressão de micro-RNA (miR-96) e de ezrina, utilizando-se de qRT-PCR e de Western-blotting, respectivamente, para quantificação dos mesmos em uma amostra de 63 pacientes com carcinoma de células renais submetidos à nefrectomia. Observou-se maior expressão de ezrina nos pacientes metastáticos em comparação aos pacientes em remissão da doença ($p<0,05$).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as expressões imuno-histoquímicas das proteínas ezrina e moesina no tumor primário de pacientes portadores de CCR do tipo células claras submetidos a nefrectomia e associá-las a fatores prognósticos para sobrevida.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Analisar o impacto das suas expressões nas taxas de sobrevida global (SG) e sobrevida câncer-específica (SCE).

3 ARTIGO

Title: Immunohistochemical negative expression of ezrin predicts poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma

Authors:

Marcos Vinicius O. Ferrari, MD 1

Walter Henriques da Costa, MD, PhD 1

Mariana Andozia Morini Matushita, MD 2

Rafael Ribeiro Meduna, MD 1

Eder Silveira Brazao Jr, MD 1

Stephania Martins Bezerra, MD 2

Isabela Werneck da Cunha, MD, PhD 3,4

Stenio de Cassio Zequi, MD, PhD 1,3

1. Urology Division, A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil.
2. Pathology Department, A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil
3. Researches of INCiTO-INOTE Institute
4. Pathology Department, Rede D'or, Brazil

Corresponding author and reprints: Marcos Vinícius O. Ferrari

E-mail: marcos_mvof@hotmail.com, tel/fax: 0055112189-5000

Postal address: Fundação Antônio Prudente / A.C.Camargo Cancer Center

Rua Prof Antônio Prudente, 211, Liberdade, São Paulo – SP / Brazil - ZIP

CODE: 01509-010

Authors' e-mails:

Marcos Vinicius O. Ferrari (marcos_mvof@hotmail.com)

Walter Henriques da Costa (waltercosta@hotmail.com)

Mariana Andozia Morini Matushita (maremorini@hotmail.com)

Rafael Ribeiro Meduna (rafaelmeduna@yahoo.com.br)

Eder Silveira Brazao Jr (ederbrazaojr@gmail.com)

Stephania Martins Bezerra (stephania.bezerra@accamargo.org.br)

Isabela Werneck da Cunha (iwerneck0210@gmail.com)

Stenio de Cassio Zequi (steniozequi@gmail.com)

4 CONCLUSÕES

- 1 A expressão de ezrina e moesina foi positiva na grande maioria dos tumores renais analisados neste estudo, sendo 81,7% de positividade para ezrina e 97,2% para moesina. Entretanto, a perda de expressão imuno-histoquímica de ezrina e moesina no ccRCC foi associada a fatores clínicos e patológicos de pior prognóstico.
- 2 Ausência de expressão imuno-histoquímica de ezrina no tumor representou um risco 89% maior de morte por ccRCC em comparação aos pacientes cujas neoplasias expressaram o marcador.
- 3 Devido aos dados contrastantes da literatura em relação aos nossos resultados, mais estudos relacionados são importantes para provar o real valor prognóstico das proteínas do complexo ERM no contexto da neoplasia renal.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersson G, Wennersten C, Gaber A, et al. Reduced expression of ezrin in urothelial bladder cancer signifies more advanced tumours and an impaired survival: validity study of two independent patient cohorts. **JAMA Oncol** 2014; 5:164-70.

arumugam p, partelli s, coleman sj, et al. ezrin expression is an independent prognostic factor in gastro-intestinal cancers. **J Gastrointest Surg** 2013; 17:2082-91.

Bartova M, Hlavaty J, Tan Y, et al. Expression of ezrin and moesin in primary breast carcinoma and matched lymph node metastases. **Clin Exp Metastasis** 2017; 34:333-44.

Bex A, Mulders P, Jewett M, et al. Comparison of Immediate vs Deferred Cytoreductive Nephrectomy in Patients With Synchronous Metastatic Renal Cell Carcinoma Receiving Sunitinib: The SURTIME Randomized Clinical Trial. **JAMA Oncol** 2019; 5:164-70.

Bonaccorsi L, Carloni V, Muratori M, et al. EGF receptor(EGFR) signaling promoting invasion is disrupted in androgen-sensitive prostate cancer cells by an interaction between EGFR and androgen receptor(AR). **Int J Cancer** 2004; 112:78-86.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin** 2018; 68:394-424.

Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2002; 3:586-99.

Camp RL, Neumeister V, Rimm DL. A decade of tissue microarrays: progress in the discovery and validation of cancer biomarkers. **J Clin Oncol** 2008; 26:5630-7.

Capitanio U, Montorsi F. Renal cancer. **Lancet** 2016; 387:894-906.

Cetin B, Gonul II, Buyukberber S, et al. The impact of immunohistochemical staining with ezrin-carbonic anhydrase IX and neuropilin-2 on prognosis in patients with metastatic renal cell cancer receiving tyrosine kinase inhibitors. **Tumor Biol** 2015; 36:8471-8.

Chapin BF, Delacroix SE, Wood CG. The role of lymph node dissection in renal cell carcinoma. **Int J Clin Oncol** 2011; 16:186-94.

Chen X, Khajeh JA, Ju JH, et al. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate clusters the cell adhesion molecule CD44 and assembles a specific CD44-Ezrin heterocomplex, as revealed by small angle neutron scattering. **J Biol Chem** 2015; 290:6639-52.

Clucas J, Valderrama F. ERM proteins in cancer progression. **J Cell Sci** 2015; 128:1253-3.

Costa WH DA, Rocha RM, Cunha IW DA, Fonseca FP DA, Guimaraes GC, Zequi S DE C. CD133 immunohistochemical expression predicts progression and cancer-related death in renal cell carcinoma. **World J Urol** 2012; 30:553-8.

Curto M, McClatchey AI. Ezrin...a metastatic detERMinant? **Cancer Cell** 2004; 5:113-4.

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

Gautreau A, Pouillet P, Louvard D, Arpin M. Ezrin, a plasma membrane-microfilament linker, signals cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96:7300-5.

Gautreau A, Louvard D, Arpin M. ERM proteins and NF2 tumor suppressor: the Yin and Yang of cortical actin organization and cell growth signaling. **Curr Opin Cell Biol** 2002; 14:104-9.

Haas NB, Manola J, Uzzo RG, et al. Adjuvant sunitinib or sorafenib for high-risk, non-metastatic renal-cell carcinoma (ECOG-ACRIN E2805): a double-blind, placebo-controlled, randomised, phase 3 trial. **Lancet** 2016; 387:2008-16.

Hébert M, Potin S, Sebbagh M, Bertoglio J, Bréard J, Hamelin J. Rho-ROCK-Dependent ezrin-radixin-moesin phosphorylation regulates fas-mediated apoptosis in Jurkat cells. **J Immunol** 2008; 181:5963-73.

Hiscox S, Jiang WG. Ezrin regulates cell-cell and cell-matrix adhesion, a possible role with E-cadherin/beta-catenin. **J Cell Sci** 1999; 112:3081-90.

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** 2017; 71:405-14.

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

Joniau S, Vander Eeckt K, Srirangam SJ, Van Poppel H. Outcome of nephron-sparing surgery for T1b renal cell carcinoma. **BJU Int** 2009; 103:1344-8.

Joosten SC, Smits KM, Aarts MJ, et al. Epigenetics in renal cell cancer: mechanisms and clinical applications. **Nat Rev Urol** 2018; 15:430-51.

Ko JJ, Xie W, Kroeger N, et al. The International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium model as a prognostic tool in patients with metastatic renal cell carcinoma previously treated with first-line targeted therapy: a population-based study. **Lancet Oncol** 2015; 16:293-300.

Kong J, Li Y, Liu S, et al. High expression of ezrin predicts poor prognosis in uterine cervical cancer. **BMC Cancer** 2013; 13:520.

Lane BR, Babineau D, Kattan MW, et al. A preoperative prognostic nomogram for solid enhancing renal tumors 7 cm or less amenable to partial nephrectomy. **J Urol** 2007; 178:429-34.

Li J, Wei K, Yu H, Jin D, Wang G, Yu B. Prognostic Value of Ezrin in Various Cancers: A Systematic Review and Updated Meta-analysis. **Sci Rep** 2015; 5:17903.

Liang F, Wang Y, Shi L, Zhang J. Association of Ezrin expression with the progression and prognosis of gastrointestinal cancer: a meta-analysis. **Oncotarget** 2017; 8:93186-95.

Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, et al. EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma: 2014 update. **Eur Urol** 2015; 67:913-24.

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

Méjean A, Ravaud A, Thezenas S, et al. Sunitinib alone or after nephrectomy in metastatic renal-cell carcinoma. **N Engl J Med** 2018; 379:417-27.

