

**FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE
A.C.CAMARGO CANCER CENTER**

Aline Moraes Coletti Shirazi

**Análise de expressão do Ki-67 no tecido metastático e a avaliação
de seu papel prognóstico em carcinoma renal de células claras
metastático**

Dissertação de Mestrado Acadêmico,
apresentada à Fundação Antônio Prudente
como requisito para obtenção do título de Mestre
em Ciências da Saúde. Área de concentração:
Oncologia.

Orientador : Walter Henriques da Costa

Coorientador : José Augusto Rinck

**São Paulo
2025**

Shirazi, Aline .

Análise de expressão do Ki-67 no tecido metastático e a avaliação de seu papel prognóstico em carcinoma renal de células claras metastático . / Aline Shirazi. São Paulo, 2024.

24f.

Dissertação de Mestrado - Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Walter Henriques da Costa.

1. Ki67, 2. carcinoma renal de células claras metastático , 3. biomarcador

CDU 616

Nome: Aline Moraes Coletti Shirazi

Título: Análise de expressão do Ki-67 no tecido metastático e a avaliação de seu papel prognóstico em carcinoma renal de células claras metastático

Aprovado em: 25/02/2025

Banca Examinadora

Orientador: Walter Henriques da Costa

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Aldo Lourenço Abbade Dettino

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Stênio de Cássio Zequi

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Janayna Dias Lima

Instituição: Astellas Farma Brasil

RESUMO

Shirazi AMC. **Análise de expressão do Ki-67 no tecido metastático e a avaliação de seu papel prognóstico em carcinoma renal de células claras metastático.** [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2025.

O Carcinoma de Células Renais (CCR), abrange inúmeros subtipos histológicos e moleculares (SAMBIT K et al. 2022), dos quais o carcinoma de células renais claras (CCRc) ou em inglês *clear-cell renal cell carcinoma (ccRCC)* é mais comum e responsável pela maioria das mortes relacionadas ao câncer. Sabemos que os avanços em biologia molecular melhoraram a compreensão do CCRc e levaram a uma evolução significativa do cenário de tratamento da doença metastática (CCRm). No entanto, esses tratamentos apresentam impacto variável na inibição do tumor e na sobrevida dos pacientes, indicando a necessidade de novas opções para melhorar os desfechos clínicos (LI et al. 2023). O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de Ki-67, um marcador confiável de proliferação celular. A hipótese é que sua análise pode agregar uma variável adicional na avaliação do comportamento biológico do CCR metastático. Para isso, realizamos uma análise retrospectiva utilizando o banco de prontuários de pacientes consecutivos com diagnóstico de CCRm tratados no AC Camargo Câncer Center no período de janeiro de 2007 a junho de 2021. Os pacientes portadores de CCRm desse período tiveram o material anátomo-patológico do tumor metastático (biópsia ou metastasectomia) incluído em uma lâmina de *tissue microarray* (TMA) e analisado por imunohistoquímica pelo Departamento de Anatomia Patológica. A pesquisadora Aline Shirazi determinou a porcentagem de células positivas para Ki-67 e o número total de células cancerígenas invasivas. Avaliamos a estatística com o objetivo de determinar o padrão de expressão imuno-histoquímico de Ki-67 em tecido tumoral metastático de carcinoma de células claras renais e seu eventual papel prognóstico na evolução da doença. A curva de Kaplan-Meier nos mostrou que a sobrevida global (SG) mediana para Ki-67 $\leq 15\%$ foi de aproximadamente 96 meses, enquanto a sobrevida mediana para Ki-67 $> 15\%$ não foi alcançada no período de acompanhamento, sem significância estatística ($p=0,46$). Quanto à sobrevida livre de progressão (SLP), a mediana para pacientes com Ki-67 $\leq 3\%$ foi de

aproximadamente 30 meses. Para o grupo com Ki-67 > 3%, a curva de sobrevida livre de progressão foi de 18 meses, mas esse desfecho também não apresentou significância estatística ($p = 0,16$). Enquanto os resultados deste estudo indicam uma tendência para uma pior sobrevida em pacientes com maior expressão de Ki-67, a ausência de significância estatística ressalta a necessidade de mais pesquisas. O Ki-67 continua sendo um marcador valioso para a avaliação do comportamento tumoral, mas seu papel prognóstico precisa ser refinado e corroborado por estudos adicionais em carcinoma metastático de células renais claras.

PALAVRAS-CHAVE: Ki-67. Carcinoma renal de células claras metastático. Biomarcador.

ABSTRACT

Shirazi AMC. **Analysis of Ki-67 expression in metastatic tissue and evaluation of its prognostic role in metastatic clear-cell renal carcinoma.** [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2025.

Renal Cell Carcinoma (RCC) encompasses numerous histological and molecular subtypes (SAMBIT K et al. 2022), of which clear-cell renal cell carcinoma (ccRCC) is the most common and accounts for the majority of cancer-related deaths. Advances in molecular biology have improved the understanding of ccRCC and led to a significant evolution in the treatment landscape for metastatic disease (mRCC). However, these treatments have a variable impact on tumor inhibition and patient survival, highlighting the need for new options to improve clinical outcomes (LI et al. 2023). Our major goal was to evaluate the expression of Ki-67, which is a reliable marker for cellular analysis. The hypothesis is that it can provide another variable for evaluating the biological behavior of mCRC. To achieve this, we conducted a retrospective analysis using the medical record database of consecutive patients diagnosed with mRCC and treated at AC Camargo Cancer Center between January 2007 and June 2021. The pathological material from metastatic tumors (biopsy or metastasectomy) of mRCC patients from this period was included in a tissue microarray (TMA) slide and analyzed by immunohistochemistry in the Department of Pathology. Researcher Aline Shirazi determined the percentage of Ki-67-positive cells and the total number of invasive cancer cells. We performed statistical analyses to determine the immunohistochemical expression pattern of Ki-67 in metastatic clear-cell renal carcinoma tissue and its potential prognostic role in disease progression. The Kaplan-Meier curve showed that the median overall survival (OS) for $Ki-67 \leq 15\%$ was approximately 96 months, whereas the median survival for $Ki-67 > 15\%$ was not reached during the follow-up period, with no statistical significance ($p = 0.46$). Regarding progression-free survival (PFS), the median for patients with $Ki-67 \leq 3\%$ was approximately 30 months. For the group with $Ki-67 > 3\%$, the progression-free survival curve was 18 months, but this outcome also did not reach statistical significance ($p = 0.16$). While the results of this study indicate a trend toward poorer survival in patients with higher Ki-67 expression, the lack of statistical significance underscores the need for further research. Ki-67 remains a valuable marker for assessing

tumor behavior, but its prognostic role needs to be refined and corroborated by additional studies in metastatic clear-cell renal carcinoma.

KEYWORDS: Ki-67. Metastatic clear cell renal carcinoma. Biomarker.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Lâmina da imuno-histoquímica de Ki-67 – 0% de expressão de Ki-67.....	34
Figura 2 - Lâmina da imuno-histoquímica de Ki-67 – <1% de expressão de Ki-67.....	35
Figura 3 - Lâmina da imuno-histoquímica de Ki-67 – 5 a 10% de expressão de Ki-67.....	36
Figura 4 - Lâmina da imuno-histoquímica de Ki-67 – 10 a 20% de expressão de Ki-67.....	37
Figura 5 - Lâmina da imuno-histoquímica de Ki-67 – 50 a 60% de expressão de Ki-67.....	38
Figura 6 – Sobrevida global estratificada de acordo com o intervalo de ponto de corte de Ki-67 $\leq 15\%$ e Ki-67 $> 15\%$	39
Figura 7 – Sobrevida livre de progressão estratificada de acordo com o intervalo de ponto de corte de Ki-67 $\leq 3\%$ e Ki-67 $> 3\%$	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lâmina Rim 05.....	23
Tabela 2 – Lâmina Rim 13.....	24
Tabela 3 – Lâmina Rim 16.....	25
Tabela 4 – Características descritivas dos pacientes.....	31
Tabela 5 – Análise comparativa bivariada da SG em pacientes estratificados com base nos níveis de expressão do marcador proliferativo Ki-67 ($\leq 15\%$ versus $> 15\%$): idade, gênero, nefrectomia e estágios tumorais.....	44
Tabela 6 – Análise comparativa bivariada da SLP em pacientes estratificados com base nos níveis de expressão do marcador proliferativo Ki-67 ($\leq 3\%$ versus $> 3\%$): presença de metástases e classificação de Heng.....	45
Tabela 7 – Análise comparativa bivariada da SLP em pacientes estratificados com base nos níveis de expressão do marcador proliferativo Ki-67 ($\leq 3\%$ versus $> 3\%$): idade, gênero, nefrectomia e estágios tumorais.....	48
Tabela 8 – Análise comparativa bivariada da SLP em pacientes estratificados com base nos níveis de expressão do marcador proliferativo Ki-67 ($\leq 3\%$ versus $> 3\%$): presença de metástases e classificação de Heng.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

CCR	Carcinoma de Células Renais
CCRc	Carcinoma de Células Renais Claras
CcRCC	Clear-cell Renal Cell Carcinoma
CCRm	Doença Metastática
CI	Confidence Interval
HR	Hazard Ratio
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
LDH	Lactato Desidrogenase
NA	Não Avaliável
NC	Nefrectomia Citorredutora
RR	Relative Risk
SCE	Sobrevida Câncer-Específica
SG	Sobrevida Global
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SLP	Sobrevida Livre de Progressão
SNC	Sistema Nervoso Central
TMA	Tissue Microarray
TNM	Tumor, Linfonodo e Metástase

LISTA DE SIGLAS

CEP/CONEP	Comitê de Ética em Pesquisa/ Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
IMDC	International Metastatic Renal Cancer Database Consortium
KPS	Karnovsky Performance Status
LACOG	Latin American Cooperative Oncology Group
LARCG	Latin American Renal Cancer Group
MSKCC	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo geral	
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Análise retrospectiva dos prontuários	20
4.2 Critérios de inclusão	26
4.3 Critérios de exclusão	27
4.4 Análise patológica	28
4.5 Análise estatística	29
5 RESULTADOS	31
5.1 Características clínicas e prognósticas da população estudada	31
5.2 Interpretação das lâminas de tecido metastático com marcação de Ki-67 ...	34
5.3 Análise de sobrevida	39
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXOS	59

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de células renais (CCR) é uma das neoplasias urológicas mais prevalentes em todo o mundo. É o sexto câncer mais diagnosticado em homens e o nono em mulheres, representando 5% e 3% de todos os diagnósticos oncológicos, respectivamente (SIEGEL et al. 2023). A incidência de CCR, uma doença altamente agressiva, tem aumentado constantemente ao longo dos anos, principalmente devido à expansão de exames de imagem, que podem ser indicadas para investigar outros distúrbios e incidentalmente identificar o CCR. (CAPITANIO et al. 2018). Quase 30% dos novos casos de CCR são diagnosticados no estágio avançado ou metastático (CHANDRASEKAR et al. 2017). Pulmões, gânglios linfáticos e ossos são os locais mais comuns de metástase do CCR, e as taxas de sobrevida caem de aproximadamente 75% para aproximadamente 15% em condição metastática (ESTERBERG et al. 2023).

A doença CCR abrange inúmeros subtipos histológicos e moleculares (SAMBIT K et al. 2022), dos quais o carcinoma de células renais claras (CCRc) ou em inglês *clear-cell renal cell carcinoma (ccRCC)* é mais comum e é responsável pela maioria das mortes relacionadas ao câncer. (HSIEH et al. 2017). Embora muitos dos dados epidemiológicos se relacionem ao câncer de rim em geral, histologicamente, o carcinoma de células renais (CCR) é responsável pela esmagadora maioria (90%) dos casos, incluindo predominantemente CCR de células claras (70%), CCR papilar (10 –15%) e CCR cromóforo (5%) (MOCH et al. 2016).

Sabemos que os avanços em biologia molecular melhoraram a compreensão do CCR e levaram a uma evolução significativa do cenário de tratamento da doença metastática (CCRm). Embora o tratamento para o CCRc localizado seja a ressecção cirúrgica ou ablação, as opções terapêuticas para a doença avançada são limitadas pela resistência à quimioterapia e levam a uma ênfase em terapias alvo. Combinações terapêuticas de inibidores de tirosina quinase, como axitinibe, cabozantinibe e lenvatinibe, e imunoterapia, como pembrolizumabe, nivolumabe e ipilimumabe, provaram sua utilidade. No entanto, esses tratamentos têm um impacto variável na inibição do tumor e na sobrevida individual do paciente, sugerindo que novas opções são necessárias para melhorar os resultados dos pacientes (LI et al. 2023).

O último painel de recomendações de tratamento para CCR avançado dos *grupos Latin American Cooperative Oncology Group (LACOG) e Latin American Renal Cancer Group*

(LARCG), publicado em 2024, recomenda que a imunoterapia e terapia alvo sejam considerados como padrão de tratamento para a doença avançada. A utilização e sequenciamento desses agentes terapêuticos dependem da pontuação de risco individual e resposta a tratamentos anteriores. De forma abrangente, os regimes de tratamento preferenciais incluem o uso de inibidores de checkpoints imunológicos combinados aos inibidores de tirosina-quinase.

Mesmo que tenha ocorrido um avanço relacionado às opções terapêuticas para CCR, ainda há expectativa de desenvolvimento de ferramentas clínicas que consigam prever o desenvolvimento dos tumores. (YANG et al. 2017). Além disso, a identificação e validação de biomarcadores serão cruciais para otimizar a seleção, sequência e novos alvos de tratamento.

Vários fatores prognósticos clínicos foram identificados com base em ensaios clínicos e análises retrospectivas, levando à criação de modelos prognósticos que designam pacientes para categorias favoráveis, intermediárias e de baixo risco. Esses modelos são a base de todos os principais ensaios clínicos e se tornaram o padrão para aconselhamento de pacientes e seleção de tratamentos na prática clínica (KLATTE et al. 2018).

Em 1999, MOTZER et al. publicaram a primeira versão do modelo de prognóstico do *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC)*. O modelo foi desenvolvido a partir de uma coorte de 670 pacientes tratados em vários ensaios clínicos entre 1975 e 1996, envolvendo terapias que incluíam citocinas (como intérféron ou interleucina) e algumas vacinas experimentais. Os fatores prognósticos identificados foram:

- Escala de Karnofsky Performance Status (KPS) inferior a 80%;
- Ausência de nefrectomia prévia;
- Nível elevado de lactato desidrogenase (LDH), definido como $LDH > 1,5$ vezes o limite superior da normalidade;
- Hemoglobina baixa, ou seja, inferior ao valor normal;
- Cálcio corrigido com albumina superior a 10 mg/dl.

