

**ESTUDO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA E DO VALOR  
PROGNÓSTICO DE SINTASES DO ÓXIDO NÍTRICO (NOS),  
METALOPROTEINASES DA MATRIZ EXTRACELULAR (MMP),  
FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF),  
CADERINA E, DENSIDADE DE MICROVASOS (DMV) E DA  
DENSIDADE DE VASOS LINFÁTICOS (DVL) EM PACIENTES  
PORTADORES DE CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS**

**STÊNIO DE CÁSSIO ZEQUI**

**Tese de Doutorado apresentada à Fundação  
Antônio Prudente para a obtenção do Grau de  
Doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientador: Prof. Dr. Ademar Lopes**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto  
Soares**

**São Paulo**

**2008**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Zequi, Stênio de Cássio

**Estudo da expressão imunoistoquímica e do valor prognóstico de sintases do óxido nítrico (NOS), metaloproteinases da matriz extracelular (MMP), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), caderina e, densidade de microvasos (DMV) e da densidade de vasos linfáticos (DVL) em pacientes portadores de carcinoma de células renais / Stênio de Cássio Zequi – São Paulo, 2008.**

201p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Ademar Lopes.

Descritores: 1. CÂNCER RENAL. 2. PROGNÓSTICO. 3. ÓXIDO NÍTRICO SINTASE. 4. IMUNOHISTOQUÍMICA. 5. FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR. 6. METALOPROTEINASES. 7. CADERINA-E. 8. ANGIOGÊNESE PATOLÓGICA. 9. ANÁLISE MULTIVARIADA..

## RESUMO

Zequi SC. **Estudo da expressão imunoistoquímica e do valor prognóstico de sintases do óxido nítrico (NOS), metaloproteinases da matriz extracelular (MMP), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), caderina e, densidade de microvasos (DMV) e da densidade de vasos linfáticos (DVL) em pacientes portadores de carcinoma de células renais.** São Paulo; 2008. [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente].

**Introdução:** O carcinoma de células renais (CCR) é neoplasia altamente letal, com evolução incerta. Novos fatores prognósticos biomoleculares em CCR são necessários. Em 110 pacientes com CCR, os autores avaliaram das expressões imunoistoquímicas das Sintases do óxido nítrico (NOS-1, NOS-2, NOS-3), das Metaloproteases da matriz extracelular tipos 2 e 9 (MMP2 e MMP9), da Caderina E, do Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) além da densidade de microvasos (DMV) e da densidade de vasos linfáticos (DVL) e seus impactos prognósticos na sobrevida global (SG) e na Sobrevida livre de doença (SLD) em 5 anos e os compararam com fatores clínico-patológicos. Além disso, propuseram um Modelo Multivariado Hierárquico (MMH) para prever falha da doença (recidiva ou progressão) ou morte. **Casuística e Métodos:** Dados epidemiológicos clínicos e patológicos foram coletados. Empregaram-se classificações de performance status da Eastern Cooperative Oncologic Group (ECOG), Karnofsky Performance Status (KPS) e a classificação da American Society of Anesthesiology (ASA). Havia 16 pacientes com metástases ao diagnóstico. Foi empregada Técnica do Tissue Microarray e imunoistoquímica (protocolo:estreptoavidina biotina-peoxidase). Para leitura, utilizou-se microscopia digital (programa ACIS III). A partir da análise univariada, criou-se um Modelo Multivariado Hierárquico (MMH), que submetido à análise multivariada, permitiu a elaboração de um escore com as variáveis

prognósticas mais significativas para SG e SLD. **Resultados:** Na análise univariada, dentre os marcadores biomoleculares, apenas a NOS-3 ( $p=0,047$ ) e DMV ( $p=0,052$ ) tiveram impacto na SG. A expressão da NOS-3 esteve correlacionada diretamente com a probabilidade de SG aos 5 anos, sendo que pacientes com baixa expressão tiveram SG de 79% versus 58,1% para os pacientes com alta expressão. A DMV manteve correlação direta com as taxas de SG, os pacientes com DMV elevada tiveram maiores taxas de SG (79,9%) que pacientes com baixa DMV (58%). A Caderina E, o VEGF, a MMP-2, a MMP-9 e DVL não tiveram impacto nas taxas de SG e SLD ( $p>0,05$ ) Todas as NOS (NOS-1, NOS-2 e NOS-3) estiveram diretamente correlacionadas com tamanho tumoral, sendo que pacientes com baixa expressão das NOS tiveram tumores entre 2,0 a 3,0 cm menores que os pacientes com alta expressão das NOS. A alta expressão da NOS-3 se correlacionou com um elevado índice de metástases linfonodais (31% versus 9,7%,  $p=0,029$ ), com invasão de pélvis renal e ureter (16% versus 3,3%,  $p=0,0041$ ) e com a realização de mais nefrectomias radicais (88% dos casos, versus 63,3%,  $p=0,003$ ) em comparação aos pacientes com baixa expressão. As altas expressões da MMP-2 e da MMP-9 se correlacionaram com tumores de alto grau ( $p=0,046$  e  $p=0,009$ , respectivamente) e com tipos histológicos não células claras ( $p=0,029$  e  $p=0,009$ , respectivamente). Na análise multivariada de SG, permaneceram como fatores prognósticos significativos para elaboração do escore do MMH: o estadiamento clínico TNM (HR=4,5), o grau (HR=2,9), O KPS (HR=2,5), a ocorrência de progressão (HR = 5,3) e/ou recidiva (HR= 6,5) após a nefrectomia, todos ajustados pela idade (HR=1,1). O escore do MMH variou de 0 a 7 pontos. Nenhum paciente com 0 ponto e todos com 7 pontos morreu. A probabilidade de estar vivo para os escores 0,1-2, 3-4, 5-7 foi respectivamente de (100%, 83,5%, 53,5 e 13,5%). Na análise univariada de SLD para os 94 pacientes sem metástases, nenhum marcador biomolecular teve impacto significativo ( $p>0,05$ ). Na análise multivariada para SLD, apenas o estágio Clínico foi fator independente. O estágio III (ajustado pelo estágio I) teve HR de 9,5 vezes para recidiva. **Conclusão:** Fatores clínicos

usuais permaneceram como os fatores preditivos mais significativos em CCR e permitiram a elaboração de um escore prognóstico, no qual pacientes com mais de 4 pontos tiveram chance de óbito de mais de 50%. Este escore deve ser testado em outras casuísticas. Futuros estudos sobre as correlações da NOS-3 e seu papel prognóstico no CCR devem ser realizados.

## SUMMARY

Zequi SC. **Estudo da expressão imunoistoquímica e do valor prognóstico de sintases do óxido nítrico (NOS), metaloproteinases da matriz extracelular (MMP), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), caderina e, densidade de microvasos (DMV) e da densidade de vasos linfáticos (DVL) em pacientes portadores de carcinoma de células renais.** São Paulo; 2008. [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente].

**Introduction:** Renal cell carcinoma (RCC) is a tumor with high mortality rate and uncertain evolution. Therefore, new molecular factors in RCC are necessary. This study aims: to evaluate the expression of Nitric Oxide Sintases types 1, 2 and 3 (NOS-1, NO-2, NOS-3), matrix metalloproteinases types 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9), E-Cadherin and vascular endothelial growth factor (VEGF) through immunohistochemical analysis; to evaluate microvessel density (MVD) and lymphatic vessel density (LVD); to verify the association among biomarkers expression and epidemiological, clinic and pathological variables; to verify the impact of the variables as prognostic factors in 5 years overall survival (OS) and disease free survival (DFS).

**Material and Methods:** One-hundred and ten patients with RCC were included. Clinical, epidemiological and pathological data were collected from medical charts. Performance status classifications used were: Eastern Cooperative Oncologic Group Classification (ECOG) and Karnofsky Performance Status (KPS) and the American Society of Anesthesiology Classification (ASA). The Tissue Microarray (TMA) was used and a digital microscopy program (ACIS III) was empregated. To predict recurrence, progression our death, the variables selected by univariate analysis were included in a Hierarchic Multivariate Model (HMM), to estimate the odds of deaths or disease progression or recurrence. **Results:** In the univariate analysis, NOS-3 ( $p=0.047$ ) and MVD ( $p=0.052$ ) had impact in OS. Patients

with low expression of NOS-3 had an OS of 79% versus 58.1% for patients with high expression of NOS-3. The MVD showed direct correlation with OS rates: patients with high MVD had higher OS (79.9%) than the patients with low MVD (58%). E-cadherin, the VEGF, the MMP-2, MMP-9 and DVL expression were not correlated with OS and DFS. NOS expression (NOS- 1, NOS - 2 and NOS - 3) were directly correlated with tumor size: patients with low NOS expression had tumors 2.0 to 3.0cm smaller than patients with high NOS expression. High expression of NOS-3 was correlated with lymph node metastasis (31% versus 9.7%,  $p=0.029$ ), with renal pelvis and ureter invasion (16% versus 3.3%,  $p= 0.0041$ ) and with a higher rate of radical nephrectomies (88% versus 63.3%,  $p=0.003$ ). The high expression of the MMP-2 and the MMP-9 were correlated with high grade tumors ( $p=0.046$  and  $p=0.009$  respectively) and with histological type not clear cell ( $p=0.029$  and  $p=0.009$ , respectively). In the OS multivariate analysis, the significant prognostic factors were: TNM clinical staging (HR=4.5), grade (HR=2.9), KPS (HR=2.5), the occurrence of post-nephrectomy progression (HR = 5.3) and/or recurrence (HR= 6.5), all of them adjusted by the age (HR=1.1). The HMM score ranged of 0 the 7 points. There were no deaths among patients with 0 point and all patients with 7 points have died. According to the HMM score, the probability to be alive for 0, 1-2, 3-4, 5-7 score levels was respectively 100%, 83.5%, 53,5 and 13.5%. In the univariate DFS analysis for the 94 patients without metastases (16 of the 110 patients had metastasis at diagnosis), no molecular marker had significant impact. In the multivariate analysis for DFS, only the TNM clinical staging was an independent prognostic factor. Clinical staging III had HR of 9.5 times for recurrence.