Moilanen J, Lassus H, Leminen A, Vaheri A, Bützow R, Carpén O. Ezrin immunoreactivity in relation to survival in serous ovarian carcinoma patients. **Gynecol Oncol** 2003; 90:273-81.

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.

Ng T. Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. **EMBO J** 2001; 20:2723-41.

Niggli V, Rossy J. Ezrin/radixin/moesin: Versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton. **Int J Biochem Cell Biol** 2008; 40:344-9.

O'Malley RL, Godoy G, Kanofsky JA, Taneja SS. The necessity of adrenalectomy at the time of radical nephrectomy: a systematic review. **J Urol** 2009; 181:2009-17.

Palou J, Algaba F, Vera I, Rodriguez O, Villavicencio H, Sanchez-Carbayo M. Protein expression patterns of ezrin are predictors of progression in T1G3 bladder tumours treated with nonmaintenance Bacillus Calmette-Guérin. **Eur. Urol.** 2009; 56:829–836.

Paner GP, Stadler WM, Hansel DE, Montironi R, Lin DW, Amin MB. Updates in the Eighth Edition of the Tumor-Node-Metastasis Staging Classification for Urologic Cancers. **Eur Urol** 2018; 73:560-9.

Pierorazio PM, Hyams ES, Mullins JK, Allaf ME. Active surveillance for small renal masses. **Rev Urol** 2012; 14:13-9.

Port FK, Ragheb NE, Schwartz AG, Hawthorne VM. Neoplasms in dialysis patients: a population-based study. **Am J Kidney Dis** 1989; 14:119-23.

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.

Ravaud A, Motzer RJ, Pandha HS, et al. Adjuvant sunitinib in high-risk renal-cell carcinoma after nephrectomy. **N Engl J Med** 2016; 375:2246-54.

Remzi M, Özsoy M, Klingler H-C, et al. Are small renal tumors harmless? analysis of histopathological features according to tumors 4 Cm or Less in Diameter. **J Urol** 2006; 176:896-9.

Russo P, Huang W. The medical and oncological rationale for partial nephrectomy for the treatment of T1 renal cortical tumors. **Urol Clin North Am** 2008; 35:635-43.

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

Schlecht NF, Brandwein-Gensler M, Smith R V., et al. Cytoplasmic Ezrin and Moesin correlate with poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck Pathol.** 2012; 6:232-43.

Shen C, Kaelin WG. The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. **Semin Cancer Biol** 2013; 23:18-25.

Sperka T, Geißler KJ, Merkel U, et al. Activation of Ras requires the ERM-dependent link of actin to the plasma membrane. **PLoS One** 2011; 6:e27511.

Tang R, Li FX, Shao WF, Wen QS, Yu XR, Xiong JB. Protein-protein interaction between ezrin and p65 in human breast cancer cells. **Genet Mol Res** 2016; 15:gmr8334.

Thompson RH, Siddiqui S, Lohse CM, Leibovich BC, Russo P, Blute ML. Partial versus radical nephrectomy for 4 to 7 cm renal cortical tumors. **J Urol** 2009; 182:2601-6.

Tsukita S. ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction. **Curr Opin Cell Biol** 1997; 9:70-5.

Tuna B, Yorukoglu K, Mazzucchelli R, et al. Ezrin immunoreactivity in renal cell carcinomas. **Anal Quant Cytol Histol** 2009; 31:340-4.

Uzzo RG, Novick AC. Nephron sparing surgery for renal tumors: indications, techniques and outcomes. **J Urol** 2001; 166:6-18.

Van Poppel H, Becker F, Cadeddu JA, et al. Treatment of localised renal cell carcinoma. **Eur Urol** 2011; 60:662-72.

Varela I, Tarpey P, Raine K, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. **Nature** 2011; 469:539-42.

Voog E, Campillo-Gimenez B, Elkouri C, et al. Long survival of patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. results of real life study of 344 patients. **Int J cancer** 2019 Jul 18. [Epub ahead of print]

Wang X, Liu M, Zhao CY. Expression of ezrin and moesin related to invasion, Metastasis and prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma. **Genet Mol Res** 2014; 13:8002-13.

Yu N, Fu S, Liu Y, et al. miR-96 suppresses renal cell carcinoma invasion via downregulation of Ezrin expression. **J Exp Clin Cancer Res** 2015; 34:107.