As análises destes fatores prognósticos independentes geraram três grupos de risco com base no número de fatores prognósticos adversos: favorável (0 fator), intermediário (1 ou 2 fatores) e desfavorável (3 a 5 fatores), com sobrevida global (SG) mediana de 20, 10 e 4 meses, respectivamente. Mais tarde, após o advento das terapias-alvo, Heng et al. (2009) utilizaram dados do *International Metastatic Renal Cancer Database Consortium (IMDC)*, também conhecido como classificação de Heng, para propor seis fatores prognósticos. Dentre

esses fatores, quatro já foram incluídos no modelo de 2002 do *MSKCC*: Karnofsky Performance Status (KPS), intervalo entre o diagnóstico e o início do tratamento, hemoglobina e cálcio corrigido. O modelo *IMDC* retira a LDH (lactato desidrogenase) e adiciona a contagem de neutrófilos e plaquetas como novas variáveis. Semelhante ao modelo *MSKCC*, na classificação de Heng os autores mantêm a mesma classificação de risco como: favorável (0 fator), intermediário (1 ou 2 fatores) e desfavorável (3-6 fatores). Dessa forma, a SG mediana foi: não alcançada para o grupo de risco favorável (SG em 2 anos foi de 75%), 27 meses para grupo de risco intermediário (SG em 2 anos foi de 53%) e 8,8 meses para o grupo de risco desfavorável (SG em 2 anos foi de 7%).

Os fatores de risco *MSKCC* / *IMDC* são os principais critérios de seleção para indicar tratamento em *ccRCC*, no entanto, também vale a pena considerar as comorbidades e outras características da doença, além de acessibilidade, custos e reembolso (ATKINS et al. 2018). Os escores prognósticos para pacientes com CCR metastático são usados rotineiramente, mas têm precisão limitada. Marcadores moleculares podem melhorar a precisão de modelos prognósticos estabelecidos, mas freqüentemente carecem de validação externa independente. (KLATTE et al. 2018)

Por conta das questões aqui citadas, em relação à verificação de prognóstico do paciente com CCR, novos biomarcadores que possam estratificar pacientes devem ser identificados para orientar com mais precisão as decisões clínicas. Um bom exemplo para tal é o PD-L1, a sua alta expressão tem sido associada a um mau prognóstico e características clínico-patológicas mais avançadas em pacientes com CCR (LU et al. 2020).

Além do PD-L1 citado, nosso grupo também já possui artigos publicados que avaliam fatores prognósticos em CCR a partir da expressão de marcadores prognósticos, como por exemplo, a expressão imunohistoquímica de CD133 para prever progressão e morte relacionada ao câncer em carcinoma de células renais de COSTA et al. 2012, em que os resultados mostram que a expressão imunohistoquímica de CD133 teve um impacto na sobrevida em pacientes com CCR, demonstrando que o CD133 pode ser uma ferramenta útil para a estratificação de risco. Além disso, os resultados evidenciaram que a baixa expressão deste marcador permaneceu como um preditor independente de pobre sobrevida doença-específica e pobre sobrevida livre de progressão.

Ainda há dois trabalhos que gostaria de citar: avaliação do impacto prognóstico da perda concomitante da expressão das proteínas PBRM1 e BAP1 nos estágios iniciais do

carcinoma de células renais de células claras de COSTA et al. 2018, que demonstrou que pacientes com *ccRCC* com tumores em estágio inicial, que apresentam perda concomitante de *PBRM1* e *BAP1* apresentam piores taxas de sobrevida e representam um grupo de risco relevante para recorrência tumoral e morte. E por ultimo, não menos importante, a publicação que traz como resultados que pacientes com *ccRCC* metastático que apresentam perda da expressão de *BAP1* no tecido metastático apresentam baixas taxas de sobrevida e representam um grupo de risco relevante para recorrência tumoral e morte, de COSTA et al. 2019.

Pensando em dar seguimento à proposta do grupo, que têm sido focada em novos biomarcadores para estratificar e orientar decisões clínicas, a proposta desse projeto é voltada à pesquisa do Ki-67 em tecido metastático de pacientes com *ccRCC*.

É sabido que o Ki-67 é um marcador confiável de proliferação celular, a hipótese, é que ele pode fornecer mais uma variável para avaliação do comportamento biológico do CCR metastático. (SHEELA DEVI et al. 2017). O antígeno Ki-67 foi originalmente identificado por um grupo alemão, no início da década de 80, a partir do uso de um anticorpo monoclonal de camundongo contra um antígeno da linha celular derivada de linfoma de Hodgkin. A proteína recebeu o nome da localização dos pesquisadores, Ki, para Universidade de Kiel, Alemanha, com o rótulo 67 referente ao clone. (GERDES et al. 1983)

Ki-67, que é expresso durante os ciclos celulares dos estádios G1, S, G2 e M, exceto G0, geralmente é detectada por coloração imunohistoquímica (IHC) (LUO et al. 2016). Sua estrita associação com proliferação celular e sua co-expressão com outros marcadores bem conhecidos de proliferação indicam um papel fundamental na divisão celular (XIE et al. 2017).

Ki-67 desempenha um papel crítico na mitose, regulando a cromatina recombinante. Foi considerado um bom substituto molecular do comportamento agressivo e da resposta terapêutica para a avaliação do resultado da sobrevida em vários tipos de câncer, incluindo o CCR (XIE et al. 2017). Além disso, conforme LUO et al. 2016 cita, diversas metanálises alegaram que o Ki-67 exerce sua influência vital no prognóstico de carcinoma hepatocelular, câncer de mama, câncer de pulmão, carcinomas uroteliais do trato urinário superior, câncer cervical, gliomas e linfoma.

A primeira revisão sistemática e metanálise mais abrangente sobre as associações entre a expressão de Ki-67 e a importância prognóstica com CCR, foi publicada em 2017, por XIE et al, que tinha como objetivo esclarecer o papel prognóstico da expressão tecidual de Ki-

67 em pacientes portadores de CCR. A avaliação foi baseada no padrão quantitativo de expressão do Ki-67 e sua associação a relevantes características clínico patológicas do CCR. Nessa publicação, a validação do Ki-67 por expressão de imunohistoquímica (IHC), incluindo 20 estudos com 5398 pacientes, com CCR com diferentes tipos de tumor, incluindo *ccRCC*, e que receberam nefrectomia parcial ou radical, mostra que alta expressão de Ki-67 estava associada a piores taxas de Sobrevida Global (SG) (*Hazard Ratio (HR)* =1.95; 95% *Confidence Interval (CI)*: 1.44–2.64; $p<0.001$; $I^2=0.0\%$, $p=0.594$.), Sobrevida Câncer-Específica (SCE) ($HR=1.67$; 95% *CI*:1.47–.89; $p<0.001$; $I^2=2.7\%$, $p=0.417$) e Sobrevida Livre de Doença (SLD) ($HR=2.56$; 95% *CI*: 1.79–3.67; $p<0.001$; $I^2=0.0\%$, $p=0.598$).

A análise de subgrupos estratificada por etnia, extensão do tumor ao diagnóstico, subtipo histopatológico, método de contagem, *cutoff* de coloração e tempo de acompanhamento, revelou que pacientes com CCR com alta expressão de Ki-67 apresentaram resultados relativamente desfavoráveis, embora algumas associações não tenham atingido significância estatística. A ausência de uma associação significativa foi possivelmente devido aos estudos relativamente limitados nos subgrupos. Em termos de etnia, alta expressão de Ki-67 foi correlacionada com pobres SG, Sobrevida Câncer Específica (SCE) e sobrevida livre de doença (SLD) em pacientes caucasianos, bem como com pobre SLD, porém com SCE sem significância estatística em pacientes asiáticos. Em relação à extensão do tumor, a expressão elevada de Ki-67 foi associada à pobre SG e SCE, mas não significativa em relação à com SLD para todos os estágios de *RCC*; com pobre SLD, mas não significativa para SG e SCE para tumores *RCC* localizados; e com SCE pobre para *RCC* metastático. Para o subtipo histopatológico, alta expressão de Ki-67 foi correlacionada com pobre SCE e SLD para *ccRCC*. No subgrupo de *cutoff* de coloração, alta expressão de Ki-67 foi correlacionado com pobre SLD, mas não significativamente estatística com SCE quando o valor de corte foi inferior a 10%. Estudos com um valor de corte maior ou igual a 10% mostraram que a alta expressão de Ki-67 foi associada a pobre SG, SCE e SLD.

Além disso, verificou-se que a expressão do Ki-67 estava positivamente correlacionada com o estadiamento do tumor, linfonodo e metástase (TNM) (III / IV vs. I / II: *Relative Ratio (RR)* = 2,03, [95% *CI*: 1,68–2,44]) do estágio T patológico (T3 / T4 vs. T1 / T2: $RR = 1,67$, [IC95%: 1,35–2,06]), metástase (sim vs. não: $RR = 2,15$, [IC95%: 1,77–2,62]) e grau de Fuhrman (III / IV vs. I / II: $RR = 1,77$, [IC 95%: 1,20–2,60]). Para o subtipo histopatológico, a expressão elevada

de Ki-67 foi correlacionada com pobre SCE ($HR = 1,67$; IC 95%: 1,47–1,89; $p < 0,001$) e SLP ($HR = 3,66$; IC 95%: 2,00–6,72; $p < 0,001$) para *ccRCC*.

Portanto, os pesquisadores concluíram que o Ki-67 poderia servir como um biomarcador para estratificação de risco e até como possível alvo terapêutico no carcinoma de células renais. (XIE et al, 2017).

Em outra metanálise publicada no mesmo ano, que analisa estudos de diferentes países, nos traz respostas semelhantes em relação à expressão de Ki-67 em CCR. WANG et al. 2017, concluem que a expressão de Ki-67 também conhecido como MIB-1 é um preditor desfavorável para CCR. Um total de 4579 participantes de 23 estudos elegíveis foram incluídos nesta análise (inclui múltiplos subtipos histológicos: *ccRCC*, *ccRCC* metastático e *non-ccRCC*). Os resultados mostraram que a expressão de Ki-67 foi associada a baixa sobrevida global ($HR = 2,06$, IC 95%: 1,64–2,57) e sobrevida específica para câncer ($HR = 2,01$, IC 95%: 1,66–2,44). Além disso, a expressão de Ki-67 também foi correlacionada ao estágio TNM (III / IV vs I / II: OR = 1,92, IC 95%: 1,61–2,28), estágio T patológico (pT3 / pT4 vs pT1 / pT2 : OR = 1,56, IC 95%: 1,21–2,02), metástase distante (M1 vs M0: OR = 1,81, IC 95%: 1,34–2,43) e grau de Fuhrman (III / IV vs I / II: OR = 1,94, IC95%: 1,21–3,10). (WANG et al. 2017)

Em mais essa revisão, a expressão de Ki-67 foi associada a características clínicas mais agressivas em pacientes com CCR; A expressão de Ki-67 teve relação positiva com maior estágio e grau do tumor, bem como envolvimento linfonodal e metástases distantes, o que sugeriu que Ki-67 tem potencial para ser utilizado como biomarcador dicotômico.

Apesar da vasta literatura avaliando o papel prognóstico da expressão do Ki-67 no tumor renal primário de pacientes portadores de *CCRcc*, ainda não foi analisado o prognóstico desse biomarcador diretamente no tecido metastático. Essa avaliação se torna importante do ponto de vista da evolução da heterogeneidade tumoral, já demonstrada na literatura, no entanto gostaria de evidenciar a publicação de GERLINGER et al. 2012, que caracterizou as consequências da heterogeneidade intratumoral usando análise imunohistoquímica, análise funcional de mutação e perfil da expressão do RNA mensageiro. Os autores comprovaram que a heterogeneidade intratumoral pode levar à subestimação da paisagem da genômica tumoral retratada a partir de amostras únicas de biópsia de tumor e pode apresentar grandes desafios ao desenvolvimento de medicamentos personalizados e de biomarcadores. A heterogeneidade intratumoral, associada à função heterogênea da proteína, pode promover

a adaptação do tumor e a falha terapêutica através da seleção darwiniana. (GERLINGER et al. 2012).

Para reforçar esse trabalho, vale evidenciar que até recentemente, a nefrectomia citorrredutora (NC) era o padrão de tratamento para pacientes com CCR metastático. (FLANIGAN et al. 2001; MICKISCH et al. 2001). Ensaios clínicos randomizados que levaram a esta recomendação foram realizados durante a era das citocinas e demonstraram que a NC resultava em uma melhora significativa na sobrevida global (SG). No entanto, a compreensão da biologia do câncer renal e dos resultados com terapias alvo e imunoterapia criaram recentemente um novo dilema para saber se o médico deve iniciar o tratamento com terapia sistêmica ou iniciar com cirurgia citorrredutora seguida por terapia sistêmica, especialmente a imunoterapia. (MEJEAN et al. 2018). Além disso, a remoção do tumor primário no contexto de doença metastática não está indicada para todos os pacientes (nível de recomendação A) (BEX et al. 2019; FLANIGAN et al. 2001; MEJEAN et al. 2018; MICKISCH et al. 2001).

A prática clínica apoiada à literatura vem mostrando que muitos pacientes não são mais submetidos à cirurgia para retirada do tumor primário, e a biópsia da metástase tem sido amplamente utilizada para guiar tratamento. Por conta de todo o contexto aqui citado, identifica-se a importância de investigar o papel prognóstico do Ki-67 diretamente no tecido metastático de *ccRCC*.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos escores de risco do MSKCC e do IMDC apresentarem fatores prognósticos biológicos simples, relevantes e úteis, há a necessidade de se estudar a expressão de possíveis marcadores no tecido metastático, pois, devido à heterogeneidade da doença, o perfil de expressão gênica no tumor primário pode ser diferente do tecido metastático.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o padrão de expressão imunohistoquímica de Ki-67 em tecido tumoral metastático de carcinoma de células claras renais e seu eventual papel prognóstico na evolução da doença. Para essa avaliação, consideraremos a Sobrevida Global (SG) e Sobrevida Livre de Progressão (SLP) dos pacientes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANÁLISE RETROSPECTIVA DOS PRONTUÁRIOS

Análise retrospectiva dos prontuários de pacientes consecutivos com diagnóstico de CCRm tratados no AC Camargo Câncer Center no período de Janeiro de 2005 a Junho e 2021.