**Conclusions:** Usual clinical factors remained as most important prognostic factors in RCC and had allowed the elaboration of one score, in which patients with more than 4 points has a death probability rate higher than 50%. This MMH score must be validated for other groups. Future studies regarding the correlations and the prognostic role of NOS-3 in RCC must be conducted.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Via de von Hippel-Lindau (VHL)/ Fator induzido por hipóxia (HIF) e genes alvo.....	14
<b>Figura 2</b>	Terapias com alvos moleculares para CCR e respectivos sítios de ação das drogas .....	15
<b>Figura 3</b>	Desenho - Complexo de adesão celular cálcio dependente mediado pelas caderinas envolvendo as cateninas e o citoesqueleto.....	20
<b>Figura 4</b>	Representação esquemática do processo de elaboração do TMA- Tissue Microarray.....	46
<b>Figura 5</b>	Modelo multivariado hierárquico (MMH) teórico para explicar os desfechos relacionados ao câncer.....	56
<b>Figura 6</b>	Microfotografias (400x): Expressão imunoistoquímica da caderina E nas membranas celulares de CCR.....	57
<b>Figura 7</b>	Microfotografia (400x): Expressão imunoistoquímica da caderina E em CCR.....	58
<b>Figura 8</b>	Microfotografia (400x): Expressão imunoistoquímica da MMP-2 em CCR de células claras.....	58
<b>Figura 9</b>	Miscroscopia (400x): Expressão imunoistoquímica da MMP-2 em CCR.....	59
<b>Figura 10</b>	Microfotografia (400x). Expressão imunoistoquímica da MMP-9 em CCR de células claras.....	59
<b>Figura 11</b>	Microfotografia (400x): Expressão imunoistoquímica da MMP-9 em CCR.....	60
<b>Figura 12</b>	Microfotografia (400x): Expressão imunoistoquímica da NOS-1 em CCR de células claras.....	60
<b>Figura13</b>	Microfotografia (400x): Expressão imunoistoquímica da NOS-1 em CCR.....	61
<b>Figura 14</b>	Microfotografia (400x): Expressão imunoistoquímica da NOS-2 em CCR de células claras.....	61

<b>Figura 15</b>	Microfotografia (400x): Expressão imunoistoquímica da NOS-2 em CCR.....	62
<b>Figura 16</b>	Microfotografia (400x): Expressão imunoistoquímica da NOS-3 em CCR de células claras.....	62
<b>Figura 17</b>	Microfotografia (400 x): Expressão imunoistoquímica da NOS-3 em CCR.....	63
<b>Figura 18</b>	Microfotografia (400x): Expressão imunoistoquímica do VEGF em CCR de células claras.....	63
<b>Figura19</b>	Microfotografia (400x): Expressão imunoistoquímica do VEGF em CCR de células claras.....	64
<b>Figura 20</b>	Microfotografia (400x) de CCR de células claras com elevada densidade de microvasos (DMV).....	64
<b>Figura 21</b>	Microfotografia(400x), CCR de células claras demonstrando baixa densidade de microvasos (DMV).....	65
<b>Figura 22</b>	Microfotografia (200x) demonstrando elevada densidade de vasos linfáticos (DVL) em CCR de células claras.....	65
<b>Figura 23</b>	Microfotografia (400x), demonstrando baixa densidade de vasos linfáticos (DVL) em CCR de células claras.....	66
<b>Figura 24</b>	Sobrevida global aos 5 anos, de 110 pacientes com CCR submetidos a nefrectomia, de acordo com a expressão imunoistoquímica da Caderina E.....	77
<b>Figura 25</b>	Sobrevida livre de doença aos 5 anos, de 94 pacientes com CCR sem metástases ao diagnóstico, submetidos à nefrectomia de acordo com a expressão imunoistoquímica da Caderina E.....	78
<b>Figura 26</b>	Sobrevida global aos 5 anos, de 110 pacientes com CCR submetidos a nefrectomia, de acordo com a expressão imunoistoquímica do VEGF.....	81
<b>Figura 27</b>	Sobrevida livre de doença aos 5 anos, de 94 pacientes com CCR sem metástases ao diagnóstico, submetidos à nefrectomia de acordo com a expressão imunoistoquímica do VEGF.....	82

<b>Figura 28</b>	Sobrevida global aos 5 anos, de 110 pacientes com CCR submetidos a nefrectomia, de acordo com a expressão imunoistoquímica da NOS-1.....	85
<b>Figura 29</b>	Sobrevida livre de doença aos 5 anos, de 94 pacientes com CCR sem metástases ao diagnóstico, submetidos à nefrectomia de acordo com a expressão imunoistoquímica da NOS-1.....	86
<b>Figura 30</b>	Sobrevida global aos 5 anos, de 110 pacientes com CCR submetidos nefrectomia, de acordo com a expressão imunoistoquímica da NOS-2.....	89
<b>Figura 31</b>	Sobrevida livre de doença aos 5 anos, de 94 pacientes com CCR sem metástases ao diagnóstico, submetidos à nefrectomia de acordo com a expressão imunoistoquímica da NOS-2.....	90
<b>Figura 32</b>	Sobrevida global aos 5 anos, de 110 pacientes com CCR submetidos a nefrectomia, de acordo com a expressão imunoistoquímica da NOS-3.....	94
<b>Figura 33</b>	Sobrevida livre de doença aos 5 anos, de 94 pacientes com CCR sem metástases ao diagnóstico, submetidos à nefrectomia de acordo com a expressão imunoistoquímica da NOS-3.....	95
<b>Figura 34</b>	Sobrevida global aos 5 anos, de 110 pacientes com CCR submetidos a nefrectomia, de acordo com a expressão imunoistoquímica da MMP-2.....	99
<b>Figura 35</b>	Sobrevida livre de doença aos 5 anos, de 94 pacientes com CCR sem metástases ao diagnóstico, submetidos à nefrectomia de acordo com a expressão imunoistoquímica da MMP-2.....	100
<b>Figura 36</b>	Sobrevida global aos 5 anos, de 110 pacientes com CCR submetidos a nefrectomia, de acordo com a expressão imunoistoquímica da MMP-9.....	103

<b>Figura 37</b>	Sobrevida livre de doença aos 5 anos, de 94 pacientes com CCR sem metástases ao diagnóstico, submetidos à nefrectomia de acordo com a expressão imunohistoquímica da MMP-9.....	104
<b>Figura 38</b>	Sobrevida global aos 5 anos, de 110 pacientes com CCR submetidos a nefrectomia, de acordo com a expressão imunohistoquímica da DMV.....	107
<b>Figura 39</b>	Sobrevida livre de doença aos 5 anos, de 94 pacientes com CCR sem metástases ao diagnóstico, submetidos à nefrectomia de acordo com a expressão imunohistoquímica da DMV.....	108
<b>Figura 40</b>	Sobrevida global aos 5 anos, de 110 pacientes com CCR submetidos a nefrectomia, de acordo com a expressão imunohistoquímica da DVL.....	111
<b>Figura 41</b>	Sobrevida livre de doença aos 5 anos, de 94 pacientes com CCR sem metástases ao diagnóstico, submetidos à nefrectomia de acordo com a expressão imunohistoquímica da DMV.....	112
<b>Figura 42</b>	Curvas de sobrevida global segundo a pontuação obtida no escore do MMH para prever o óbito.....	128
<b>Figura 43</b>	Curvas de sobrevida global segundo a pontuação obtida no escore simplificado do MMH para prever o óbito.....	131

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Variáveis epidemiológicas.....	70
<b>Tabela 2</b>	Variáveis Clínicas.....	71
<b>Tabela 3</b>	Variáveis terapêuticas.....	72
<b>Tabela 4</b>	Variáveis anatomopatológicas.....	73
<b>Tabela 5</b>	Variáveis de estadiamento.....	74
<b>Tabela 6</b>	Desfechos clínicos após o tratamento do tumor primário e situação clínica aos 5 anos do estudo.....	74
<b>Tabela 7</b>	Distribuição dos casos segundo a expressão da Caderina E e diversas variáveis do estudo.....	79
<b>Tabela 8</b>	Distribuição dos casos segundo a expressão de VEGF e diversas variáveis do estudo.....	83
<b>Tabela 9</b>	Distribuição dos casos segundo a expressão de NOS1 e diversas variáveis do estudo.....	87
<b>Tabela 10</b>	Distribuição dos casos segundo a expressão de NOS2 e diversas variáveis do estudo.....	91
<b>Tabela 11</b>	Distribuição dos casos segundo a expressão de NOS3 e diversas variáveis do estudo.....	96
<b>Tabela 12</b>	Distribuição dos casos segundo a expressão de MMP2 e diversas variáveis do estudo.....	101
<b>Tabela 13</b>	Distribuição dos casos segundo a expressão de MMP9 e diversas variáveis do estudo.....	105
<b>Tabela 14</b>	Distribuição dos casos segundo a expressão de CD31 e diversas variáveis do estudo.....	109
<b>Tabela 15</b>	Distribuição dos casos segundo a expressão de densidade de vasos linfáticos DVL D240 e diversas variáveis do estudo..	113
<b>Tabela 16</b>	Médias de idade dos pacientes segundo a expressão dos marcadores biomoleculares.....	114
<b>Tabela 17</b>	Tamanho Tumoral médio, segundo a expressão dos marcadores biomoleculares.....	116