Zhang T, Zhu J, George DJ, Nixon AB. Metastatic clear cell renal cell carcinoma: Circulating biomarkers to guide antiangiogenic and immune therapies. **Urol Oncol Semin Orig Investig** 2016; 34:510-8.

Anexo 1 - Revisão de dados pós publicação

Após publicação do artigo no periódico *Urologyc Oncology: Seminars and Original Investigations*, durante a revisão do mesmo para formatação nesta dissertação, identificamos uma falha no banco de dados do estudo em relação aos grupos de estadiamento clínico agrupado (AJCC/UICC 8ª edição 2016). Por erro de digitação, 31 pacientes de estadio III-IV foram alocados em I-II, além de 1 omissos. Realizada esta correção no banco de dados, refizemos a tabela de associação para ambos marcadores, mostrada abaixo:

	Ezrina		p
Estadio clínico	Expressão negativa n(%)	Expressão positiva n(%)	
I e II	59 (57,3)	343 (73,4)	
III e IV	44 (42,7)	124 (26,6)	0,001

	Moesina		p
Estadio clínico	Expressão negativa n(%)	Expressão positiva n(%)	
I e II	7 (43,8)	390 (72)	
III e IV	9 (56,3)	152 (28)	0,014

Como evidenciado acima, após a correção, a associação entre cada marcador e o estadio clínico agrupado se manteve com significância estatística para ambos. A análise univariada mostrou que o estadio clínico também manteve forte correlação com a sobrevida câncer específica e global, permanecendo o valor de $p < 0,001$ para ambas. Dado que a alteração

poderia modificar também o resultado da análise de regressão de Cox haja vista que era variável participante da multivariada, optamos por refazer esta análise (próxima página). De acordo com a nova tabela de análise multivariada, ezrina manteve-se como preditor independente de sobrevida câncer específica, porém com *hazard ratio* menor, de 1,73. Portanto, também há uma correção no capítulo 5, item 2, referente às conclusões, onde podemos inferir que a ausência de expressão imuno-histoquímica de ezrina no tumor representou um risco 73% maior de morte por ccRCC em comparação aos pacientes cujas neoplasias expressaram o marcador.

Variável	SCE			SG				
	Univariada		Multivariada	Univariada		Multivariada		
	p	HR	95% IC	p	p	HR	95% IC	p
Estadio clínico (III/IV vs I/II)	<0,001	3,053	1,517 – 6,144	0,002	<0.001	2,130	1,139 – 3,982	0,018
ISUP (alto grau vs baixo grau)	<0,001	1,638	0,958 – 2,801	0,072	<0.001	1,933	1,172 – 3,188	0,010
Metástase sincrônica	<0,001	5,452	2,993 – 9,931	<0,001	<0.001	4,878	2,757 – 8,630	<0,001
Invasão microvascular	<0,001	1,526	0,867 – 2,688	0,143	<0.001	1,574	0,922 – 2,687	0,096
Invasão microlinfática	<0,001	1,465	0,709 – 3,025	0,302	<0.001	1,698	0,873 – 3,302	0,119
Ezrina (negativa vs positiva)	<0,001	1,730	1,025 – 2,921	0,04	0.001	1,529	0,934 – 2,502	0,091
Moesina (negativa vs positiva)	0,065	1,195	0,438 – 3,258	0,728	0.142	1,078	0,402 – 2,890	0,881

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

0 – Assintomático.

1 – Sintomático, mas completamente ambulatorial.

2 – Sintomático, permanece no leito <50% do dia.

3 – Sintomático, permanece > 50% do dia no leito, mas não restrito ao leito.

4 – Restrito ao leito.

5 – Morto.

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

Anexo 3 - Classificação TNM de 2002 da “American Joint Committee on Cancer”

Tx	Tumor primário não pode ser avaliado.
T0	Ausência de evidência de tumor primário.
T1	Tumor ≤ 7 cm no maior diâmetro, limitado ao rim.
T1a	Tumor ≤ 4 cm no maior diâmetro, limitado ao rim.
T1b	Tumor > 4 cm e ≤ 7 cm no maior diâmetro, limitado ao rim.
T2	Tumor > 7 cm no maior diâmetro, limitado ao rim.
T3	Tumor com extensão até glândula adrenal, grandes vasos ou tecido perinefrético e não ultrapassa fáscia de Gerota.
T3a	Tumor invade glândula adrenal, seio e/ou gordura perinéfrica, mas não ultrapassa fáscia de Gerota.
T3b	Tumor com extensão até veia renal ou veia cava infradiafragmática.
T3c	Tumor com extensão até veia cava supra-diafragmática ou invasão da parede da veia cava.
T4	Tumor com invasão além da fáscia de Gerota.
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0	Ausência de metástases linfonodais.
N1	Metástase em até um linfonodo regional.
N2	Metástase em mais de um linfonodo regional.
MX	Metástases à distância não podem ser avaliadas.
M0	Ausência de metástases a distância.
M1	Presença de metástases a distância.