Os pacientes serão identificados no banco de dados eletrônico do registro hospitalar do A.C. Camargo Cancer Center e os dados clínicos serão coletados através dos registros em prontuário médico arquivado no SAME, empregando ficha de coleta de dados criada para este estudo (Anexo 1). Vale reforçar aqui que parte do banco de dados já foi levantado e iremos atualizá-lo até 2021. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa em 14 de dezembro de 2021 e aprovado em 10 de junho de 2022.

A análise histopatológica foi feita através das lâminas do tecido metastático de cada paciente, armazenada no arquivo do departamento de Patologia do AC Camargo Cancer Center e, mais uma vez, reforço que trata-se de uma continuidade, uma vez que o grupo já havia confeccionado lâminas para análise de outros biomarcadores em tecido metastático.

Cabe lembrar que dispomos de um banco de dados com 128 pacientes portadores de CCRm tratados entre 2005 e 2016, cujo material anátomo-patológico do tumor metastático (biópsia ou metastasectomia) já foi incluído em uma lâmina de *tissue microarray* (TMA). Esse material já foi utilizado em estudos e publicações recentes do nosso grupo, publicação de DA COSTA et al. 2019. O que também se buscou com esse projeto é expandir o número de pacientes e, possivelmente, a confecção de novas lâminas de TMA.

Nosso grupo tem desenvolvido uma consistente linha de pesquisa nessa área através do projeto temático LARCG 001 coordenado pelo Doutor Stênio de Cássio Zequi, que tem como objetivo avaliar a expressão imunohistoquímica de diversos biomarcadores moleculares em câncer renal (BAP1; Beta-Catenina, CD133; Complexo Ezrina-Moezina; EPO/EPO-R; FOXP3; KDM5C; NOS-3; PBRM1; PTEN; REN/REN-R; PD-1, PDL1 e CTLA-4).

O projeto aqui apresentado é um braço do LARCG 001 e estudará a expressão de Ki-67 por meio de análise imunohistoquímica e seu impacto prognóstico em pacientes do AC Camargo, trazendo mais informações e uma melhor compreensão sobre o comportamento biológico da doença.

A montagem do bloco de *Tissue Micro Array* (TMA) e análise por imunohistoquímica, 166 casos foram resgatados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica e os blocos

representativos do tumor foram selecionados por uma patologista da instituição. As áreas de interesse, definidas como aquelas com maior representatividade de células neoplásicas, foram marcadas com caneta permanente e identificadas nos blocos de parafina correspondentes (blocos doadores). Usando o *manual Tissue Microarrayer* (Beecher Instrument, Silver Spring, MD, USA), foram retirados cilindros das áreas de interesse previamente identificadas e transferidos para novos blocos de parafina (blocos receptores). Para cada caso foram retirados dois cilindros de 1mm de duas áreas distintas do tumor, que foram distribuídos no bloco de parafina receptor de forma que cada amostra de um bloco doador ocupou uma determinada linha e uma determinada coluna no bloco receptor.

Para a realização do estudo imunohistoquímico, foram realizados cortes convencionais seccionadas no micrótomo (Leica, RM2255), na espessura de quatro micrômetros, postos em lâminas com carga elétrica (StarFrost) e mantidas em estufa a 60°C *overnight*. As lâminas foram posteriormente incubadas com o anticorpo Ki-67 (BD 550609, clone B56, Pharmingen) durante 32 minutos, na diluição de 1:200, através do kit de detecção *Ultraview* (cat. 760-500, Ventana Medical Systems). As reações foram realizadas no sistema automatizado *Ventana BenchMark XT* (Ventana Medical Systems) seguindo as instruções do fabricante. As lâminas foram brevemente desparafinizadas utilizando a solução EZprep (cat. 950-102, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA). A recuperação antigênica foi feita com os reagentes *Cell Conditioning 1* (cat. 950-224, Ventana Medical Systems, Inc.) a 95°C durante 60 minutos. Após o ensaio de imuno-histoquímica, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, xilol e montadas com meio de montagem Entellan (cat. 107961, Merck).

Uma patologista especialista em uro-oncologia e cega para o desfecho dos casos, Stephania Martins Bezerra (SMB) pontuou a expressão Ki-67 em todas as amostras. A leitura dos resultados da imunohistoquímica foi feita no formato de uma tabela de Excel onde se identificará uma determinada amostra pela coluna e linha correspondente àquela que ocupa no bloco de parafina. Durante a leitura, a patologista responsável, SMB, analisou as lâminas enquanto a pesquisadora, Aline Shirazi (AS), registrou os dados na tabela do Excel, para minimizar erros.

Para interpretação e leitura das lâminas, foi utilizada uma metodologia aplicada em câncer de mama e estabelecida pelo *International Ki67 in Breast Cancer Working Group*, por NILSEN et al. 2021 para a avaliação de Ki-67, sendo ela descrita da seguinte maneira: contagem

de todas as células positivas de carcinoma invasivo na região em que todos os núcleos foram corados; a pontuação requer a determinação da porcentagem de células positivas entre o número total de células cancerígenas invasivas; nenhuma interpretação de intensidade. Quando o material era não avaliável, por perda parcial do tecido, problemas na visualização e ou coloração da lâmina, foi identificado com a sigla NA (não avaliável). Quando não havia tecido para avaliação, por perda do material naquele cilindro, identificamos com a sigla X. Ambos os casos, NA e X, foram excluídos. A duplicata foi realizada para validar a primeira leitura e o resultado de cada cilindro será a média de ambas, quando for possível realizar o cálculo. Quando a contagem de células positivas para Ki-67 era identificada como < 1 , consideramos como zero para realizar a média entre as leituras. Os números e letras antes do traço identificam os cilindros, ou seja, cada caso. Placenta foi controle negativo.

Veja a seguir as tabelas da expressão imunohistoquímica:

Tabela 1 – Lâmina Rim 05

PLACENTA	919798	1020394	1140292	1237117	1382534	DUPLICATA	PLACENTA	919798	1020394	1140292	1237117	1382534
	AA - 0	AH - 0	AA - X	AA - NA	AAA - X			AA - <1	AH - 0	AA - X	AA - X	AAA - X
A-709377	925027	1021017	1140504	1240322	1387858		A-709377	925027	1021017	1140504	1240322	1387858
L5 - 0%	AA - 30%	AB - 0	AB - 8%	AJ - 0	BAA - X		L5 - 0%	AA - NA	AB - X	AB - 10%	AJ - 1%	BAA - X
A-711052	927092	1026242	1140815	1257324	1391586		A-711052	927092	1026242	1140815	1257324	1391586
A - 0%	AC - X	AF - X	AA - X	AC - 2%	AAA - X		A - <1	AC - X	AF - X	AA - X	AC - <1	AAA - X
A-717153	930729	1027036	1141068	1309084	1397309		A-717153	930729	1027036	1141068	1309084	1397309
A - 30%	AB - X	AD - 10%	AA - X	AAA - 50%	AAA - X		A - X	AB - X	AD - 2%	AA - X	AAA - 30%	AAA - X
A-719205	931508	1032765 -	1144220	1310083	13100088		A-719205	931508	1032765 -	1144220	1310083	13100088
C - NA	AC - 1%	NA	AA - X	AAA - X	AAB - 0		C - X	AC - 0	1%	AA - X	AAA - X	AAB - 0
A-723005 -	934471	1036853	1204687 - X	1325087	14056032		A-723005 -	934471	1036853	1204687 - X	1325087	14056032
0%	AC - 0%	AE - X		AAB - 1%	AAA - X		0%	AC - X	AE - X		AAB - 2%	AAA - X
A-805356	940276	1110469	1204820	1326892	14058990		A-805356	940276	1110469	1204820	1326892	14058990
B - X	AA - X	AA - X	AA - NA	AAA - 0	XB - X		B - NA	AA - X	AA - X	AA - NA	AAA - 0	XB - X
823076	1001978	1120829	1205901	1332482	14063618		823076	1001978	1120829	1205901	1332482	14063618
AK - < 1	AC - 0	AG - 6%	AB - <1%	AAC - 5%	XD - 5%		AK - 0	AC - X	AG - 5%	AB - <1%	AAC - 5%	XD - 40%
826544	1002072	1121309	1207459	1334509	14065768		826544	1002072	1121309	1207459	1334509	14065768
AC - 0%	AB - <1	AF - 0	AE - 0	BAA - X	AAA - 10%		AC - 0%	AB - X	AF - X	AE - 0	BAA - X	AAA - X
829416	1002767	1122130	1208013	1346970	14078467		829416	1002767	1122130	1208013	1346970	14078467
AD - 0%	AB - 0	AA - 16%	AC - NA	AAG - 2%	AAA - X		AD - 0%	AB - X	AA - 5%	AC - NA	AAG - 1%	AAA - X
830800	1003373	1124885	1208744	1355006	14082648		830800	1003373	1124885	1208744	1355006	14082648
AC - NA	AB - X	AF - 8%	AD - 0	AAB - 30%	AAA - X		AC - NA	AB - X	AF - 30%	AD - 0	AAB - X	AAA - X
835120	1005823	1127668	1221222	1360909	14094323		835120	1005823	1127668	1221222	1360909	14094323
AA - X	AE - 0	AG - 7%	AA - X	FAA - X	AAI - X		AA - X	AE - 0	AG - <1	AA - X	FAA - 0	AAI - X
838482	1010714	1128746 - 0	1226219	1365596	14095058		838482	1010714	1128746 - 0	1226219	1365596	14095058
A.N - 0%	AA - X		AA - X	AAA - X	AAA - NA		A.N - 0%	AA - X		AA - X	AAA - X	AAA - 1%
900702	1011120	1129100	1228236	13664386	14095739		900702	1011120	1129100	1228236	13664386	14095739
AD - 0%	AA - X	AA - X	AA - X	BAB - X	AAA - X		AD - 0%	AA - X	AA - X	AA - X	BAB - X	AAA - X
903309 - X	1011215	1133127	1232002	1374705	14099771		903309 - X	1011215	1133127	1232002	1374705	14099771
	AB - 0	AB - 0	AA - X	AAD - 0%	AAA - X			AB - 0	AB - <1	AA - X	AAD - 0%	AAA - X
916573	1013928	1137078	1234480	1376620	H14-003635		916573	1013928	1137078	1234480	1376620	H14-003635
AD - NA	AH - NA	AA - NA	AA - X	CAB - <1	- X		AD - X	AH - NA	AA - X	AA - X	CAB - 1%	- X

Fonte: Resultados originais da pesquisa

Tabela 2 – Lâmina Rim 13

PLACENTA	1364386 AAB - 0	H15-33269 1A - 5%	H15-6308 3A - 0	DUPLICATA	PLACENTA	1364386 AAB - x	H15-33269 1A - 5%	H15-6308 3A - X
A-707683	1375693	H16-413	H15-7497		A-707683	1375693	H16-413	H15-7497
A - <1	AAF - 0	2A - 0	1A - X		A - 0	AAF - 0	2A - <1	1A - X
722303	14043458	H16-3581	H15-7806		722303	14043458	H16-3581	H15-7806
A - x	AAG - 0	2B - NA	1A - X		A - x	AAG - 0	2B - NA	1A - X
A-722808	14060651	H16-4908	H15-8224		A-722808	14060651	H16-4908	H15-8224
D - 0	AAB - <1	1A - X	1A - <1		D - 0	AAB - <1	1A - X	1A - 5%
A-726383	H14-0950	H16-5645	H15-8410		A-726383	H14-0950	H16-5645	H15-8410
A - 0	2B - <1	3A - <1	4A - 0		A - 0	2B - <1	3A - 0	4A - 0
A-803928	H14-1377	H16-17763	H15-8967		A-803928	H14-1377	H16-17763	H15-8967
A - 0	1B - 1%	1A - X	1A - 0		A - 0	1B - 3%	1A - X	1A - 5%
827284 - X	H15-22452	H16-19412	H15-10535		827284 - x	H15-22452	H16-19412	H15-10535
	1A - X	1D - 0	1A - X			1A - X	1D - 0	1A - X
927260	H15-23560	H16-28763	H15-14434		927260	H15-23560	H16-28763	H15-14434
AE - 0	1C - 5%	1A - 5%	1A - X		AE - x	1C - <1	1A - <1	1A - X
933389 - 0	H15-24374	H16-35168	H15-15108		933389 - 0	H15-24374	H16-35168	H15-15108
	1A - 0	1A - X	1A - 5%			1A - 0	1A - X	1A - X
1014243 - 0	H15-26718	H17-9447	H15-15440		1014243 - 0	H15-26718	H17-9447	H15-15440
	1H - 10%	1B - 5%	2A - 0%			1H - 5%	1B - X	2A - 0%
1020394	H15-27081	H14-4668	H15-19048		1020394	H15-27081	H14-4668	H15-19048
AF - 0	1A - X	1A - X	2A - <1		AF - 0	1A - X	1A - X	2A - 2%
1030441	H15-28479	H14-4778	H15-21410		1030441	H15-28479	H14-4778	H15-21410
AA - X	3B - 0	1A - X	1A - X		AA - X	3B - 0	1A - X	1A - 5%
1222649	H15-29705	H15-1544	H15-21475		1222649	H15-29705	H15-1544	H15-21475
AC - X	1A - X	1A - X	1A - X		AC - x	1A - X	1A - X	1A - X
11236520	H15-29760	H15-3283			11236520	H15-29760	H15-3283	
AF - 0	1A - X	1A - X			AF - 0	1A - X	1A - X	
1347178	H15-30658	H15-3332			1347178	H15-30658	H15-3332	
BAA - X	1A - X	2C - 0			BAA - X	1A - X	2C - <1	
1354423	H15-32526	H15-4634			1354423	H15-32526	H15-4634	
XK - 0	1A - X	1A - NA			XK - 0	1A - X	1A - NA	

Fonte: Resultados originais da pesquisa

Tabela 3 – Lâmina Rim 16.

Nessa lâmina, os casos H17 023550-1A e H19 0126371A, são do mesmo paciente, porém com metas diferentes.