<b>Tabela 18</b>	Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos segundo as variáveis demográficas e de estilo de vida.....	117
<b>Tabela 19</b>	Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos segundo as variáveis clínicas.....	118
<b>Tabela 20</b>	Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos segundo as variáveis relacionadas ao tratamento.....	119
<b>Tabela 21</b>	Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos segundo as variáveis anatomopatológicas microscópicas.....	120
<b>Tabela 22</b>	Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos segundo as variáveis anatomopatológicas macroscópicas.....	121
<b>Tabela 23</b>	Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos segundo as variáveis biomoleculares.....	122
<b>Tabela 24</b>	Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos segundo o estadiamento.....	123
<b>Tabela 25</b>	Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos segundo as variáveis de seguimento.....	124
<b>Tabela 26</b>	Fatores de risco independentes para o óbito identificados pelo modelo de riscos proporcionais de Cox.....	125
<b>Tabela 27</b>	Pontos atribuídos às variáveis para a confecção do escore para prever a sobrevida global.....	126
<b>Tabela 28</b>	Número e porcentagem de casos conforme a pontuação do escore e a ocorrência de óbito, num período de acompanhamento de 5 anos.....	127
<b>Tabela 29</b>	Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos segundo a pontuação obtida no escore para prever o óbito.....	128
<b>Tabela 30</b>	Número e porcentagem de casos conforme a pontuação do escore simplificado MMH e a ocorrência de óbito, num período de acompanhamento de 5 anos.....	129
<b>Tabela 31</b>	Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos segundo a pontuação obtida no escore simplificado do MMH para prever o óbito.....	130
<b>Tabela 32</b>	Probabilidade de sobrevida livre de doença aos 5 anos segundo as variáveis demográficas e de estilo de vida.....	132

<b>Tabela 33</b>	Probabilidade de sobrevida livre de doença aos 5 anos segundo as variáveis clínicas.....	133
<b>Tabela 34</b>	Probabilidade de sobrevida livre de doença aos 5 anos segundo as variáveis relacionadas ao tratamento.....	134
<b>Tabela 35</b>	Probabilidade de sobrevida livre de doença aos 5 anos segundo as variáveis anatomopatológicas microscópicas.....	135
<b>Tabela 36</b>	Probabilidade de sobrevida livre de doença aos 5 anos segundo as variáveis anatomopatológicas macroscópicas.....	136
<b>Tabela 37</b>	Probabilidade de sobrevida livre de doença aos 5 anos segundo as variáveis biomoleculares.....	138
<b>Tabela 38</b>	Probabilidade de sobrevida livre de doença aos 5 anos segundo o estadiamento.....	139
<b>Tabela 39</b>	Fatores de risco independentes para recorrência identificados pelo modelo de riscos proporcionais de Cox.....	140

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AI</b>	Índice Apoptótico (do inglês Apoptotic Index)
<b>AKT</b>	protein kinase B
<b>ASA</b>	American Society of Anesthesiology
<b>Cad E</b>	Caderina E
<b>CAIX</b>	Anidrase Carbônica IX (do Inglês IX Carbonic Anhydrase )
<b>CCR</b>	Carcinoma de Células Renais
<b>cNOS</b>	NOS constitutivas (cNOS)
<b>CXCR4</b>	Receptor 4 de quimiocinas da família CXC (do Inglês chemokine receptor-4)
<b>DMV</b>	Densidade de microvasos
<b>DVL</b>	Densidade de vasos linfáticos
<b>ECOG</b>	Eastern Cooperative Oncologic Group
<b>EGF</b>	Fator de Crescimento Epidérmico (do Inglês Epidermal Growing Factor)
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>GLUT-1</b>	Proteína Transportadora de Glicose -1 (do Inglês glucose transporter protein 1)
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>HIF-1</b>	Fator Induzível por hipóxia tipo 1 (do Inglês Hypoxia Inducible Factor)
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Fator Induzível por hipóxia tipo 1-subunidade alfa (do Inglês $\alpha$ 1-Hypoxia Inducible Factor)
<b>HR</b>	Razão de chances (do inglês, Hazard ratio)
<b>HSP</b>	Proteína do Choque do Calor (do inglês heat-shock protein)
<b>IIQ</b>	Imunoistoquímica
<b>IC 95%</b>	Intervalo de confiança de 95%.
<b>IGF</b>	Fator de crescimento derivado da Insulina (do inglês Insulin Like Growing Factor)

<b>iNOS</b>	NOS-induzida
<b>IVM</b>	Invasão Venosa Microscópica
<b>ILM</b>	Invasão Linfática Microscópica
<b>KPS</b>	Karnofsky Performance Status
<b>Ksp-Cad</b>	Caderina rim-específica (do inglês Kidney specific cadherin)
<b>LYVE-1</b>	Receptor 1 hialurônico de endotélio de vasos linfáticos ( do Inglês lymph vessel endothelial hyaluronan receptor-1)
<b>MMPs</b>	Metaloprotases da Matriz Extracelular (do inglês Matrix Metalloproteases)
<b>MMP-2</b>	Metaloprotease da Matriz Extracelular tipo 2
<b>MMP-9</b>	Metaloprotease da Matriz Extracelular tipo 2
<b>MSKCC</b>	Memorial Sloan Kettering Cancer Center
<b>mTOR</b>	Mamalian Target of Rapamicin
<b>NO</b>	Óxido Nítrico (do inglês Nitric Oxide)
<b>NOS</b>	Sintases do Óxido Nítrico (do inglês Nitric Oxide Synthase)
<b>NOS-1</b>	Sintases do Óxido Nítrico tipo 1
<b>NOS-2</b>	Sintases do Óxido Nítrico tipo 2
<b>NOS-3</b>	Sintases do Óxido Nítrico tipo 3
<b>PCR</b>	Reação da Polimerase em cadeia (do Inglês Polimerase Chain Reaction),
<b>PI</b>	Índice Proliferativo (do Inglês Proliferative Index)
<b>PDGF</b>	Fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês Platelet derived Growing Factor)
<b>RNAm</b>	RNA mensageiro
<b>RT-PCR</b>	Reação da Polimerase em Cadeia por Transcriptase Reversa
<b>VEGF</b>	Fator de Crescimento Vascular Endotelial (do inglês Vascular Endothelial Growing Factor)
<b>SAME</b>	Serviço de Arquivo Médico e Estatístico
<b>SG</b>	Sobrevida Global
<b>SLD</b>	Sobrevida Livre de Doença
<b>TGF- <math>\alpha</math></b>	Fator $\alpha$ Transformador de Crescimento (do Inglês-Transforming Growing $\alpha$ Factor)

<b>TMA</b>	Microarranjo Tecidual (do inglês-Tissue Microarray)
<b>TIMPS</b>	Inibidores Tissulares da Metaloproteases da Matriz Extracelular
<b>UCLA</b>	Universidade da Califórnia Los Angeles (do Inglês University of California Los Angeles)
<b>UDO</b>	Unidade de Densidade Ótica
<b>UISS</b>	Sistema de Estadiamento Integrado da UCLA (do Inglês UCLA Integrate Staging System)
<b>UICC</b>	União Internacional contra o câncer, do Inglês International Union Against Cancer
<b>VHL</b>	Von Hippel Lindau

# INDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Razões do Estudo	1
1.2	Revisão da Literatura	2
1.2.1	Epidemiologia	2
1.2.2	Tratamento	4
1.3	Fatores prognósticos	6
1.3.1	Fatores demográficos, clínicos e patológicos	6
1.3.2	Fatores biomoleculares	17
1.4	O Tissue Microarray (TMA)	38
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS</b>	<b>42</b>
3.1	Critérios de Inclusão	42
3.2	Critérios de Exclusão	42
3.3	A coleta de dados	43
3.4	A Confecção das lâminas e do TMA	44
3.4.1	Técnica de preparo do TMA (Tissue microarray)	44
3.4.2	Técnica do preparo imunohistoquímico	47
3.5	Microscopia digital	50
3.6	Metodologia estatística	52
3.7	Ilustrações- Microfotografias	57
3.8	Casuística	66
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>75</b>
4.1	Marcadores biomoleculares	75
4.1.2	Caderina E	75
4.1.3	VEGF	80
4.1.4	NOS-1	84

4.1.5	NOS-2	88
4.1.6	NOS-3	92
4.1.7	MMP-2	97
4.1.8	MMP-9	102
4.1.9	A Densidade de Microvasos – DMV	106
4.1.10	A Densidade de Vasos Linfáticos DVL	110
4.1.11	As Médias de Idade e fatores biomoleculares	114
4.1.12	Tamanho Tumoral e fatores biomoleculares	115
4.2	Análise de Sobrevida global	116
4.2.1	Análise univariada	116
4.2.2	Análise Multivariada	124
4.3	Análise de Sobrevida livre de Doença	132
4.3.1	Análise Univariada	132
4.3.2	Análise Multivariada	139
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>141</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>179</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>181</b>

## **ANEXOS**

**Anexo 1** Classificação de performance/status de Karnofsky: KPS-  
Karnofsky Performance Status Classification

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

**Anexo 3** Classificação de status físico da ASA- American Society of  
Anesthesiology Classification

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 RAZÕES DO ESTUDO

O carcinoma de células renais (CCR) tem evolução clínica incerta. A cirurgia permanece como o principal método de tratamento. Até 30% dos pacientes têm metástases ao diagnóstico e um terço progride em 5 anos após a nefrectomia (THRASHER e PAULSON 1993; KONTAK e CAMPBELL 2003; CAMPBELL et al. 2007).