Fonte: Novara G, Ficarra V, Antonelli A, et al. Validation of the 2009 TNM Version in a Large Multi-Institutional Cohort of Patients Treated for Renal Cell Carcinoma: Are Further Improvements Needed? **European Urology** 2010; 58:588–595.

Anexo 4 - Estadiamento clínico de 2002 da “American Joint Committee on Cancer”

Estadio clínico	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1ouT2	N1	M0
	T3	N0ouN1	M0
IV	T4	Qualquer N	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1
	Qualquer T	N2	M0

Fonte: Novara G, Ficarra V, Antonelli A, et al. Validation of the 2009 TNM Version in a Large Multi-Institutional Cohort of Patients Treated for Renal Cell Carcinoma: Are Further Improvements Needed? **European Urology** 2010; 58:588–595.

Anexo 5 - Classificação TNM de 2009 da “American Joint Committee on Cancer”

Tx	Tumor primário não pode ser avaliado.
T0	Ausência de evidência de tumor primário.
T1	Tumor $\leq$ 7cm no maior diâmetro, limitado ao rim.
T1a	Tumor $\leq$ 4cm no maior diâmetro, limitado ao rim.
T1b	Tumor $>$ 4cm e $\leq$ 7cm no maior diâmetro, limitado ao rim.
T2	Tumor $>$ 7cm no maior diâmetro, limitado ao rim.
T2a	Tumor $>$ 7cm e $\leq$ 10cm no maior diâmetro, limitado ao rim.
T2b	Tumor $>$ 7cm no maior diâmetro, limitado ao rim.
T3	Tumor com extensão até grandes vasos ou tecido perinefrético e não ultrapassa fáscia de Gerota.
T3a	Tumor invade seio e/ou gordura perinéfretica, mas não ultrapassa fáscia de Gerota e/ou com extensão até veia renal ou seus ramos segmentares.
T3b	Tumor com extensão até veia cava infradiafragmática
T3c	Tumor com extensão até veia cava supra-diafragmática
T4	Tumor com invasão além da fáscia de Gerota (inclusive invasão contígua da glândula adrenal ipsilateral).
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0	Ausência de metástases linfonodais.
N1	Presença de metástase em linfonodos regionais.
M0	Ausência de metástases a distância.
M1	Presença de metástases a distância.

Fonte: Novara G, Ficarra V, Antonelli A, et al. Validation of the 2009 TNM Version in a Large Multi-Institutional Cohort of Patients Treated for Renal Cell Carcinoma: Are Further Improvements Needed? European Urology 2010; 58:588–595.

Anexo 6 - Estadiamento clínico de 2009 da “American Joint Committee on Cancer”

Estadio clínico	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1ouT2	N1	M0
	T3	N0 ou N1	M0
IV	T4	Qualquer N	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Novara G, Ficarra V, Antonelli A, et al. Validation of the 2009 TNM Version in a Large Multi-Institutional Cohort of Patients Treated for Renal Cell Carcinoma: Are Further Improvements Needed? **European Urology** 2010; 58:588–595.

Anexo 7 - Carta de aceitação do Artigo (19.09.2019)

Beginning in 2015, all Original Investigations will be published online-only. Abstracts of Original Investigations will be included in print issues.

Ms. Ref. No.: URO-D-19-00523R1

Title: Immunohistochemical negative expression of ezrin predicts poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations

Dear Mr Odorissio Ferrari,

On behalf of the editors, I am pleased to inform you that your paper entitled "Immunohistochemical negative expression of ezrin predicts poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma" has been accepted for publication in Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.

Please make sure you have completed and returned the "Conflict of Interest" form downloadable from this site. We are privileged to publish your work. Thank you for submitting it for our review.

Sincerely yours,

Michael J. Droller, M.D.

Editor-in-Chief

Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations

Anexo 8 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



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

COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **05/12/2017**, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de **24/10/2017**, aprovaram a realização do projeto nº **2448/17** intitulado: **"ESTUDO DO VALOR PROGNÓSTICO E DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE EZRINA E MOESINA EM CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIAS DO TIPO CÉLULAS CLARAS."**

Pesquisador responsável: **Walter Henriques da Costa**

Aluno: **Marcos Vinicius Odorissio Ferrari (Mestrado)**

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

São Paulo, 08 de dezembro de 2017.