PLACENTA	H16 007682-3A - 0	H17 022131-1M - 0	H18 029588-1A - x	DUPLICATA	PLACENTA	H16 007682-3A - 30%	H17 022131-1M - 0	H18 029588-1A - x
1307520 CAN - 0	H16 019412-1A - 0	H17 022335-1A - 40%	H18 031843-2A - 40%		1307520 CAN - 0	H16 019412-1A - <1	H17 022335-1A - 80%	H18 031843-2A - 40%
1355006 AAC - 0	H16 027237-1A - x	H17 022880-3B - 0	H18 032914-2C - <1		1355006 AAC - 0	H16 027237-1A - x	H17 022880-3B - 0	H18 032914-2C - 10%
14063618 XG - 1%	H16 028002-2A - 8%	H17 023550-1A - x	H19 007371-1B - 0		14063618 XG - 0	H16 028002-2A - <1	H19 012637-1A - 0	H19 007371-1B - 0
14078966 XA - x	H16 030243-1A - 0	H17 033001-1A - x	H19 009337-1A - 10%		14078966 XA - x	H16 030243-1A - 0	H17 033001-1A - 5%	H19 009337-1A - 5%
H15 001350-1A - x	H16 031450-1A - 10%	H18 007270-1C - 0	H19 010794-1A - x		H15 001350-1A - x	H16 031450-1A - x	H18 007270-1C - 0	H19 010794-1A - x
H15 010108 1A - 0	H16 032504-1A - x	H18 008050-1A - 2%	H19 027056-1B - 10%		H15 010108 1A - 0	H16 032504-1A - x	H18 008050-1A - 5%	H19 027056-1B - 10%
H15 014805 1A - x	H16 032616-2B - 5%	H18 008753-2A - <1	H20 002500-1A - x		H15 014805 1A - x	H16 032616-2B - 2%	H18 008753-2A - 2	H20 002500-1A - x
H15 016143 1A - 0	H16 035031-1A - 0	H18 010588-2B - <1	H20 014587-1A - 80%		H15 016143 1A - 0	H16 035031-1A - x	H18 010588-2B - 0	H20 014587-1A - 30%
H15 017574-1A - <1	C17 034615-1A - 10%	H18 015763-1B - 20%	H20 007968-1A - x		H15 017574-1A - x	C17 034615-1A - x	H18 015763-1B - x	H20 007968-1A - <1
H15 022332-1A - NA	H17 010755-1A - NA	H18 015763-1C - x	H20 025849-1B - 10%		H15 022332-1A - <1%	H17 010755-1A - NA	H18 015763-1C - x	H20 025849-1B - 3%
H15 029687-2A - 0	H17 020005-2A - x	H18 019274-1A - x	H21 000767-1C - 20%		H15 029687-2A x	H17 020005-2A - x	H18 019274-1A - x	H21 000767-1C - 20%
H16 005775-1A - x	H17 021754-2A - 5%	H18 025362-1A - x	H21 013858-2A - 20		H16 005775-1A - x	H17 021754-2A - <1	H18 025362-1A - x	H21 013858-2A - 30%

Fonte: Resultados originais da pesquisa.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes com diagnóstico de carcinoma de células claras metastático, com material anátomo-patológico do tecido metastático disponível para análise.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Material da metástase insuficiente para análise.

Carcinoma metastático células não claras

Dados de prontuário insuficiente: não ter realizado tratamento e seguimento no AC Camargo.

4.4 ANÁLISE PATOLÓGICA

Análise da expressão imuno-histoquímica do biomarcador de proliferação celular Ki-67 através da construção de plataformas de TMA (Tissue Microarray) feitas com amostras de lâminas de tecido de carcinoma renal metastático, que estão arquivadas no Departamento de Patologia do AC Camargo Cancer Center para leitura de Ki-67.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para essa avaliação, consideramos a Sobrevida Global (SG) e Sobrevida Livre de Progressão (SLP) dos pacientes. Para a análise de SG, utilizamos a data do diagnóstico até o último follow-up (acompanhamento) de cada paciente, considerando os seguintes desfechos: vivo com doença, vivo sem doença ou óbito. Para a avaliação de SLP, utilizamos a data do diagnóstico (data da biópsia) até a data da primeira metástase identificada.

Inicialmente, foi apresentada uma análise descritiva dos dados de todas as variáveis de interesse. Para as variáveis qualitativas, foram fornecidas as distribuições de frequências absoluta (n) e relativa (%), e para as variáveis quantitativas, foram apresentadas as principais medidas resumo, como média, mediana, mínimo, máximo, intervalo interquartil e desvio padrão.

O teste exato de Fisher ou o teste qui-quadrado foi aplicado para avaliar a associação entre as variáveis qualitativas em relação à variável Ki-67 (≤ 15 vs > 15), enquanto a comparação dos dados das variáveis quantitativas em relação à variável de grupo (Ki-67) foi realizada por meio do teste t de Student ou do teste U de Mann-Whitney. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados nos dois grupos, e o teste de Levene para avaliar a homoscedasticidade entre os grupos.

Para os desfechos "tempo até o óbito" e "tempo até a progressão", as curvas de sobrevivência foram estimadas utilizando o estimador de Kaplan-Meier, e a comparação entre as curvas foi realizada por meio do teste de log-rank. Quanto à variável quantitativa Ki-67 (%), um ponto de corte foi determinado utilizando o método de Lausen e Schumacher (LAUSEN et al., 1992), que emprega a estatística de log-rank padronizada para identificar o melhor ponto de corte (*cutoff*, em inglês) para cada desfecho. O *cutoff* é um valor numérico definido estatisticamente para dividir os dados em grupos distintos, possibilitando análises comparativas mais robustas. No contexto deste estudo, ele estabelece um limite na expressão de Ki-67 para classificar os pacientes em subgrupos prognósticos, através dos dados gerados pela amostra.

Posteriormente, o modelo de riscos proporcionais de Cox (COX. 1972) foi ajustado aos dados para descrever a relação entre Ki-67 e o tempo até o óbito ou tempo até a progressão. A medida de associação, dada pela razão de riscos (*hazard ratio* - HR) com o respectivo intervalo de confiança de 95%, foi calculada. Além disso, razões de riscos ajustadas por sexo e

idade também foram estimadas por meio do modelo de regressão de Cox múltiplo. Outros fatores independentes não foram incluídos devido ao número reduzido de pacientes com informação de Ki-67. Em todas as análises, a suposição de riscos proporcionais foi avaliada por meio da análise dos resíduos de Schoenfeld e do teste de proporcionalidade (GRAMBSCH et al. 1994).

Em todos os testes de hipóteses, o nível de significância adotado foi de 5%. Assim, resultados cujos valores de p são menores que 0,05 são considerados estatisticamente significativos. O software livre R, versão 4.4.1 foi utilizado em todas as análises.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PROGNÓSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Do total de 296 pacientes com carcinoma renal metastático, foram incluídos no estudo 176 pacientes com CCRc e com dados de prontuário suficientes para a avaliação. Desses, 49 (27,8%) eram do sexo feminino e 127 (72,2%) do sexo masculino, com idade mediana de 58 anos. Dos participantes, 164 (94,2%) haviam sido submetidos à nefrectomia. Metástases foram observadas em 128 pacientes no pulmão, 92 nos ossos e 73 nos linfonodos, podendo cada paciente apresentar mais de uma metástase. Em relação ao prognóstico, segundo a classificação *IMDC*, também conhecida como classificação de Heng, a maioria, 95 (60,5%) dos pacientes, apresentava prognóstico intermediário, 32 (20,4%) tinham bom prognóstico e 30 (19,1%) pacientes tinham prognóstico pobre. Informações sobre a classificação *IMDC* estavam ausentes para 19 pacientes.

As características descritivas da população estão detalhada na Tabela 4 abaixo

Tabela 4 – Características descritivas dos pacientes

Variável	Resultado Descritivo
Idade média	57,7
Idade mediana	58
Homens	127 (72.2%)
Mulheres	49 (27.8%)
Estadiamento patológico	
T	n (%)
1a	17 (14.8)
1b	22 (19.1)
2a	25 (21.7)
2b	7 (6.1)
3a	28 (24.4)
3b	6 (5.2)
4	10 (8.7)
Dados ausentes	61
N	n (%)
0	6 (10.0)

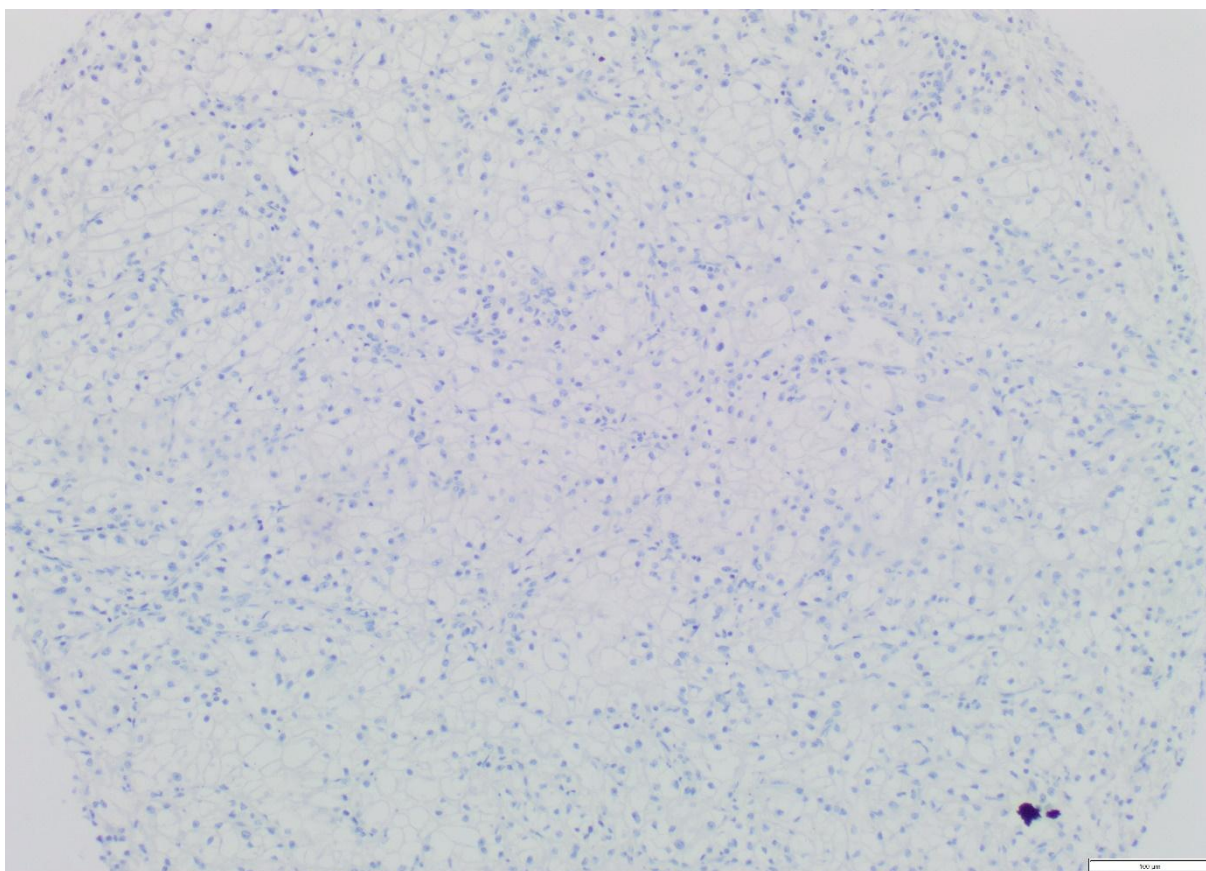
1	8 (13.3)
2	46 (76.7)
Dados ausentes	116
Metástase Pulmonar	n (%)
Sim	128 (74.4)
Não	44 (25.6)
Dados ausentes	4
Metástase hepática	n (%)
Sim	46 (26.6)
Não	127 (73.4)
Dados ausentes	3
Metástase óssea	n (%)
Sim	92 (53.2)
Não	81 (46.8)
Dados ausentes	3
Metástase Sistema Nervoso Central (SNC)	n (%)
Sim	35 (20.2)
Não	138 (79.8)
Dados ausentes	3
Metástase Intra-abdominal	n (%)
Sim	40 (23.1)
Não	133 (76.9)
Dados ausentes	3
Metástase tecidos moles	n (%)
Sim	21 (12.1)
Não	152 (87.9)
Dados ausentes	3
Metástase linfonodal	n (%)
Sim	73 (41.9)
Não	101 (58.1)
Dados ausentes	2
Outras metástases	n (%)
Sim	47 (27.2)
Não	126 (72.8)
Dados ausentes	3

Classificação IMDC (Heng)	n (%)
Bom prognóstico	32 (20.4)
Prognóstico Intermediário	95 (60.5)
Prognóstico Pobre	30 (19.1)
Dados ausentes	19

5.2 INTERPRETAÇÃO DAS LÂMINAS DE TECIDO METÁSTÁTICO COM MARCAÇÃO DE KI-67

Sendo o ponto de corte do Ki-67 para SG $\leq 15\%$ vs $>15\%$ e SLP $\leq 3\%$ vs $>3\%$, representamos abaixo, de forma categorizada exemplos de: 0% (Fig. 1), 5% (a que está 5 a 10%) (Fig. 3), 20% (a que está entre 10 e 20%) (Fig. 4), 60% (a que está entre 50 e 60%) (Fig. 5) e menor que 1% (Fig. 2).