Ainda não dispomos de fatores prognósticos que possam determinar claramente quais os pacientes com baixo potencial de progressão que poderiam ser candidatos a cirurgias conservadoras ou ser submetidos a protocolos de observação vigilante e quais os pacientes com alto risco de recidiva ou morte pela doença, que deveriam ser submetidos a tratamento mais agressivo e a um seguimento mais intenso.

Nos últimos anos uma nova classe de drogas, os inibidores dos alvos moleculares, tem sido utilizada para a doença metastática (ROSS et al. 2004). Do mesmo modo que com a imunoterapia tradicional, os índices de resposta variam de acordo com o tipo histológico e com as condições clínicas e patológicas de cada paciente e da extensão da moléstia (MOTZER et al. 1999, 2004; PATARD et al. 2006; CAMPBELL et al. 2007; The National Comprehensive Cancer Network-NCCN 2008). Portanto é fundamental se

conhecer fatores prognósticos que orientem a escolha adequada desta droga e o momento certo de sua utilização.

No futuro, poderemos dispor de tratamentos adjuvantes após a nefrectomia para pacientes com doença localmente avançada ou para pacientes com doença localizada de mal prognóstico. Para selecionar candidatos a estas drogas, necessitaremos de fatores preditivos para recidiva, progressão e morte pela doença.

Recentemente, biópsias percutâneas de pequenas massas renais guiadas por métodos de imagem têm atraído interesse de pesquisadores (LANE et al. 2008). Além das informações sobre tipo histológico, grau e arranjo tecidual, informações a respeito de fatores prognósticos moleculares serão necessários para determinar a melhor abordagem para essas lesões. Pelas razões acima, realizamos um estudo a respeito de fatores prognósticos em pacientes com carcinoma de células renais (CCR). Vemos a seguir uma breve revisão da literatura a respeito do CCR e a também a revisão da literatura a respeito dos fatores prognósticos em CCR e da Tecnologia do Tissue Micro Array (TMA), empregada neste estudo.

## **1.2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **1.2.1 Epidemiologia**

O carcinoma de células renais (CCR) corresponde a 3% de todas as neoplasias em adultos e a sexta causa de morte por câncer nos Estados Unidos da América (EUA). Foram estimados para o ano de 2007, 51 190

casos novos e 12 890 mortes pela doença naquele país (American Cancer Society- ACS 2007). Trata-se da neoplasia urológica mais letal. Acomete ambos os sexos, sendo mais freqüente nos homens na proporção de 2:1 em relação às mulheres. É mais freqüente entre as 6<sup>a</sup>. e 7<sup>a</sup> décadas de vida, porém não são incomuns casos abaixo dos 50 anos (STAFFORD et al. 2008; WOLDRICH et al. 2008). No Brasil não encontramos dados nas estatísticas oficiais, inclusive não figurando o CCR dentre as neoplasias mais freqüentes no site do Instituto Nacional do Câncer-INCA (Ministério da Saúde 2007). Noventa e cinco por cento dos casos são CCR esporádicos e 2 a 5% corresponde a CCR familiares ou hereditários (LINEHAN et al. 2003) Os fatores de risco mais comuns são história familiar de CCR, tabagismo, índice massa corpórea elevado, obesidade, hipertensão arterial, uso de diuréticos e medicações hipertensivas, dieta pobre em vegetais e frutas, insuficiência renal crônica, doença cística renal adquirida, além de síndromes de CCR familiar, ou de síndromes de alto risco para CCR, com as Síndromes de von Hippel Lindau e e Birt Hogg- Dubbé (LIPWORTH et al. 2006).

Nas últimas décadas, a incidência da doença vem crescendo, principalmente em países desenvolvidos e associado a isso se verifica um incremento do diagnóstico incidental dessas neoplasias, devido à popularização de exames de imagem. Além dos EUA, esse aumento de incidência é registrado em outros países como Itália e Japão (MATHEW et al. 2002). Com isso, assistimos a uma migração de estádios ao diagnóstico, com neoplasias consideravelmente menores e menos avançadas do que há

três décadas (CHOW et al. 1999). Paralelamente, a mortalidade pela doença aumentou nos EUA nos últimos 30 anos (CHOW et al. 1999; WOLDRICH et al. 2008).

Existem vários tipos histológicos de CCR. O predominante e mais agressivo é o carcinoma de células claras convencionais, que equivale a 65 a 80% dos casos, sendo seguido pelos CCR Papilíferos (7 a 15%, CCR papilíferos tipos I e II), Carcinomas cromófobos (3 a 5%), CCR ductais medulares, CCR associados a translocações do TFE3 gene e carcinomas inclassificáveis. (menos de 1%). Cada um dos tipos histológicos decorre de alterações citogenéticas distintas, tem sítios glomerulares de origem distintos, e por sua vez, história natural, agressividade e resposta a tratamentos distintos, configurando o CCR não como uma doença única, mas como uma associação de neoplasias malignas distintas, que afetam o mesmo órgão, o rim (SUDARSHAN e LINEHAN 2006).

### **1.2.2 Tratamento**

O CCR tem no tratamento cirúrgico os melhores resultados, principalmente na doença localizada (CAMPBELL et al. 2007). São empregadas a nefrectomia radical e a nefrectomia parcial para o tratamento do tumor primário.

Realiza-se a nefrectomia parcial imperativa quando é necessário preservar do máximo de parênquima renal, como casos de tumores renais bilaterais ou acometendo com rins únicos, insuficiência renal estabelecida ou iminente e nas de síndromes de CCR familiar em que o as chances de

recidiva ou acometimento de contralateral são altas. A nefrectomia parcial eletiva é indicada para tumores localizados com até 4,0 cm, mesmo com rim contralateral normal e tem resultados similares à nefrectomia radical. Para alguns casos selecionados, com localização favorável, torna-se possível para tumores com 4,0 a 7,0 cm. Para os demais casos emprega-se a nefrectomia radical a céu aberto ou por videocirurgia (CAMPBELL et al. 2007; NCCN 2008).

Recentemente tem se discutido protocolos de observação vigilante para neoplasias pequenas, pouco agressivas em pacientes com limitada expectativa de vida. Técnicas de ablação por crioablação e radiofrequência têm sido descritas para neoplasias em topografias favoráveis, pequenas e em alguns casos de CCR familiar.

Para portadores de doença metastática, pode-se empregar a nefrectomia associada à imunoterapia ou à terapia com alvos moleculares. Em alguns casos pode-se associar a ressecção de metástases únicas. Nos casos em que a nefrectomia não é possível ou já foi realizada, pode-se empregar imunoterapia, a terapia com alvos moleculares ou a palição (PATARD et al. 2006; CAMPBELL et al. 2007; NCCN 2008).

No momento, não se dispõe de terapêuticas adjuvantes para doença localmente avançada ou localizada de alto risco. Com as novas terapias de alvos moleculares, futuramente talvez possam ser empregadas terapias adjuvantes à nefrectomia para pacientes com alto risco de falha.

## **1.3 FATORES PROGNÓSTICOS**

### **1.3.1 Fatores demográficos, clínicos e patológicos**

Os fatores prognósticos para o CCR estão diretamente relacionados ao paciente e a sua doença. Os fatores diretamente ligados ao pacientes são clínicos, compostos pelos seus sinais e sintomas, seu estado geral e as repercussões da doença em seu organismo, além do estágio clínico e de fatores laboratoriais (calcemia, dados hematimétricos e provas inflamatórias) (KONTAK e CAMPBELL 2003). Os fatores ligados à doença são características inerentes ao tumor propriamente dito, como estágio patológico, tamanho, grau, tipo histológico e demais achados anatomopatológicos (GUDBJARTSON et al. 2005). De uma abordagem integrada, composta de ambas as partes, resultam os modelos prognósticos mais efetivos nas análises multivariadas (KONTAK e CAMPBELL 2003; ZISMAN et al. 2001; PATARD et al. 2004b; CAMPBELL et al. 2007).

Não encontramos estudos comprovando valor prognóstico independente em análises multivariadas para fatores demográficos como idade, sexo, cor da pele e hábitos de vida. Enquanto alguns estudos sugerem que pacientes jovens têm neoplasias mais agressivas e sintomáticas, outras não encontram diferença entre pacientes como mais o menos de 40 anos de idade (THRASHER e PAULSON 1993; KONTAK e CAMPBELL 2003; GOETZL et al. 2004; CAMPBELL et al. 2007). Alguns estudos antigos sugeriam que mulheres tivessem prognóstico melhor que os homens, de forma pouco consistente. Neste ano dois estudos

epidemiológicos norte americanos demonstraram que as mulheres têm menor incidência, maior chance de diagnóstico no estágio I e maior sobrevida que os homens (WOLDRICH et al. 2008, STAFFORD et al. 2008). Revelaram ainda que nos EUA, os negros têm maior incidência e pior sobrevida em comparação aos brancos, hispânicos e os asiáticos e insulares do Pacífico (STAFFORD et al. 2008).

Os fatores prognósticos mais utilizados, como estágio clínico-patológico e o grau de malignidade permanecem como os mais efetivos (THRASHER e PAULSON 1993; KONTAK e CAMPBELL 2003; GUDBJARTSON et al. 2005; CAMPBELL et al. 2007).

Numa coletânea de 20 estudos, a sobrevida global (SG) em 5 anos de acordo com o estadiamento do Sistema TNM, variou de 80 a 100% para o estágio I; 60 a 80% para o estágio II, 40 a 60% para o estágio III e 0 a 20% para o estágio IV. Porém no estágio clínico III estão agrupados pacientes com acometimento de gordura perirrenal e seio renal (T3a), adrenal ipsilateral (T3a), veia renal e veia cava (T3b/c) e linfonodos (N1), cujos prognósticos podem ser distintos. O mesmo ocorre no estágio I, que comporta pacientes com tumores < 4,0 cm (T1a) e > 4,0 cm (T1b), os quais têm prognósticos e abordagens terapêuticas distintas (CAMPBELL et al. 2007).