Atenciosamente,

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

Anexo 9 - Classificação de risco em CCR metastático do IMDC (KO et al. 2015)

Anemia Hemoglobina < limite inferior
Neutrófilos > limite superior
Cálcio corrigido > limite superior
Karnofsky performance-status < 80%
Tempo diagnóstico-metástase < 1 ano
Plaquetas > limite superior

Anexo 10 – Critérios de inclusão e exclusão de pacientes

1. Critérios de inclusão:

- a. CCR subtipo células claras comprovado histologicamente;
- b. Tratamento cirúrgico do tumor primário

2. Critérios de exclusão:

- a. Pacientes tratados em outros serviços;
- b. Prontuários com dados incompletos ou faltantes
- c. Material arquivado em parafina em más condições para a elaboração de novos cortes para imuno-histoquímica

Critérios de positividade para expressão IHQ dos marcadores

Quaisquer marcações positivas na avaliação dos marcadores ezrina e moesina nas lâminas de IHQ foram consideradas como “expressão positiva”. Inclusive marcações consideradas de fraca intensidade, bem como em percentuais baixos como até 1% de células marcadas. Logo, as amostras consideradas como “expressão negativa” não apresentaram nenhuma expressão dos respectivos marcadores.

Apêndice 1 - Ficha de levantamento de dados

Nome: _____

Registro: _____

Lâmina: _____

Data de admissão: _____

Idade (anos): _____

Raça: (1) Branco (2) Não branco

Sexo: (1) Masculino (2) Feminino

Tabagismo: (1) Fumante (2) Não fumante

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

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

Tempo de Evolução (meses): _____

Tumor incidental: (0) Sim (1) Não

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

Hemoglobina: _____ Hematócrito: _____

Cirurgia: (1) Radical (2) Parcial

Incisão: (1) Abdominal (2) Lombotomia

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

Margem macroscópica

Tempo de Cirurgia: _____

Data da Cirurgia: _____

Transfusão: (0) Não (1) Sim Volume de transfusão: _____

Complicações Precoces: (0) Não (1) Insuficiência renal aguda (2) Íleo paralítico (3)

Infecção (4) Cardiovascular (5) Tromboembolismo (6) Fistula urinaria (7)

Hemorragia (8) Outras

Internação (dias): _____

Complicações Tardias: (0) Não (1) Insuficiência renal aguda (2) Suboclusão
intestinal (3) Parede abdominal (4) Hipertensão arterial sistêmica (5) Outras

Estadio T: (1) T1a (2) T1b (3) T2a (4) T2b (5) T3a (6) T3b (7) T3c (8) T4

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

No de Linfonodos: _____ No de Linfonodos +: _____

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

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

Tipo Histológico: (1) Células claras (2) Papilífero (3) Cromóforo (4) TTE3 Gene (5)

Ductos coletores (6) Inclassificável (7) Outros

Diâmetro tumoral (cm): _____

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

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

Multifocal: (0) Não (1) Sim

Topografia: (1) Polo superior (2) Terço médio (3) Polo inferior (4) Mais de um polo

Invasão vascular: (0) Não (1) Sim

Invasão linfática: (0) Não (1) Sim

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

Invasão de veia cava: (0) Não (1) Sim

Invasão de pelve e/ou ureter: (0) Não (1) Sim

Invasão de gordura: (0) Não (1) Sim

Necrose tumoral: (0) Não (1) Sim

Invasão de Adrenal: (0) Não (1) Sim

Falha: (0) Não (1) Sim Data da falha: _____

Falha: (0) Não (1) Local (2) Pulmão (3) Osso (4) Fígado (5) SNC (6) Rim
contralateral (7) Outro

Tratamento: (0) Não (1) Cirurgia (2) Radioterapia (3) Cirurgia + RT (4) Imunoterapia
(5) Imunoterapia + quimioterapia (6) Outro (7) Quimioterapia (8) Inibidor tirosina
quinase

Data da última consulta: _____

Status: (1) Vivo sem doença (2) Vivo com doença (3) Morte outras causas (5) Morte
por câncer (6) Perda de vista

Óbito: (1) Sim (2) Não

Sobrevida global (meses): _____

Sobrevida livre de doença (meses): _____

Seguimento atualizado (meses): _____