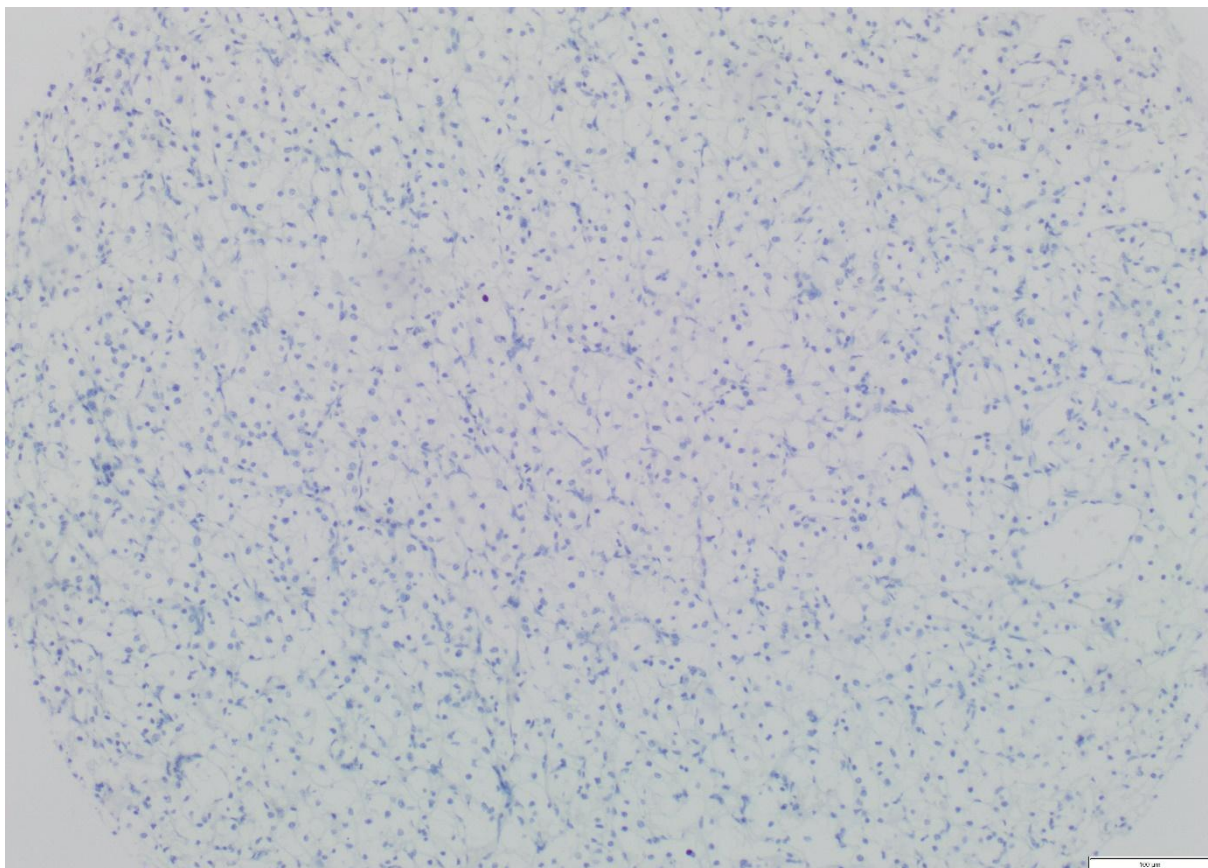
As imagens estão em escala e foram tiradas com a objetiva de 10x.



Fonte: Resultados originais da pesquisa.

Figura 1 - Ausência de expressão de Ki-67 em células renais

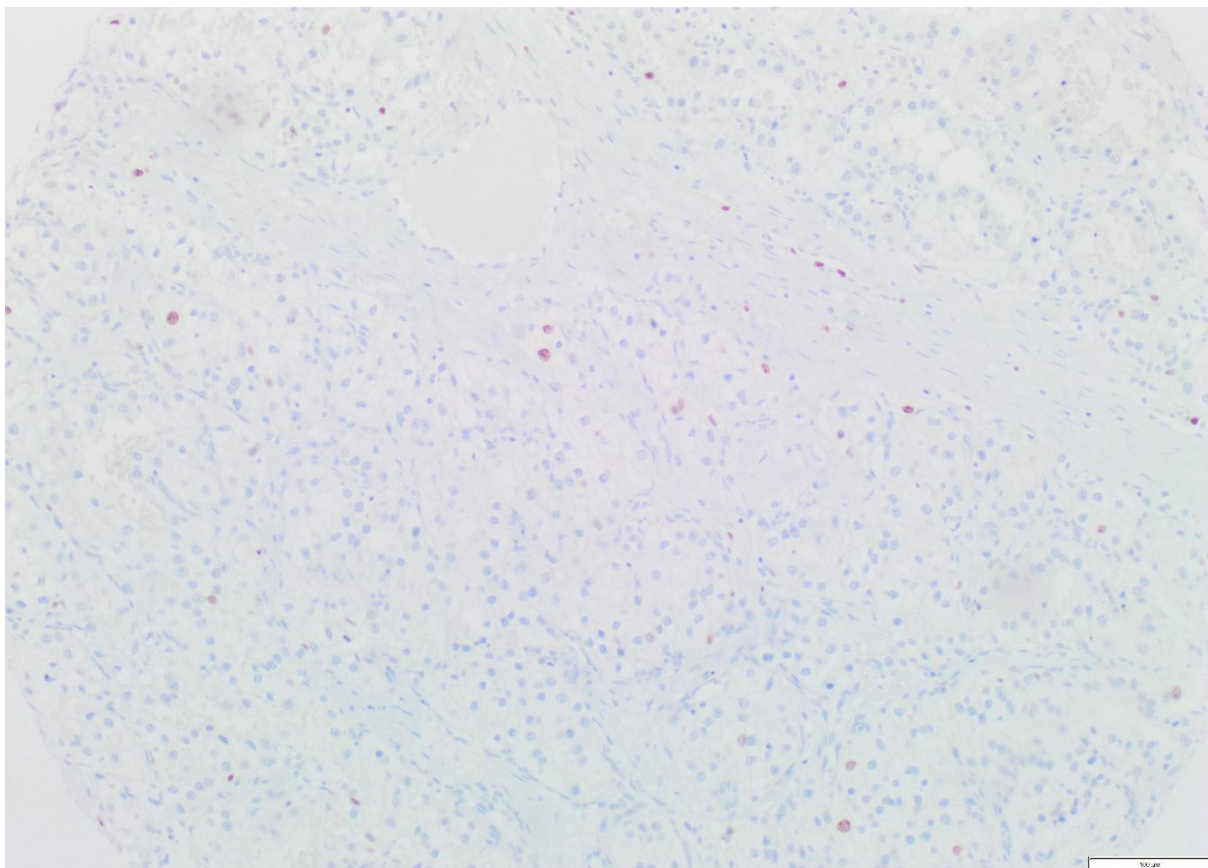
Lâmina de imuno-histoquímica de tecido metastático com marcação de Ki-67. Barra de escala = 100 μm .



Fonte: Resultados originais da pesquisa.

Figura 2 - Expressão de Ki-67 abaixo de 1% em células renais.

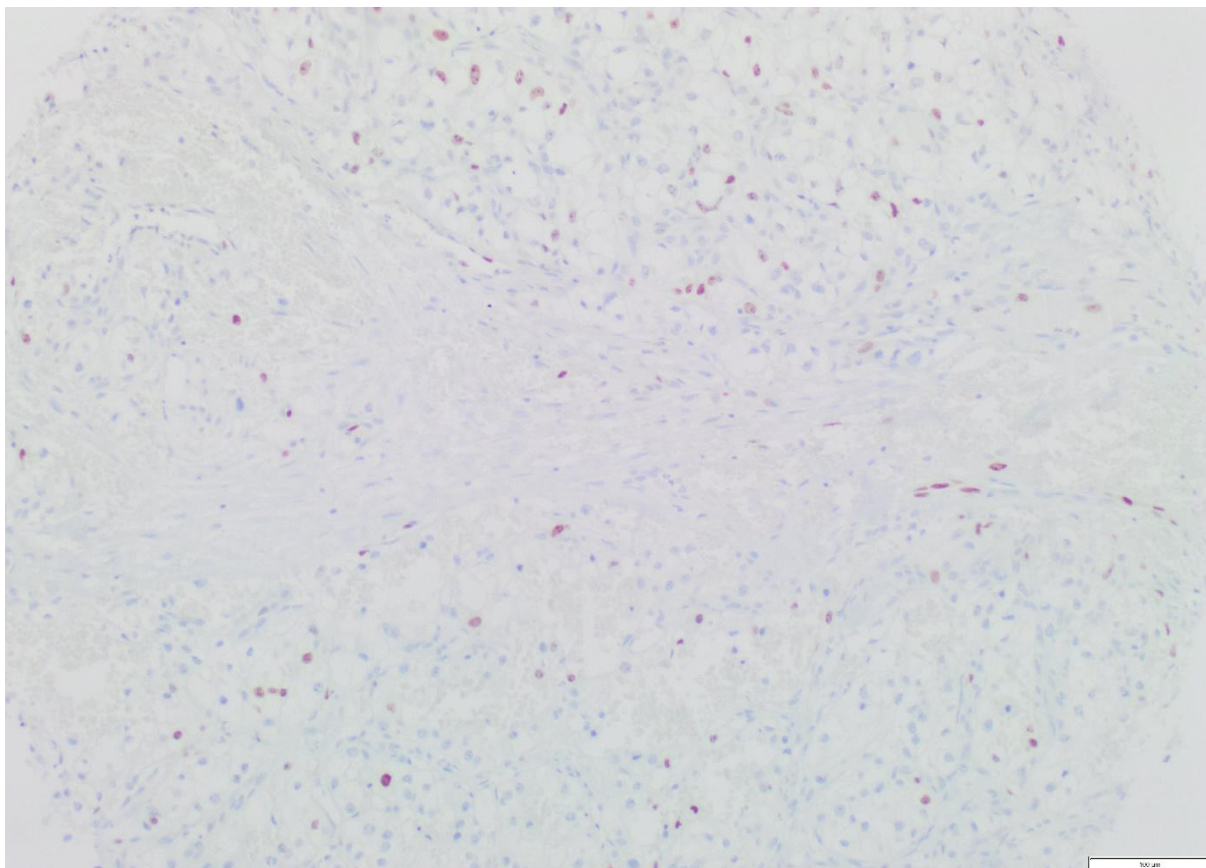
Lâmina de imuno-histoquímica de tecido metastático com marcação de Ki-67. Barra de escala = 100 μ m.



Fonte: Resultados originais da pesquisa.

Figura 3 - Expressão de Ki-67 entre 5% e 10% em células renais

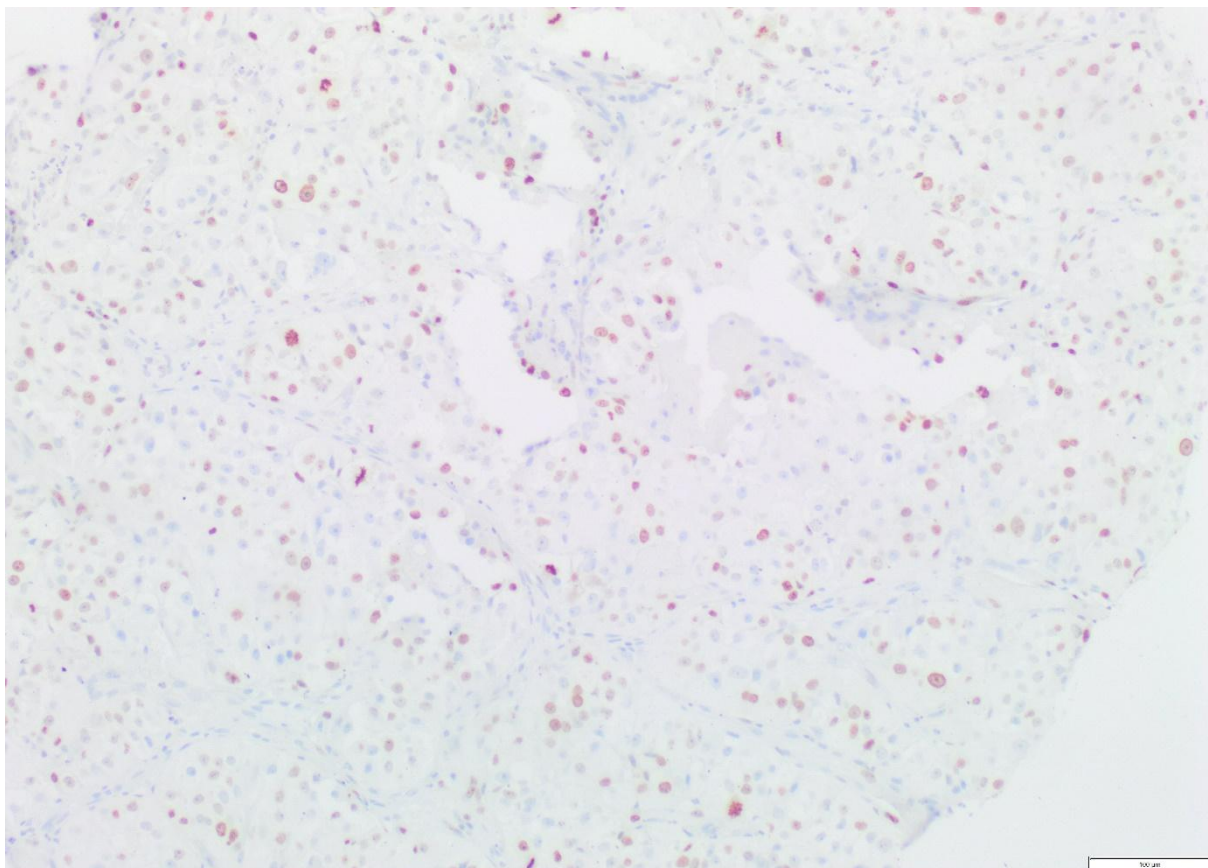
Lâmina de imuno-histoquímica de tecido metastático com marcação de Ki-67. Barra de escala = 100 μ m.



Fonte: Resultados originais da pesquisa.

Figura 4 - Expressão de Ki-67 entre 10% e 20% em células renais

Lâmina de imuno-histoquímica de tecido metastático com marcação de Ki-67. Barra de escala = 100 µm.



Fonte: Resultados originais da pesquisa.