Na série original descrita por FUHRMAN et al. (1982), a SG em 5 anos para os graus nucleares 1, 2, 3 e 4 foi respectivamente de 64%, 34%, 31% e 10%. Trata-se de uma série histórica, em que a maior parte dos pacientes foi submetida a nefrectomias radicais e com tumores maiores que

os atuais. Alguns autores criticam a subjetividade e a reprodutibilidade das escalas de graus nucleares de 4 níveis, propondo o agrupamento apenas em 3 níveis ou até mesmo entre tumores de alto grau versus baixo grau, como BRETHERAU et al. (1995), que demonstraram SG de 76%, 72%, 51% e 31% para os graus 1 a 4 respectivamente, e encontraram diferença significativa ( $p=0,001$ ) nas taxas de SG entre pacientes de baixo grau (graus 1 e 2), versus alto grau (3 e 4). Um dos problemas com o grau é que embora seja bastante efetivo nos CCR e células claras, não há comprovação da mesma acurácia para os demais tipos histológicos.

Pacientes sintomáticos e com metástases ao diagnóstico têm pior evolução clínica em comparação aos pacientes com diagnóstico incidental e sem manifestações clínicas da neoplasia (PATARD et al. 2004b). Síndromes paraneoplásicas se associam também a um pior prognóstico (KIM et al. 2000).

Outros fatores como o tipo histológico e arranjo arquitetural celular tem resultados às vezes conflitantes, embora usualmente pacientes com carcinomas de células claras e/ou com arranjo arquitetural sarcomatóide, tenham prognóstico mais reservado (THRASHER e PAULSON 1993; KONTAK e CAMPBELL 2003; LAM et al. 2005; CAMPBELL et al. 2007).

A sobrevida de pacientes com neoplasias limitadas ao órgão é significativamente melhor do que nos casos em que a doença transpõe a fásia de Gerota, situação na qual, raramente os pacientes chegam a 5 anos de sobrevida após a cirurgia (THRASHER e PAULSON 1993; CAMPBELL et al. 2007).

O acometimento linfonodal é evento ominoso. Pacientes com metástases linfonodais tem sobrevida em 5 anos variando entre 5 a 30% e, menos que 5% destes, atingem 10 anos de vida (PHILIPS e TANEJA 2004). Até metade deste pacientes apresentam sincronicamente metástases a distância (hematogênicas), sendo esta associação de prognóstico ainda mais reservado (PANTUCK et al. 2003; PHILIPS e TANEJA 2004).

A ocorrência de trombos tumorais na veia renal ou veia cava inferior tem valor prognóstico discutível. Nos casos em que a ressecção do trombo é completa, sem a necessidade de ressecção da parede da veia e sem acometimento de estruturas adjacentes, as taxas de sobrevida são similares as dos pacientes de mesmo estágio sem trombos (45 a 69%). Quando a ressecção da parede do vaso é necessária, ou existe a associação de fatores de mal prognóstico, como: invasão de gordura, ou linfonodos, alto grau ou padrão sarcomatóide, a sobrevida não ultrapassa 25% em 5 anos (THRASHER e PAULSON 1993; KONTAK e CAMPBELL 2003; CAMPBELL et al. 2007). A importância da extensão cefálica do trombo é controversa, não tendo influencia na SG para alguns autores, mas sendo significativamente pior para trombos supradiaphragmáticos em outras séries (SWEENEY et al. 2003; KIM et al. 2004a; MOINZADEH e LIBERTINO 2004).

A presença de metástases a distância é um fator de péssima evolução. A SG em um ano não atinge 50%. Aos 5 anos, varia de 5 a 30% e ao 10 anos, é menor que 5% (CAMPBELL et al. 2007).

Alguns nomogramas prognósticos associando várias variáveis foram propostos, tanto para CCR em geral (KATTAN et al. 2001; PANTUCK et al.

2001) como apenas para CCR de células claras (FRANK et al. 2002). Embora a acurácia destes em geral seja superior a de fatores prognósticos isolados, ainda assim verificam-se variações no papel de cada fator estudado de acordo com as instituições aonde foram elaborados (KATTAN et al. 2001; PANTUCK et al. 2001; FRANK et al. 2002).

No nomograma proposto por KATTAN et al. (2001) para prever sobrevida livre de doença (SLD) 2 e 5 anos após a nefrectomia para pacientes dos estádios T1 a T3b/c; deu-se ênfase ao diagnóstico de leões incidentais versus lesões sintomáticas, além de incluir histologia, tamanho tumoral e estágio. Não incluiu o grau, pois englobava todos os tipos histológicos. A inclusão do grau no modelo foi realizada posteriormente apenas para os casos de CCR de células claras da casuística (SORBELLINI et al. 2005).

No ano seguinte FRANK et al. (2002) da Mayo Clinic, nos EUA, lançaram um nomograma ao estudar 1801 pacientes com CCR de células claras, incluindo pacientes com metástases linfonodais ou a distância. Além do grau, estágio e tamanho (5,0 cm), a presença de necrose se revelou um fator importante para recidiva e óbito. Nesse modelo, criou-se um escore prognóstico de 10 graduações.

O Grupo da Universidade da Califórnia Los Angeles-UCLA, desenvolveu a seguir um sistema integrado de prognóstico para pacientes com CCR, o UCLA Integrate Staging System (UISS), que incluiu pacientes de todos os estádios e incorporou além do estágio e grau, classificação de performance/status (P/S) do ECOG (Eastern Cooperative Oncologic Group).

Essa avaliação do impacto da neoplasia no estado geral do paciente foi significativa, sendo que pacientes com escore  $\geq 1$  de ECOG compunham os grupos de piores resultados que aqueles com escore 0 na predição de sobrevida aos 2 e 5 anos (PANTUCK et al. 2001) .

Em seguida, o mesmo grupo, numa elegante análise multivariada identificou três fatores prognósticos independentes na evolução do CCR, notadamente o estágio TNM, o grau e o novamente o performance status (ZISMAN et al. 2001). Estes três elementos foram testados em casuísticas norte americanas e européias (UCLA e MD Anderson, nos EUA e Nijmegen, na Holanda) e mantiveram poder prognóstico em mais de 100 casos de CCR localizado (HAN et al. 2003).

O Sistema UISS foi validado em 4202 pacientes de oito centros acadêmicos internacionais por PATARD et al. (2004a), tanto para pacientes com CCR localizado como para CCR metastático. Em ambos os tipos de pacientes e em todas as instituições, o sistema permitiu a divisão dos pacientes em três grupos de risco ( $p < 0,001$ ): baixo risco, risco intermediário e alto risco. A sobrevida em 5 anos de acordo com os grupos foi respectivamente de 92%, 67% e 44% para os pacientes com CCR localizado e de 37%, 23 % e 12% para os pacientes com metástases.

Do mesmo modo, o grupo *Memorial Sloan Kettering Cancer Center-MSKCC* elaborou, para CCR localizado, um escore composto por: tempo de recorrência em meses após a nefrectomia ( $>$  ou  $\leq 12$  meses), anemia, calcemia ( $>$  ou  $\leq 10$  mg/dl), desidrogenase láctica ( $>$  ou  $\leq 1,5$  x o normal) e *Karnofsky Performance Status* ( $>$  ou  $\leq 80$ ). O escore variou de 0 a 5 pontos

e pôde separar os pacientes em três grupos prognósticos: baixo risco, risco intermediário e alto risco, cujas sobrevidas medianas foram 76, 25 e 6 meses ( $p < 0,0001$ ) (EGGENER et al. 2007).

Esse modelo do MMSKCC seguiu os mesmo princípios propostos por MOTZER et al. (1999), num estudo com 670 pacientes metastáticos sem tratamento prévio, naquela instituição. Os autores identificaram cinco fatores associados ao pior prognóstico. Foram eles KPS < 80, anemia, hipercalcemia corrigida (>10 mg/dl), DHL elevado (>1,5 vez o normal) e ausência de nefrectomia prévia. Pacientes com três ou mais destes fatores tiveram sobrevida mediana de 4 meses, pacientes com um ou dois fatores tiveram sobrevida de 10 meses, enquanto que os pacientes sem nenhum destes fatores atingiram 20 meses (MOTZER et al. 1999).

O mesmo grupo em nova análise 251 pacientes metastáticos com falha após tratamentos prévios, detectou que a presença de baixo *Karnofsky Performance Status* (KPS), anemia e hipercalcemia, configuraram o pior cenário de respostas aos tratamentos e permitiram as piores taxas de sobrevida. Separaram novamente os pacientes em três níveis de prognóstico. Pacientes com os três fatores tiveram sobrevida mediana de 5,4 meses, pacientes com um dois fatores tiveram 11,9 meses, enquanto que os pacientes sem nenhum destes fatores atingiram 22 meses (MOTZER et al. 2004).

Assim verificamos que além de estágio e grau e demais fatores demográficos, clínicos e patológicos, as análises de performance status

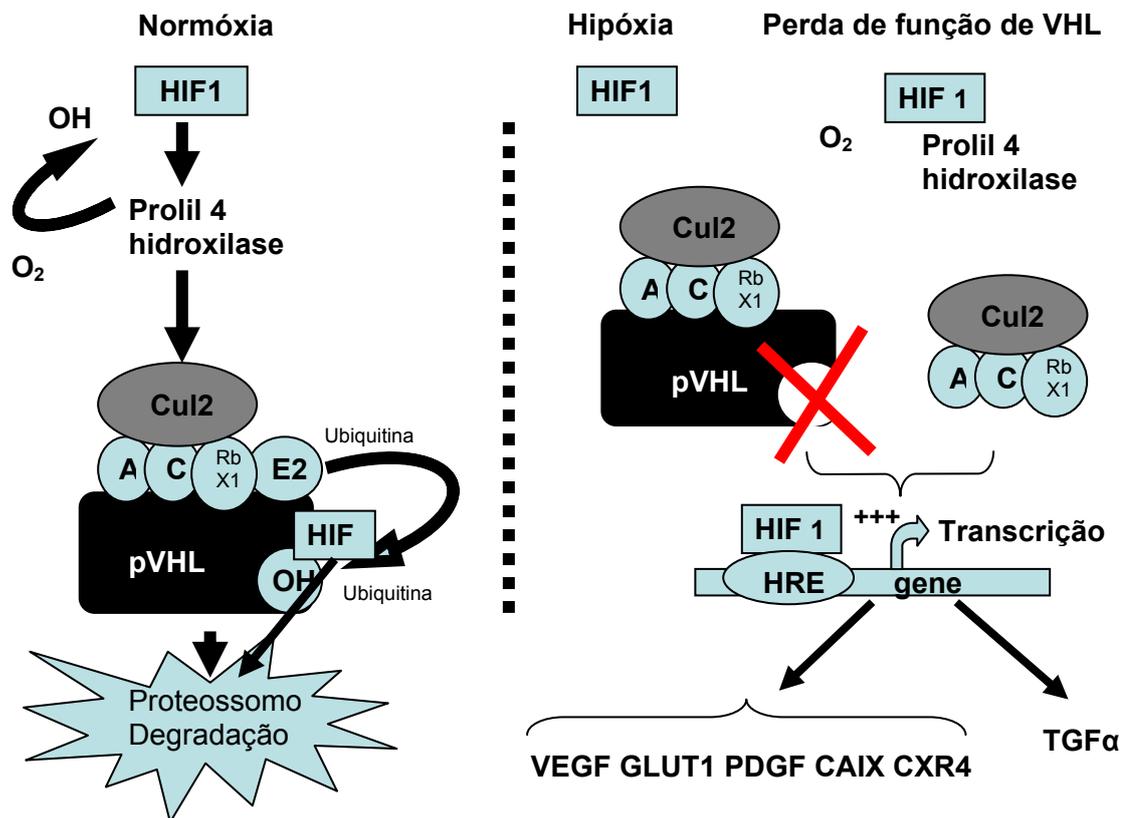
(P/S) em portadores de CCR é fundamental no estabelecimento de modelos prognósticos.

Carecemos de novos fatores prognósticos biomoleculares independentes que possam prever precisamente o risco de metástases ou progressão de doença ou selecionar candidatos a tratamentos específicos ou até mesmo a protocolos de observação vigilante. Uma atenção muito grande tem se voltado para o papel de fatores associados à angiogênese nesta doença.

Nos últimos anos, muitos conhecimentos sobre a fisiopatologia molecular dos vários tipos de CCR, foram adquiridos principalmente através dos estudos de modelos de síndromes de CCRs familiares (doença de Von Hippel Lindau, por exemplo) e transferidos para os CCR esporádicos. O maior conhecimento acumulado é a respeito das vias fisiopatológicas do CCR células claras, decorrentes de alterações de função do gene VHL (gene de Von Hippel Lindau) e da ativação do HIF-1 (Fator Induzível por Hipóxia) (MAXWELL et al. 1999) e suas repercussões nos processos angiogênicos (Figura 1).

Associado a esses conhecimentos, tivemos o advento recente das terapias com alvos moleculares, com inibidores da angiogênese, como o sunitinib, sorafenib, que já figuram como terapêuticas de primeira e segunda linha no tratamento do CCR e demais drogas, como o temsirolimus (inibidor da mTOR - Mamalian Target of Rapamicin). Isso abriu uma nova fronteira no tratamento destas neoplasias (LAM et al. 2005; ROSS et al. 2004; HYUNG et al. 2005; MOTZER et al. 2004) (Figura 2).

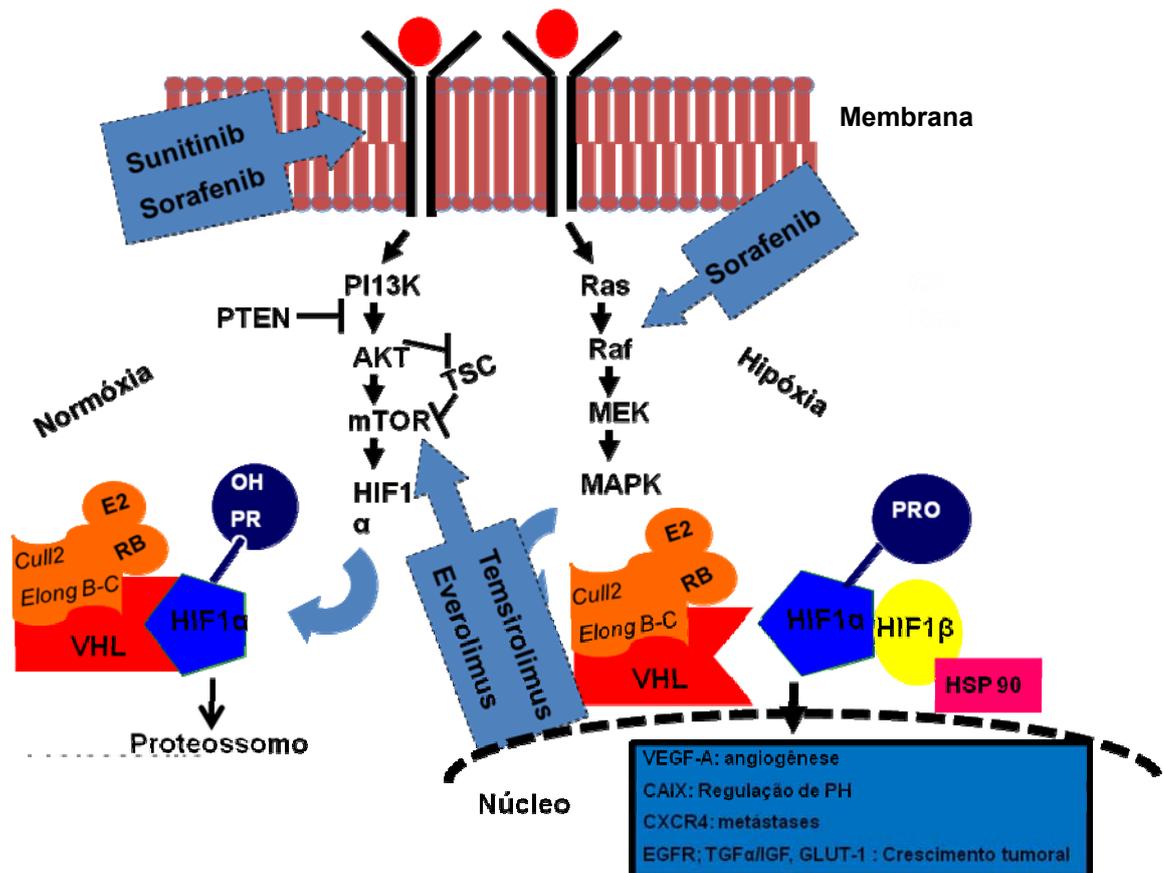
Investigar moléculas diretamente relacionadas à angiogênese e à progressão do CCR poderá no futuro, permitir novos focos de ações para essas drogas (Figura 2) (ROSS et al. 2004).



**Fonte:** Modificado de PATARD et al. (2006)

**Legenda:** Em situações normais (normóxia, com a proteína pVHL íntegra - à esquerda), existe uma associação estável entre HIF-1 e proteínas Cul2 e Elonguinas (E2), mediadas por ubiquitinas, que por intermédio da pVHL promovem a hidroxilação do HIF-1, levando à sua degradação mediada por proteossomos - Direita. A inativação do gene VHL ou a hipóxia, conduzem ao acúmulo de HIF-1, que não é degradado, e a superativação dos genes induzidos por hipóxia, como o Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), e fator  $\alpha$  transformador de crescimento ( $TGF-\alpha$ ) e ativação de substâncias que estabilizam o meio: Anidrase Carbônica IX (CAIX), favorecem a proliferação celular e o crescimento tumoral: Proteína Transportadora de Glicose -1 (GLUT-1) e o surgimento de metástases: Receptor de Quimioquina 4 (CXCR4).

**Figura 1** - Via de von Hippel-Lindau (VHL)/ Fator induzido por hipóxia (HIF) e genes alvo.



**Fonte:** Modificado de: LEPPERT e BELDEGRUN (2007)

**Legendas:** CAIX: Anidrase Carbonica IX (do Inglês IX Carbonic Anhydrase); CXCR4: Receptor de Quimioquina 4 (do Inglês chemokine receptor-4); EGF: Fator de Crescimento Epidermico (do Inglês Epidermal Growing Factor); GLUT-1: Proteína Transportadora de Glicose -1 ( do Inglês glucose transporter protein 1); HSP- Proteína do Choque do Calor (do inglês heat-shock protein); IGF: Fator de crescimento derivado da Insulina (do inglês Insulin Like Growing Factor).