Figura 5 - Expressão de Ki-67 entre 10% e 20% em células renais

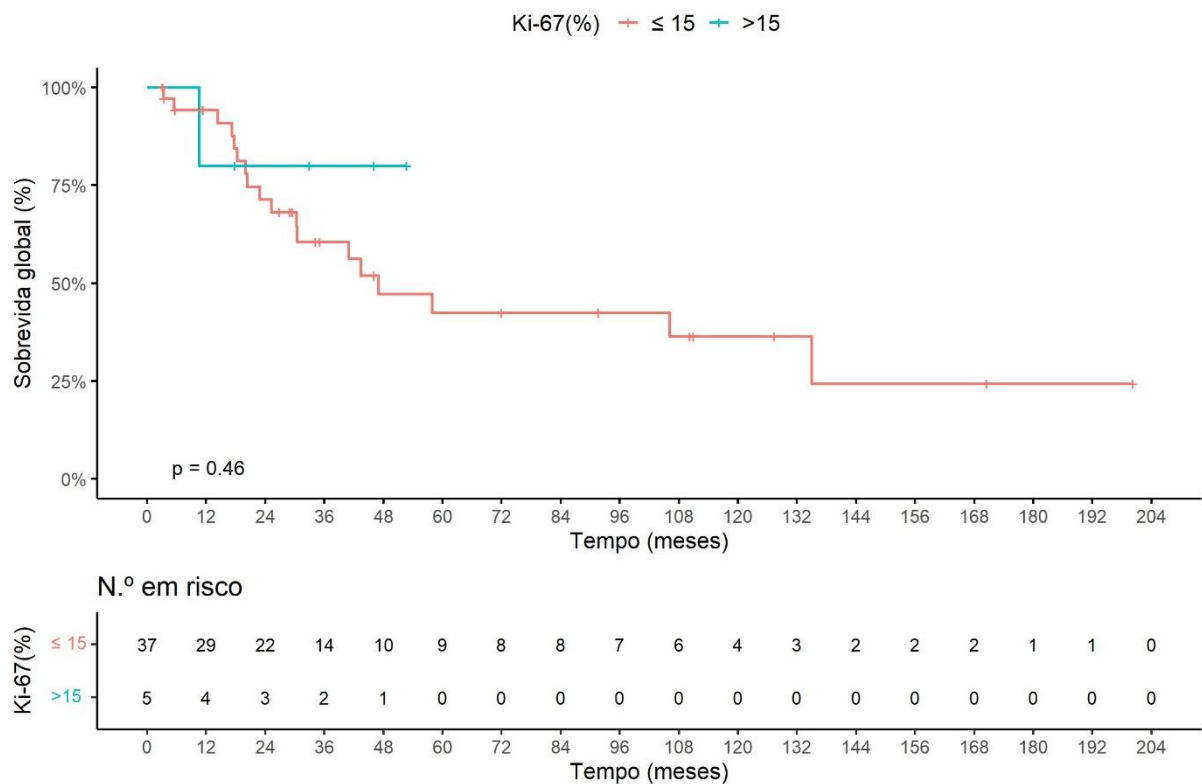
Lâmina de imuno-histoquímica de tecido metastático com marcação de Ki-67. Barra de escala = 100 µm.

5.3 ANÁLISE DE SOBREVIDA

A curva de Kaplan-Meier indica que a SG mediana para $Ki-67 \leq 15\%$ foi de aproximadamente 96 meses, enquanto a sobrevida mediana para $Ki-67 > 15\%$ não foi alcançada no período de acompanhamento (Fig. 6A).

Os pacientes em risco, descritos na Figura 6B abaixo, foram avaliados em intervalos de tempo, sendo que, no início, 37 pacientes estavam no grupo $\leq 15\%$ e 5 no grupo $> 15\%$. Aos 48 meses, 22 pacientes permaneciam no grupo $\leq 15\%$, enquanto apenas 1 paciente restava no grupo $> 15\%$. A partir de 96 meses, o número de pacientes em risco no grupo $> 15\%$ é zero, o que implica que todos os pacientes foram censurados ou tiveram o evento (morte).

Embora o grupo com $Ki-67 > 15\%$ tenha apresentado uma curva de sobrevida global visualmente mais favorável, a ausência de significância estatística ($p = 0,46$) (Fig. 6A) sugere que, dentro desta amostra específica, a expressão de Ki-67 não é um preditor significativo da sobrevida global para pacientes com carcinoma de células renais claras metastáticos.

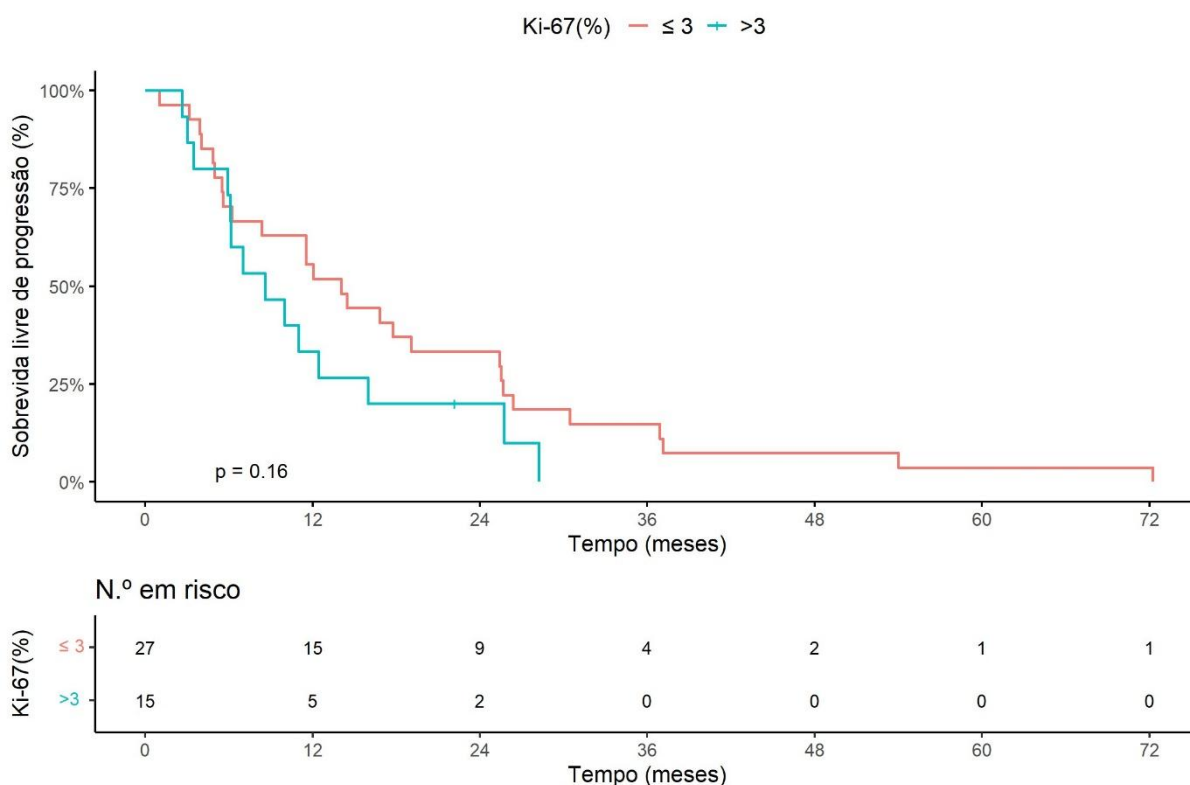


Fonte: Resultados originais da pesquisa.

Figura 6 – Sobrevida global estratificada de acordo com o intervalo de ponto de corte de Ki-67 $\leq 15\%$ e Ki-67 $> 15\%$.

Quanto à SLP, a sobrevida livre de progressão mediana para pacientes com $Ki-67 \leq 3\%$ é de aproximadamente 30 meses, enquanto, para o grupo com $Ki-67 > 3\%$, a SLP mediana é de 18 meses (Fig. 7A).

Os pacientes em risco, descritos na Figura 7B, foram avaliados em diferentes intervalos de tempo. No início do acompanhamento, havia 27 pacientes no grupo $Ki-67 \leq 3\%$ e 15 no grupo $Ki-67 > 3\%$. Após 36 meses, o número de pacientes em risco no grupo $Ki-67 \leq 3\%$ reduziu para 4, enquanto o grupo $Ki-67 > 3\%$ já não possuía pacientes em risco, indicando maior progressão da doença ou censura nesse grupo. O Prognóstico pareceu menos favorável em pacientes com $Ki-67$ mais elevado: pacientes com $Ki-67 > 3\%$ apresentaram uma SLP mais curta em comparação com aqueles com $Ki-67 \leq 3\%$, indicando um potencial maior de agressividade ou menor eficácia do tratamento. No entanto, a ausência de significância estatística ($p = 0,16$) indica que os dados devem ser interpretados com cautela. Apesar da tendência observada, os resultados podem não ser generalizáveis, possivelmente devido ao tamanho reduzido da amostra ou à variabilidade dos dados.



Fonte: Resultados originais da pesquisa.

Figura 7 – Sobrevida livre de progressão estratificada de acordo com o intervalo de ponto de corte de Ki-67 ≤ 3% e Ki-67 > 3%.

Além da avaliação da SG e da SLP por meio das curvas de Kaplan-Meier, as tabelas 5 e 6 apresentam uma análise comparativa da sobrevida global em pacientes, divididos com base nos níveis de expressão do marcador proliferativo Ki-67, em dois grupos: aqueles com Ki-67 ≤ 15% e aqueles com Ki-67 > 15%. O objetivo foi determinar se havia diferenças significativas entre os grupos em relação a diversas variáveis clínicas e demográficas. A análise incluiu variáveis como idade, gênero, realização de nefrectomia, estágios tumorais apresentados na tabela 5 e a presença de diferentes tipos de metástases, conforme mostrado na tabela 6. Os testes estatísticos aplicados avaliam a significância das diferenças observadas.

A média de idade foi similar entre os grupos: 56,31 anos para os pacientes com Ki-67 ≤ 15% e 55,6 anos para aqueles com Ki-67 > 15%. Conforme podemos observar na tabela 5, a mediana da idade foi de 56 anos no grupo com Ki-67 ≤ 15% e 54 anos no grupo com Ki-67 > 15%. O $p = 0,932$ indica que não há diferença estatisticamente significativa na idade entre os grupos, sugerindo que a idade não está correlacionada com a expressão do Ki-67.

No que diz respeito ao gênero, a proporção de pacientes do sexo feminino foi maior no grupo com Ki-67 > 15% (60%) em comparação com o grupo com Ki-67 ≤ 15% (19,2%). Embora essa diferença seja aparente, o $p = 0,072$ indica que ela não é estatisticamente significativa, mas sugere uma possível tendência que poderia ser explorada em estudos com amostras maiores (Tab. 5).

Quanto à realização de nefrectomia, a maioria dos pacientes em ambos os grupos passou por esse procedimento (96,1% no grupo com Ki-67 ≤ 15% e 80% no grupo com Ki-67 > 15%). O $p = 0,249$ sugere que a decisão de realizar nefrectomia não está associada aos níveis de Ki-67, já que não há diferença significativa entre os grupos. Os estágios tumorais também foram analisados, com uma distribuição variada entre os grupos. Observou-se uma ausência de pacientes no estágio 1a no grupo com Ki-67 > 15%. O $p = 0,257$ demonstra que não há diferenças significativas nos estágios tumorais entre os dois grupos, sugerindo que a agressividade do tumor, medida pelos estágios, não está diretamente correlacionada com os níveis de Ki-67 (Tab. 5).

A tabela 6 mostra que a análise da presença de metástases pulmonares revelou uma incidência em aproximadamente 71% dos casos em ambos os grupos, e o $p > 0,999$ indica ausência de diferença estatisticamente significativa. Resultados similares foram encontrados para metástases hepáticas e intra-abdominais, também sem diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,99$). No caso de metástase óssea, observou-se uma maior ocorrência no grupo com Ki-67 > 15% (100%) em comparação com o grupo com Ki-67 ≤ 15% (47,1%). No entanto, o $p = 0,111$ indica que essa diferença não é estatisticamente significativa. A metástase no sistema nervoso central (SNC) foi mais prevalente no grupo com Ki-67 > 15% (40% contra 17,6%), mas essa diferença também não alcançou significância estatística ($p = 0,25$). Outros tipos de metástases, incluindo aquelas em tecidos moles e linfonodais, não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, conforme indicado pelos valores de $p > 0,999$.

A classificação de Heng foi utilizada para avaliar o prognóstico dos pacientes, sendo a maioria dos pacientes em ambos os grupos classificados na categoria intermediária (categoria 2) (Tab. 5). O $p > 0,999$ sugere que não há diferença significativa na classificação prognóstica de Heng entre os grupos de Ki-67, indicando que os níveis de Ki-67 não são preditores independentes de piora na classificação de Heng.

Em resumo, os resultados desta análise sugerem que os níveis de Ki-67 ($> 15\%$ versus $\leq 15\%$) não estão significativamente associados com as variáveis clínicas e demográficas avaliadas, incluindo idade, gênero, realização de nefrectomia, estágios tumorais e a presença de diferentes tipos de metástases. A análise estatística, utilizando testes de Wilcoxon e teste exato de Fisher, reforça a ausência de associações significativas, com todos os valores de p bem acima do nível de significância convencional de 0,05. Isso sugere que o marcador Ki-67, isoladamente, não é um fator determinante para a progressão da doença ou para o prognóstico em relação às variáveis avaliadas.

Tabela 5 - Análise comparativa bivariada da SG em pacientes estratificados com base nos níveis de expressão do marcador proliferativo Ki-67 ($\leq 15\%$ versus $> 15\%$): idade, gênero, nefrectomia e estágios tumorais

Ki-67 Sobrevida Global				
Variável	Total, n = 57	≤ 15 , n = 52	> 15 , n = 5	valor de p
idade				0.932
Mediana (IQR)	56.00 (50.00, 63.00)	56.00 (50.00, 63.00)	54.00 (51.00, 64.00)	
Range	35.00, 83.00	37.00, 83.00	35.00, 74.00	
Gênero, n (%)				0.072
Fem	13 (22.8)	10 (19.2)	3 (60.0)	
Masc	44 (77.2)	42 (80.8)	2 (40.0)	
Nefrectomia, n (%)				0.249
Sim	53 (94.6)	49 (96.1)	4 (80.0)	
Não	3 (5.4)	2 (3.9)	1 (20.0)	
Ausência de dados	1	1	0	
t, n (%)				0.257
1a	6 (16.7)	6 (17.6)	0 (0.0)	
1b	9 (25.0)	9 (26.5)	0 (0.0)	
2a	5 (13.9)	4 (11.8)	1 (50.0)	
2b	1 (2.8)	1 (2.9)	0 (0.0)	
3a	8 (22.1)	8 (23.5)	0 (0.0)	
3b	2 (5.6)	2 (5.9)	0 (0.0)	
4	5 (13.9)	4 (11.8)	1 (50.0)	
Ausência de dados	21	18	3	
n, n (%)				0.333
0	3 (16.67)	3 (17.6)	0 (0.0)	
1	3 (16.67)	2 (11.8)	1 (100.0)	
2	12 (66.67)	12 (70.6)	0 (0.0)	
Ausência de dados	39	35	4	

1 Wilcoxon rank sum test; Fisher's exact test

Fonte: Resultados originais da pesquisa.

Tabela 6 - Análise comparativa bivariada da SG em pacientes estratificados com base nos níveis de expressão do marcador proliferativo Ki-67 ($\leq 15\%$ versus $> 15\%$): presença de metástases e classificação de Heng

Ki-67 Sobrevida Global				
Variável	Total, n = 57	≤ 15, n = 52	> 15, n = 5	valor de p
Metástase Pulmonar, n (%)				>0.999
Sim	39 (70.9)	36 (70.6)	3 (75.0)	
Não	16 (29.1)	15 (29.4)	1 (25.0)	
Missing	2	1	1	
Metástase Hepática, n (%)				>0.999
Sim	15 (26.8)	14 (27.4)	1 (20.0)	
Não	41 (73.2)	37 (72.6)	4 (80.0)	
Ausência de dados	1	1	0	
Metástase óssea, n (%)				0.111
Sim	28 (50.9)	24 (47.1)	4 (100.0)	
Não	27 (49.1)	27 (52.9)	0 (0.0)	
Ausência de dados	2	1	1	
Metástase Sistema Nervoso Central, n (%)				0.251
Sim	11 (19.6)	9 (17.6)	2 (40.0)	
Não	45 (80.4)	42 (82.4)	3 (60.0)	
Ausência de dados	1	1	0	
Metástase Intraabdominal, n (%)				>0.999
Sim	15 (26.8)	14 (27.4)	1 (20.0)	
Não	41 (73.2)	37 (72.6)	4 (80.0)	
Ausência de dados	1	1	0	
Metástase em tecidos moles, n (%)				>0.999
Sim	8 (14.3)	8 (15.7)	0 (0.0)	
Não	48 (85.7)	43 (84.3)	5 (100.0)	
Ausência de dados	1	1	0	
Metástase Linfonodal, n (%)				>0.999
Sim	19 (33.3)	17 (32.7)	2 (40.0)	
Não	38 (66.7)	35 (67.3)	3 (60.0)	
Outras metástases, n (%)				>0.999

Sim	14 (24.6)	13 (25.0)	1 (20.0)
Não	43 (75.4)	39 (75.0)	4 (80.0)
Classificação de Heng, n (%)	>0.999		
1	10 (18.9)	9 (18.7)	1 (20.0)
2	35 (66.0)	32 (66.7)	3 (60.0)
3	8 (15.1)	7 (14.6)	1 (20.0)
Ausência de dados	4	4	0
1 Wilcoxon rank sum test; Fisher's exact test			

As tabelas 7 e 8 mostram a associação entre a expressão do marcador proliferativo Ki-67 e a SLP em pacientes, divididos em três grupos de acordo com os níveis de Ki-67: < 3% (n = 40), > 3% (n = 17), e um grupo total (n = 57). As variáveis analisadas incluem idade, gênero, ocorrência de nefrectomia, estágio tumoral (t), classificação de nódulos (N), apresentados na tabela 7 e presença de metástases em diferentes locais, e classificação de heng conforme mostrado na tabela 8. A significância estatística das diferenças entre os grupos é avaliada usando testes de Wilcoxon, teste exato de Fisher e o teste qui-quadrado de Pearson.

Na análise da idade, a média foi de 57,08 anos para pacientes com Ki-67 < 3% e 54,29 anos para aqueles com Ki-67 > 3%. Conforme podemos observar na tabela 7, as medianas foram de 57 anos para o grupo com Ki-67 < 3% e 54 anos para o grupo com Ki-67 > 3%. O p = 0,417 sugere que não há diferença estatisticamente significativa na idade entre os grupos, indicando que a idade não está correlacionada com a expressão do Ki-67 em relação à SLP. Em relação ao gênero, 17,50% dos pacientes com Ki-67 < 3% eram do sexo feminino, enquanto 35,29% dos pacientes com Ki-67 > 3% eram do sexo feminino. O p = 0,176 indica que a diferença na distribuição de gênero entre os grupos não é estatisticamente significativa.

No que diz respeito à ocorrência de nefrectomia, 97,44% dos pacientes com Ki-67 < 3% e 88,24% dos pacientes com Ki-67 > 3% realizaram o procedimento. O p = 0,216 não indica significância estatística, sugerindo que a realização de nefrectomia não está associada aos níveis de Ki-67 nos pacientes avaliados. Quanto aos estágios tumorais (t), a variação entre os grupos não resultou em diferença estatisticamente significativa, com um p = 0,754 (Tab. 7). Isso sugere que a progressão do tumor, conforme classificada pelos estágios, não está diretamente correlacionada com os níveis de Ki-67.

A classificação de nódulos linfáticos mostrou resultados variados, mas sem diferença significativa, com p = 0,496. Em relação às metástases, a metástase pulmonar foi observada

em 66,67% dos pacientes com Ki-67 < 3% e em 81,25% dos pacientes com Ki-67 > 3%, mas essa diferença não é estatisticamente significativa ($p = 0,344$). A metástase hepática ocorreu em 25,64% dos pacientes com Ki-67 < 3% e em 29,41% dos com Ki-67 > 3%, com um $p = 0,755$, indicando que a diferença não é significativa. A metástase óssea mostrou presença em 48,72% dos pacientes com Ki-67 < 3% e em 56,25% dos com Ki-67 > 3%, mas o $p = 0,612$ indica que essa diferença também não é estatisticamente significativa (Tab. 7).

Para metástase no sistema nervoso central (SNC), 15,38% dos pacientes com Ki-67 < 3% e 29,41% dos pacientes com Ki-67 > 3% apresentaram essa condição. O $p = 0,280$ sugere ausência de significância estatística. A metástase intra-abdominal foi observada em 20,77% dos pacientes com Ki-67 < 3% e 17,65% dos pacientes com Ki-67 > 3%, com um $p = 0,618$, novamente indicando ausência de significância estatística (Tab. 8).

No entanto, diferenças significativas foram observadas em metástases em tecido mole e linfonodal. A metástase em tecido mole foi significativamente mais frequente em pacientes com Ki-67 > 3% ($p = 0,047$), indicando uma possível associação entre a alta expressão de Ki-67 e a presença de metástase em tecido mole. De forma semelhante, a metástase linfonodal mostrou uma associação significativa com níveis elevados de Ki-67, evidenciada por um $p = 0,041$. A classificação de Heng, que avalia o prognóstico dos pacientes, revelou que não há diferença significativa entre os grupos de Ki-67 ($p = 0,750$) (Tab. 8), indicando que a expressão de Ki-67 não é um preditor independente de um prognóstico pior, conforme avaliado por essa classificação.

Em resumo, a análise indica que, enquanto a expressão do Ki-67 não está significativamente associada com a maioria das variáveis clínicas e demográficas, níveis mais elevados de Ki-67 (> 3%) podem estar associados a uma maior frequência de metástases em tecido mole e linfonodos. Esses achados sugerem que a expressão elevada de Ki-67 pode ser um indicativo de maior agressividade em certos aspectos da progressão do câncer, embora a ausência de significância estatística em outras variáveis-chave sugira que Ki-67, isoladamente, pode não ser um preditor abrangente para todos os desfechos clínicos avaliados.

Tabela 7 - Análise comparativa bivariada, da SLP em pacientes estratificados com base nos níveis de expressão do marcador proliferativo Ki-67 ($\leq 3\%$ versus $> 3\%$): idade, gênero, nefrectomia e estágios tumorais

Ki-67 SLP				
Variável	Total, n = 57	$\leq 3\%$, n = 40	$> 3\%$, n = 17	valor de p
idade				0.417
Mediana (IQR)	56.00 (50.00, 63.00)	56.00 (50.75, 63.00)	54.00 (44.00, 64.00)	
Range	35.00, 83.00	37.00, 83.00	35.00, 74.00	
Gênero, n (%)				0.176
Fem	13 (22.8)	7 (17.5)	6 (35.3)	
Masc	44 (77.2)	33 (82.5)	11 (64.7)	
Nefrectomia, n (%)				0.216
Sim	53 (94.6)	38 (97.4)	15 (88.2)	
Não	3 (5.4)	1 (2.6)	2 (11.8)	
Dados ausentes	1	1	0	
t, n (%)				0.754
1a	6 (16.7)	5 (20.0)	1 (9.09)	
1b	9 (25.0)	6 (24.0)	3 (27.27)	
2a	5 (13.9)	2 (8.0)	3 (27.27)	
2b	1 (2.8)	1 (4.0)	0 (0.00)	
3a	8 (22.1)	5 (20.0)	3 (27.27)	
3b	2 (5.6)	2 (8.0)	0 (0.00)	
4	5 (13.9)	4 (16.0)	1 (9.09)	
Dados ausentes	21	15	6	
n, n (%)				0.496
0	3 (16.67)	3 (27.3)	0 (0.0)	
1	3 (16.67)	2 (18.2)	1 (14.3)	
2	12 (66.67)	6 (54.5)	6 (85.7)	
Dados ausentes	39	29	10	

1 Wilcoxon rank sum test; Fisher's exact test; Pearson's Chi-squared test

Fonte: Resultados originais da pesquisa.

Tabela 8 - Análise comparativa bivariada, da SLP em pacientes estratificados com base nos níveis de expressão do marcador proliferativo Ki-67 ($\leq 3\%$ versus $> 3\%$): (%): presença de metástases e classificação de Heng

Ki-67 SLP				
Variável	Total, n = 57	$\leq 3\%$, n = 40	$> 3\%$, n = 17	p-valor ¹
Metástase Pulmonar, n (%)				0.344
Sim	39 (70.9)	26 (66.7)	13 (81.2)	
Não	16 (29.1)	13 (33.3)	3 (18.8)	
Dados ausentes	2	1	1	
Metástase Hepática, n (%)				0.755
Sim	15 (26.8)	10 (25.6)	5 (29.4)	
Não	41 (73.2)	29 (74.4)	12 (70.6)	
Dados ausentes	1	1	0	
Metástase óssea, n (%)				0.612
Sim	28 (50.9)	19 (48.7)	9 (56.2)	
Não	27 (49.1)	20 (51.3)	7 (43.8)	
Dados ausentes	2	1	1	
Metástase Sistema Nervoso Central, n (%)				0.280
Sim	11 (19.6)	6 (15.4)	5 (29.4)	
Não	45 (80.4)	33 (84.6)	12 (70.6)	
Dados ausentes	1	1	0	
Metástase Intraabdominal, n (%)				0.513
Sim	15 (26.8)	12 (30.8)	3 (17.6)	
Não	41 (73.2)	27 (69.2)	14 (82.4)	
Dados ausentes	1	1	0	
Metástase em tecido mole, n (%)				0.047
Sim	8 (14.3)	3 (7.7)	5 (29.4)	
Não	48 (85.7)	36 (92.3)	12 (70.6)	
Missing	1	1	0	
Metástase Linfonodal, n (%)				0.041
Sim	19 (33.3)	10 (25.0)	9 (52.9)	
Não	38 (66.7)	30 (75.0)	8 (47.1)	
Outras metástases, n (%)				0.738

Sim	14 (24.6)	9 (22.5)	5 (29.4)
Não	43 (75.4)	31 (77.5)	12 (70.6)
Classificação de Heng, n (%)			0.750
1	10 (18.9)	8 (21.6)	2 (12.5)
2	35 (66.0)	24 (64.9)	11 (68.7)
3	8 (15.1)	5 (13.5)	3 (18.8)
Dados ausentes	4	3	1
1 Wilcoxon rank sum test; Fisher's exact test; Pearson's Chi-squared test			

6. DISCUSSÃO

Considerando o potencial do biomarcador Ki-67 para associar-se a resultados de vários tipos de câncer, houve muitos estudos publicados explorando Ki-67 e sua correlação com sobrevida livre de doença e sobrevida global.

No entanto, é impossível comparar os resultados desses vários estudos entre si (GOWN et al. 2023), conforme demonstrado em uma meta-análise de 46 estudos publicados anteriormente envolvendo um total de 12.155 pacientes (DE AZAMBUJA et al 2007).

Para a dicotomização dos índices de Ki-67 em "alto" e "baixo", uma fração substancial dos estudos não encontrou uma associação de índices de Ki-67 "altos" (variando de 5% a 32%) com resultados piores, mas, na medida em que todos os autores selecionaram seus próprios pontos de corte para separar Ki-67 "alto" de "baixo", nenhuma comparação entre os 46 estudos pôde ser feita (GOWN et al. 2023).

Em outra meta-análise baseada em 25 estudos com um total de 64.196 pacientes, os autores foram novamente capazes de demonstrar um valor prognóstico modesto para Ki-67 “alto” versus “baixo” (PETRELLI et al. 2015).

Em outro grande estudo de uma única coorte, envolvendo 3.658 pacientes, quando ajustado para idade, menopausa, tamanho do tumor, estado linfonodal, histologia, grau, invasão linfática, invasão vascular, estado do receptor hormonal e estado do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), o índice Ki-67 foi prognóstico quanto ao resultado clínico; no entanto, descobriu-se que essa relação era não linear (INWALD et al. 2013).

Apesar de todo o desafio mencionado acima, a falta de padronização de metodologias para avaliação do índice Ki-67, pôde ser minimizada em relação às avaliações de Ki-67 relacionada ao Câncer de Mama. Em 2009, foi estabelecido o *International ki-67 no Breast Cancer Working Group (IKBCWG)*, com a missão de abordar a falta de padronização das várias metodologias de avaliação do Ki-67 no câncer de mama, incluindo todas as variáveis pré-analíticas e analíticas. Além disso, o IKBCWG esperava fornecer um repositório centralizado para manter a comunidade de patologia informada sobre a pesquisa atual relacionada ao Ki-67, bem como a prática clínica envolvendo o Ki 67.

Pelo fato de não haver algo semelhante ou recomendações específicas para outros tipos de câncer, incluindo o câncer renal, nossa realidade foi a utilização das metodologias e

avaliações disponíveis em nossa instituição para a realização desse trabalho (já descritas anteriormente), além da própria avaliação, baseando-se em análise estatística, e de acordo com as amostras, determinando pontos de corte para identificação e separação do Ki-67 considerado alto ou baixo. Os resultados sugerem que o Ki-67 pode ser um componente de um painel prognóstico mais amplo, mas sua utilidade prognóstica isolada é limitada.