Várias vias convergem para regular a produção de HIF-1α. O alvo da proteína VHL é HIF-1α, degradada por proteossomos (à esquerda). Em ambientes hipoxêmicos, ou na perda da função de VHL (à direita), ocorre o acúmulo de HIF-1α que se transloca para o núcleo celular, agindo como um fator de transcrição. As vias dos genes AKT/mTOR e ras/raf também influenciam a produção de HIF-1α. As terapias de alvos moleculares (Sunitinib, Sorafenib, Temsirolimus e Everolimus) interrompem as vias, alterando o crescimento celular, as sinalizações para angiogênese e o desenvolvimento de metástases.

**Figura 2** - Terapias com alvos moleculares para CCR e respectivos sítios de ação das drogas.

Deste modo, além de reavaliar fatores demográficos, clínicos e patológicos sobejamente conhecidos e testados como prognósticos no CCR, buscamos pesquisar novos fatores prognósticos biomoleculares.

Selecionamos fatores promissores de acordo com a literatura (LAM et al. 2005; HYUNG et al. 2005; SHUCH et al. 2006) e alguns fatores pouco investigados nesta moléstia. Escolhemos fatores preferencialmente ligados aos mecanismos de angiogênese, como o Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fatores associados à formação destes novos vasos como a Densidade de Microvasos (DMV) e a Densidade de Vasos Linfáticos (DVL), além de fatores ligados à adesão celular (Caderina E) e à digestão de membranas (Metaloproteases da Matriz Extracelular (MMP) tipos 2 e 9, e ainda substâncias com múltiplas funções nos mecanismos carcinogênicos em diversos órgãos, mas pouco estudadas no carcinoma de células renais, as sintases do óxido Nítrico (NOS) tipos 1,2 e 3.

Foram estudadas as expressões imunoistoquímicas destes marcadores biomoleculares e suas correlações com fatores demográficos, clínicos e patológicos usuais e criou-se um modelo multivariado hierárquico prognóstico para Sobrevida Global e Sobrevida Livre de doença em CCR inédito em casuísticas nacionais.

Segue abaixo, a revisão da literatura sobre cada um dos marcadores biomoleculares estudados neste trabalho.

### 1.3.2 Fatores biomoleculares

- **As caderinas (Caderina E)**

As caderinas são glicoproteínas transmembrana dependentes de cálcio. Têm propriedades anti-invasivas e que participam ativamente dos mecanismos de adesão celular. Dentre estas, a caderina E (caderina epitelial) forma dímeros com moléculas de caderina E das células adjacentes, selando o espaço intercelular basolateral e mantendo a arquitetura tissular íntegra (CONACCI-SORRELL et al. 2002) (Figura 3).

Além de sua função estrutural, as caderinas desempenham importante função na sinalização celular, através da interação de seu domínio intracelular com a família das cateninas. As cateninas conectam as caderinas E ao citoesqueleto e às cateninas G e H e interagem acentuando mecanismos de transcrição de células T (Figura 3). A caderina E pode regular a quantidade de Catenina H no citoplasma e, por conseguinte, as expressões de genes críticos envolvidos na morte e na proliferação celular, como Ciclina D1 e c-myc.

Alterações de expressão da caderina E são eventos freqüentes na maioria das neoplasias epiteliais (THIERY 2002).

As caderinas (destaque, caderina-E), quando em funções reduzidas, podem levar à perda da adesividade celular e favorecer a liberação de células do tumor primário na circulação. A caderina-E têm importância prognóstica em neoplasias de próstata, bexiga, pulmão, esôfago, e laringe,

entre outras (PAUL et al. 2004). Existem mais de 30 tipos de caderinas conhecidas.

A caderina E é habitualmente expressa no tecido renal normal nos túbulos distais e a caderina N, é expressa nos túbulos proximais (NOUWEN et al. 1993). A caderina E é expressa em 30% dos CCR (SHIMAZUI et al. 1996), com maior expressão nos CCR cromófobos e papilíferos em relação aos CCR de células claras convencionais (JIN et al. 1995). Poucos estudos correlacionam sua expressão com melhor prognóstico (KATAGIRI et al. 1995).

Em 2004, PAUL et al. demonstrou-se através de IHQ e de imunoblotting, que a caderina-6, uma nova caderina, é expressa nos túbulos proximais, tanto nas áreas tumorais quanto no parênquima renal normal, e apresenta correlação com fatores de pior prognóstico, como estágio, padrão arquitetural tissular, metástases e trombos tumorais ( $p < 0,05$ ).

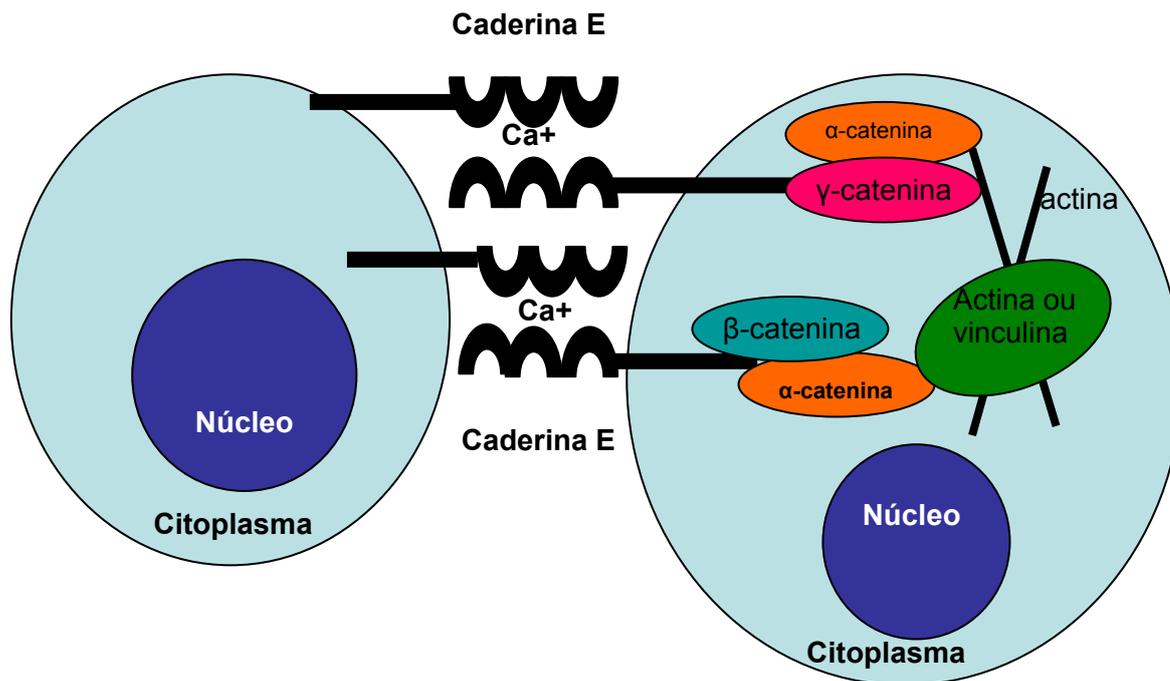
Numa extensa revisão de literatura, LAM et al. (2005) selecionaram dentre as várias moléculas de adesão celular, a caderina E e a caderina 6 como potenciais marcadores moleculares de valor prognóstico em CCR, devendo ser estudadas.

Recentes estudos têm demonstrado que o gene VHL promove a transcrição da caderina E. Deste modo, a sua inativação com a consequente ativação do HIF-1 no ambiente hipoxêmico, (passos iniciais fundamentais da carcinogênese do CCR), influencia negativamente a expressão da caderina E (RUSSELL et al. 2007).

Em linhagens *in vivo* de tecido renal pré-neoplásico de portadores da moléstia de von Hippel Lindau, com hipofunção do gene VHL, ESTEBAN et al. (2006), demonstraram redução da expressão da caderina E. No mesmo estudo, experiências *in vitro* com linhagens celulares derivadas de portadores de CCR esporádico (RCC4 e RCC10) demonstraram que quando restaurada a expressão da proteína VHL, a expressão da caderina E foi restabelecida.

Pacientes com CCR de baixo grau de Fuhrman e bom prognóstico se associaram com VHL positivo e forte imunoreatividade da caderina E. Pacientes com tumores de alto-grau e mau prognóstico se associaram com uma falta de expressão da caderina E. Uma porção significativa de CCR de células claras com mutações do VHL apresentou localização nuclear (atípica) da caderina E pela imunistoquímica. Além disso, a caderina E nuclear não foi observada em carcinomas cromófobos ou papilíferos, tampouco no tecido de rim normal (GERVAIS et al. 2007).

A localização nuclear da caderina E foi também verificada em xenoinxertos de CCR de células claras destituídos de VHL funcional, ou reconstituídos com mutante sintético de VHL desenvolvido em ratos. Estes resultados fornecem a primeira evidência de localização nuclear aberrante de caderina E em CCR de células claras, que abriga mutações de VHL, e sugere valor prognóstico potencial do VHL e da caderina E neste tipo histológico (GERVAIS et al. 2007).



Fonte: Modificado de HAJRA e FEARON (2002).

**Figura 3** - Desenho esquemático-Complexo de adesão celular cálcio dependente mediado pelas caderinas envolvendo as cateninas e o citoesqueleto.

- **O VEGF (VEGF-do inglês Vascular Endothelial Growing Factor)**

O VEGF é expresso em diferentes células durante processos angiogênicos, fisiológicos ou patológicos. É altamente seletivo para endoteliócitos, promovendo a proliferação vascular em resposta ao estímulo de fatores induzidos pela hipóxia, comuns em neoplasias muito vascularizadas como glioma e o CCR (TAKAHASHI et al. 1994; PARADIS et al. 2000).

No CCR, por vias autócrina e intracrina tumorais, há um estímulo ao RNAm do VEGF e aumento dos níveis da proteína VEGF (BLANCHER et al.