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas ao interpretar os resultados:

- **Tamanho da Amostra:** o tamanho limitado da amostra pode ter impactado a capacidade de detectar diferenças estatisticamente significativas. Estudos com amostras maiores são necessários para validar os achados.
- **Seguimento Limitado:** apesar de um acompanhamento de longo prazo para alguns pacientes, o número de eventos pode não ter sido suficiente para alcançar significância estatística em algumas análises.
- **Fatores Confundidores:** variáveis clínicas adicionais, exposição à tratamentos, comorbidades, dentre outros fatores, não foram completamente controladas, o que pode influenciar os resultados observados.

Apesar das limitações mencionadas, alguns pontos fortes devem ser mencionados:

- **Análise Detalhada de Várias Variáveis Clínicas e Demográficas:** O estudo abrange uma análise abrangente e detalhada de diversas variáveis clínicas e demográficas, incluindo idade, gênero, realização de nefrectomia, estágios tumorais e presença de metástases. Isso permite uma visão mais completa da possível correlação entre essas variáveis e a expressão do Ki-67, o que é valioso para um entendimento mais profundo do perfil dos pacientes com carcinoma de células renais claras metastáticos.
- **Identificação de Tendências Relevantes para Pesquisa Futura:** Embora a expressão do Ki-67 não tenha mostrado associações significativas em muitas variáveis, o estudo identificou tendências interessantes, como a possível associação entre níveis elevados de Ki-67 e maior frequência de metástases em tecido mole e linfonodos. Esses achados sugerem direções importantes para investigações futuras, o que pode aprimorar o entendimento do Ki-67 como marcador prognóstico.

Um possível direcionamento para o futuro, a fim de fortalecer a evidência sobre o papel do Ki-67 como biomarcador prognóstico em carcinoma de células renais claras metastáticos, seria:

- Estudos futuros devem incluir tamanhos de amostra maiores e seguir um desenho prospectivo, para aumentar o poder estatístico e minimizar vieses.
- A inclusão de outros biomarcadores moleculares e a avaliação de sua interação com o Ki-67 podem oferecer uma perspectiva mais completa do comportamento tumoral.
- Mais análises multivariadas que incorporem fatores clínicos, como estadiamento do tumor, tratamento recebido, e comorbidades, serão essenciais para entender melhor a influência isolada do Ki-67.

No presente trabalho, embora as diferenças observadas na SG e na SLP sugiram que o Ki-67 possa ter algum valor prognóstico, especialmente em relação à SLP, a ausência de significância estatística ressalta a necessidade de cautela ao usar o Ki-67 como biomarcador isolado na prática clínica.

7. CONCLUSÃO

Embora os resultados deste estudo sugiram uma tendência de pior sobrevida em pacientes com maior expressão de Ki-67, a ausência de significância estatística, tanto para sobrevida global (SG) quanto para sobrevida livre de progressão (SLP), destaca a necessidade de investigações adicionais. Embora o Ki-67 continue sendo um marcador valioso na avaliação do comportamento tumoral, como evidenciado em outros tipos de câncer, como o câncer de mama, seu papel prognóstico no carcinoma de células renais claras metastático ainda precisa ser mais bem definido. A confirmação de seu valor prognóstico dependerá de estudos mais robustos, específicos e com populações maiores.

REFERÊNCIAS

Atkins MB, Tannir NM. Current and emerging therapies for first-line treatment of metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Treat Rev*. 2018 Nov;70:127–37.

Bex A, Mulders P, Jewett M, Wagstaff J, van Thienen JV, Blank CU, et al. Comparison of immediate vs deferred cytoreductive nephrectomy in patients with synchronous metastatic renal cell carcinoma receiving Sunitinib. *JAMA Oncology* [Internet]. 2019 Feb 1;5(2):164. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/article-abstract/2718007>

Capitanio U, Bensalah K, Bex A, Boorjian SA, Bray F, Coleman J, et al. Epidemiology of renal cell carcinoma. *Eur Uro*. 2019 Jan;75(1):74–84.

Chandrasekar T, Klaassen Z, Goldberg H, Kulkarni GS, Hamilton RJ, Fleshner N. Metastatic renal cell carcinoma: patterns and predictors of metastases—a contemporary population-based series. *Urologic Oncology-seminars and Original Investigations*. 2017 Nov 1;35(11):661.e7–14.

De Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart-Gebhart MJ, Paesmans M. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007 May 21;96(10):1504-13.

Cox DR. Regression models and life-tables. *J. R. Stat. Soc. B* 34. 1972; pp. 187–220.

Esterberg E, Iyer S, Nagar SP, Davis KL, Tannir NM. Real-world treatment patterns and clinical outcomes among patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* [Internet]. 2023 Oct 6; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1558767323002203>

Flanigan RC, Salmon SE, Blumenstein BA, Bearman SI, Roy V, McGrath PC, et al. Nephrectomy followed by interferon alfa-2b compared with interferon alfa-2b alone for metastatic renal-cell cancer. *N Engl J Med*. 2001 Dec 6;345(23):1655–9.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983 Jan 15;31(1):13–20.

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012 Mar 8;366(10):883–92.

Gown AM. The Biomarker Ki-67: Promise, Potential, and Problems in Breast Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2023 Aug 1;31(7):478-484.

Grambsch PM, Therneau TM. Proportional hazards tests and diagnostics based on weighted residuals. *Biometrika* 1994;81:515-526.

Heng DYC, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, 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: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* [Internet]. 2009 Dec 1;27(34):5794–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19826129/>

Henriques W, Aline Fusco Fares, Bezerra SM, Mariana Andozia Morini, Alencar L, Diego Abreu Clavijo, et al. Loss of BAP1 expression in metastatic tumor tissue is an event of poor prognosis in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2019 Jan 1;37(1):78–85.

Henriques W, Rafael Malagoli Rocha, da W, Paulo F, Gustavo Cardoso Guimarães, de S. CD133 immunohistochemical expression predicts progression and cancer-related death in renal cell carcinoma. *World Journal of Urology*. 2011 Oct 4;30(4):553–8.

Henriques W, da W, Aline Fusco Fares, Bezerra SM, Shultz L, Diego Abreu Clavijo, et al. Prognostic impact of concomitant loss of PBRM1 and BAP1 protein expression in early stages of clear cell renal cell carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2018 May 1;36(5):243.e1–8.

Henriques W, Aline Fusco Fares, Bezerra SM, Mariana Andozia Morini, Alencar L, Diego Abreu Clavijo, et al. Loss of BAP1 expression in metastatic tumor tissue is an event of poor prognosis in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2019 Jan 1;37(1):78–85.

Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, et al. Renal cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 2017 Mar 9;3(1). Available from: <https://www.nature.com/articles/nrdp20179>

Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstadter F, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139:539–552.

Klatte T, Rossi SH, Stewart GD. Prognostic factors and prognostic models for renal cell carcinoma: a literature review. *World J Urol*. 2018 Apr 30;36(12):1943–52.

Lausen B, Schumacher M. Maximally Selected Rank Statistics. *Biometrics*. 1992;48:73

Li Y, Lih TSM, Dhanasekaran SM, Mannan R, Chen L, Cieslik M, et al. Histopathologic and proteogenomic heterogeneity reveals features of clear cell renal cell carcinoma aggressiveness. *Cancer cell*. 2023 Jan 1;41(1):139-163.e17.

Lu Y, Song Y, Xu Y, Ou N, Liang Z, Hu R, et al. The prevalence and prognostic and clinicopathological value of PD-L1 and PD-L2 in renal cell carcinoma patients: a systematic review and meta-analysis involving 3,389 patients. *Transl Androl Urol*. 2020 Apr;9(2):367–81.

Luo Y, Daniel Xin Zhang, Mo M, Tan Z, Huang L, Zhou H, et al. High Ki-67 Immunohistochemical reactivity correlates with poor prognosis in bladder carcinoma. *Medicine*. 2016 Apr 1;95(15):e3337–7.

Méjean A, Ravaud A, Thezenas S, Colas S, Beauval JB, Bensalah K, et al. Sunitinib alone or after nephrectomy in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2018 Aug 2;379(5):417–27.

Mickisch G, Garin A, van Poppel H, de Prijck L, Sylvester R. Radical nephrectomy plus interferon-alfa-based immunotherapy compared with interferon alfa alone in metastatic renal-cell carcinoma: a randomised trial. *The Lancet*. 2001 Sep;358(9286):966–70.

Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs—part A: renal, penile, and testicular tumours. *Eur Urol*. 2016 Jul;70(1):93–105.

Mohanty SK, Lobo A, Cheng L. The 2022 revision of the World Health Organization classification of tumors of the urinary system and male genital organs: advances and challenges. *Human Pathology*. 2022 Sep;

Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 1996 Sep 19;335(12):865–75.

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 Aug;17(8):2530–0.

Nielsen TO, Leung SCY, Rimm DL, Dodson A, Acs B, Badve S, et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2021 Dec 28;113(7).

Petrelli F, Viale G, Cabiddu M, Barni S. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Oct;153(3):477-91.

R Core Team (2024). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Sheela Devi CS, Suchitha S, Veerendrasagar RS. Evaluation of nuclear morphometry and Ki-67 index in clear cell renal cell carcinomas: a five-year study. *Iran J Pathol* [Internet]. 2017;12(2):150-7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5831071/>

Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023 Jan 12;73(1):17–48.

Soares A, Sabino F, Trindade KM, Adriano Gonçalves e Silva, Ana Paula C, André Deeke Sasse, et al. Advanced renal cell carcinoma management: The Latin American Cooperative Oncology Group (LACOG) and the Latin American Renal Cancer Group (LARCG) consensus update. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2024 150:183.

Wang Z, Xie H, Guo L, Cai Q, Shang Z, Jiang N, et al. Prognostic and clinicopathological value of Ki-67/MIB-1 expression in renal cell carcinoma: a meta-analysis based on 4579 individuals. *Cancer Manag Res*. 2017 Nov;Volume 9:679–89.

Xie Y, Chen L, Ma X, Li H, Gu L, Gao Y, et al. Prognostic and clinicopathological role of high Ki-67 expression in patients with renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2017 Mar 13;7(1).

Yang C, Zhang J, Ding M, Xu K, Li L, Mao L, et al. Ki67 targeted strategies for cancer therapy. *Clin Transl Oncol*. 2017 Oct 20;20(5):570–5.

ANEXO A – FORMULÁRIO DE COLETA DE INFORMAÇÕES CLÍNICAS

Tabela 1 - Formulário de coleta de informações clínicas.

Identificação do paciente:	
() SUS	
() Sistema de saúde suplementar. Plano de saúde:	
RGH:	Data de nascimento:
Gênero:	Data de óbito:
Data do diagnóstico:	Data da detecção da metástase:
Data do último follow-up:	Status do último follow-up:
Fez tratamento sistêmico: () Sim () Não	Tempo entre diagnóstico e início de tratamento:
Nefrectomia: () Sim () Não	
2010 AJCC T Stage:	2010 AJCC N Stage:
Estadiamento clínico: 1. I 2. II 3. III 4. IV	
Grau ISUP: 1. I 2. II 3. III 4. IV	
Sítios metastáticos: 1. Pulmão 2. Ossos 3. Fígado	

4. Sistema Nervoso Central 5. Linfonodos 6. Tecido Mole 88. Outros 99. Desconhecido 0. N/A
Primeira linha de terapia sistêmica: 1. Sunitinibe 2. Sorafenibe 3. Pazopanibe 4. Temsirolimo 5. Interferon 6. Interferon + bev 7. Interleucina 8. Everolimo 9. Axitinibe 10. Nivolumabe 11. Cabozantinibe 12. Everolimo + lenvatinibe 13. Ipilimumabe + nivolumabe 88. Outro 99. Desconhecido 0. N/A Início de tratamento: Final de tratamento: Melhor resposta ao tratamento: 1. Resposta parcial 2. Resposta completa 3. Doença estável 4. Progressão de doença
Segunda linha de terapia sistêmica:

1. Sunitinibe

2. Sorafenibe

3. Pazopanibe

4. Temsirolimo

5. Interferon

6. Interferon + bev

7. Interleucina

8. Everolimo

9. Axitinibe

10. Nivolumabe

11. Cabozantinibe

12. Everolimo + lenvatinibe

13. Ipilimumabe + nivolumabe

88. Outro

99. Desconhecido

0. N/A

Início de tratamento:

Final de tratamento:

Melhor resposta ao tratamento:

1. Resposta parcial

2. Resposta completa

3. Doença estável

4. Progressão de doença

Terceira linha de terapia sistêmica:

1. Sunitinibe

2. Sorafenibe

3. Pazopanibe

4. Temsirolimo

5. Interferon

6. Interferon + bev

7. Interleucina

8. Everolimo

9. Axitinibe

10. Nivolumabe

11. Cabozantinibe

12. Everolimo + lenvatinibe

13. Ipilimumabe + nivolumabe

88. Outro

99. Desconhecido

0. N/A

Início de tratamento:

Final de tratamento:

Melhor resposta ao tratamento:

1. Resposta parcial

2. Resposta completa

3. Doença estável

4. Progressão de doença

Quarta linha de terapia sistêmica:

1. Sunitinibe

2. Sorafenibe

3. Pazopanibe

4. Temsirolimo

5. Interferon

6. Interferon + bev

7. Interleucina

8. Everolimo

9. Axitinibe

10. Nivolumabe

11. Cabozantinibe

12. Everolimo + lenvatinibe

13. Ipilimumabe + nivolumabe

88. Outro

99. Desconhecido 0. N/A Início de tratamento: Final de tratamento: Melhor resposta ao tratamento: 1. Resposta parcial 2. Resposta completa 3. Doença estável 4. Progressão de doença
Fatores de risco: 1. Anemia 2. Hipercalcemia 3. Trombocitose > 450.000 plaquetas/μL 4. Neutrófilo > 4500 5. KPS < 80% 6. Tempo de diagnóstico ao tratamento < 1 ano 7. Lactato desidrogenase > 450 U/L
Grupo prognóstico IMDC – International Metastatic Renal Cancer Database Consortium 1- Bom (0 factor) 2- Intermediário 3- Pobre (≥ 3) MSKCC – Memorial Sloan Kettering Cancer Center