2001). A atuação do VEGF se dá através de seu receptor, VEGF-R1 ou flt-1. O VEGF leva à proliferação endotelial e ao aumento da permeabilidade vascular (LJUNBERG et al. 2003).

Um dos mais potentes indutores da angiogênese e da produção do VEGF é a hipóxia. A reação celular à hipóxia é mediada por vários fatores transcricionais, desencadeados por acúmulo do Fator Induzível por Hipóxia tipo 1 alfa (HIF-1 $\alpha$  do inglês Hypoxia Inducible Factor).

O gene de Von Hippel Lindau (gene VHL-gene supressor de tumor, localizado no cromossomo 3p 25-26) codifica a proteína pVHL, responsável por induzir a degradação do HIF-1 $\alpha$ . Em situações de normóxia e de integridade do gene VHL, o HIF-1 $\alpha$ , permanece associado a um complexo composto pela pVHL e proteínas cull-2 e elonginas A, B e C por intermédio das ubiquitinas. O HIF-1 $\alpha$  sofre hidroxilação e se dissocia em dois resíduos prolina, num mecanismo dependente de oxigênio. O complexo pVHL se liga ao o HIF-1 $\alpha$  hidroxilizado e isto resulta na degradação do HIF-1 $\alpha$  mediada por proteossomos (Figuras 1 e 2) (LIDGREN et al. 2005).

Em cerca de 80% dos portadores de CCR de células claras esporádicos ( $\geq 60$  a 75% de todos os CCR) ocorrem mutações do gene de gene VHL. Com isto o HIF1  $\alpha$  não é hidroxilado e se acumulam subunidades do HIF- 1 $\alpha$ , mesmo na ausência de hipóxia (LIDGREN et al. 2005) (Figuras 1 e 2).

Estas mutações, somáticas ou germinativas do gene VHL aniquilam a função da proteína pVHL, não ocorrendo a hidroxilação e inativação do gene HIF-1 $\alpha$  (WIESENER et al. 2001).

O HIF-1 $\alpha$  livre para atuar, promove superexpressão de fatores de crescimento angiogênicos, como o VEGF e de fatores de proliferação celular, como: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) e Fator  $\alpha$  Transformador de Crescimento (TGF-  $\alpha$ ), além da ativação de substâncias que estabilizam o meio, como a Anidrase Carbonica IX (CAIX) e de substâncias que favorecem a proliferação celular e o crescimento tumoral, como Eritropoietina, Proteína Transportadora de Glicose -1 (GLUT-1) e substâncias envolvidas no surgimento de metástases: Receptor 4 de quimiocinas da família CXC (CXCR4) (LIDGREN et al. 2005) (Figuras 1 e 2).

Numa análise de Western Blot em 92 pacientes, demonstraram maior expressão do HIF-1 $\alpha$  nos CCR de células claras em comparação aos demais tipos histológicos, com correlação prognóstica. Nos demais tipos histológicos, o HIFI-1 $\alpha$  não teve impacto significativo e não se correlacionou com sexo, estágio, tamanho tumoral ou IVM (LIDGREN et al. 2005).

O VEGF, dentre os fatores induzidos por hipóxia e o receptor de VEGF foram em 2005 classificados como potenciais marcadores moleculares em CCR (LAM et al. 2005) e portanto, passíveis de serem estudados mais extensamente.

JACOBSEN et al. (2000) demonstraram que a expressão sérica do VEGF (isoforma VEGF<sub>165</sub>) foi significativamente maior em pacientes com CCR do que nos controles normais (343.4 pg/ml versus 103,8 pg/ml, respectivamente, com  $p=0,0001$ ). Níveis séricos elevados de VEGF<sub>165</sub> se correlacionaram com estágio e sobrevida de pacientes com CCR,

principalmente com invasão venosa macroscópica (pT3b-cN0M0) e nos estádios clínicos agrupados I – III, em análise univariada. Na análise multivariada, apenas o estágio e o grau permaneceram como fatores prognósticos independentes.

Em seguida, o mesmo grupo estudou a expressão por IHC do VEGF em 71 amostras de secções teciduais convencionais e em 229 amostras de Tissue Microarray (TMA) de CCR. Encontraram expressão citoplasmática e na membrana celular. A expressão do VEGF não foi influenciada pelos diferentes tipos histológicos ou pelo grau. Os níveis elevados de VEGF se correlacionaram com estágio, tamanho tumoral ( $\leq 4$  cm,  $>4-7$ cm e  $>7$  cm) e sobrevida. Na análise multivariada, não houve impacto como prognóstico em sobrevida e nas variáveis clínicas (JACOBSEN et al. 2004). Neste estudo, a expressão citoplasmática se manteve inalterada com o passar do tempo, mas a expressão nas membranas celulares foi menor nos materiais estocados por maiores intervalos de tempo (2 a 20 anos,  $p=0,004$ ), fazendo com que os autores utilizassem a expressão citoplasmática do marcador no estudo (JACOBSEN et al. 2004).

Em outro estudo, o VEGF foi amplamente expresso tanto nos CCR convencionais como nos CCR papilíferos e na análise multivariada, sua expressão citoplasmática influenciou a sobrevida dos pacientes com CCR convencionais. (PARADIS et al. 2000).

Um estudo com 61 pacientes analisou níveis séricos do VEGF (método ELISA), níveis tissulares tumorais do RNAm do VEGF e de seu receptor (VEGF R1 ou flt-1) através de RT-PCR (Reação da Polimerase em

Cadeia por Transcriptase Reversa). Menores níveis de RNAm do VEGF se correlacionaram com menores estádios, grau, histologia e sobrevida ajustada por estágio ( $p= 0,0097$ ). CCR papilíferos tiveram menores índices do VEGF e de seu receptor flt-1, em comparação ao CCR convencional ( $p=0,001$ ). Isto é compatível com o fato de que os CCR papilíferos são hipovascularizados em comparação aos CCR convencionais e não apresentam mutações do gene de von Hippel Lindau (VHL) (LJUNBERG et al. 2003).

Recentemente, a expressão imunohistoquímica aumentada do VEGF ao lado do acometimento linfonodal e da presença de metástases teve impacto na análise multivariada na sobrevida (OR-odds ratio: 6,07) de 78 pacientes com CCR do estágio pT3a/b. Porém seus níveis não se correlacionaram com a presença ou ausência de trombos em veia cava ou veia renal (BENSALAH et al. 2007).

Em 2006 o grupo de LJUNBERG et al. avaliou a expressão do VEGF, de seu receptor VEGF R1 e os níveis do R2RNAm através de RT-PCR em 84 CCR de células claras convencionais, 20 CCR papilíferos, 06 CCR cromóforos e em 27 amostras corticais renais normais de 110 pacientes. Todos os fatores estudados foram mais expressos nos tecidos tumorais do que no tecido renal normal. Tumores de células claras expressaram mais VEGF do que os papilíferos e cromóforos. Nos CCR de células claras com níveis de VEGF abaixo da mediana, a sobrevida foi menor. Nos carcinomas papilíferos as expressões de VEGF e VEGF R2 foram maiores no estágio III

que nos estádios I e II. Níveis elevados dos três marcadores se correlacionaram a pior sobrevida.

JACOBSEN et al. (2006) avaliaram a expressão de diferentes isoformas do VEGF (VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>121</sub> e VEGF<sub>165</sub>) nos diferentes tipos histológicos de CCR. A isoforma VEGF<sub>189</sub> foi mais expressa nos CCR papilíferos e na análise multivariada, foi um fator prognóstico independente para sobrevida neste tipo histológico. O VEGF<sub>121</sub> se associou a tumores menos agressivos de CCR de células claras. O VEGF<sub>165</sub> teve maior expressão no tecido renal normal do que nos diferentes tipos de CCR.

DJORDJEVIC et al. em 2007 compararam a expressão imunohistoquímica (IIQ) do VEGF em 93 espécimes de CCR de células claras submetidos à nefrectomia radical na Croácia e os correlacionaram com a Densidade de Microvasos (DMV) pelo marcador CD 31 e o índice proliferativo (PI), através do KI 67. Houve predomínio (66%) de expressão citoplasmática em relação à expressão na membrana. Em 68% dos casos houve baixa expressão do VEGF. Os tumores alta expressão de VEGF se correlacionaram diretamente com fatores de mau prognóstico, como alto grau ( $p=0,018$ ) e IP elevado ( $p=0,023$ ) e de modo inverso, com baixos índices de DMV ( $p=0,034$ ). Deste modo, não foi possível estabelecer uma hipotética correlação entre hiperexpressão de VEGF e angiogênese através da DMV.

As causas de correlação inversa entre os níveis VEGF e DMV e de DMV com neoplasias de mau prognóstico provavelmente decorrem de um suprimento sanguíneo insuficiente nos CCRs e merecem ser mais bem

estudadas, sugerindo que outras vias responsáveis pela angiogênese poderão no futuro ser alvos de drogas-alvo direcionadas.

Um estudo que corrobora essa discrepância entre hiperexpressão de fatores pró-angiogênicos e prognóstico, foi o trabalho de LIDGREN et al. (2006), com em amostras de CCR por TMA, que demonstrou que maiores níveis de HIF-1 $\alpha$  se correlacionaram com melhor prognóstico em pacientes com CCR de células claras.

- **As Sintases do Óxido Nítrico (NOS – do inglês Nitric Oxide Synthase)**

As Sintases do óxido nítrico são de três tipos: Neuronal, Induzida e Endotelial. Têm papéis antagônicos em diversas neoplasias malignas, podendo estar relacionadas a fenômenos como a neovascularização, a promoção da angiogênese e o aumento da permeabilidade capilar ou mesmo a vantagens adaptativas ou inibições competitivas para as células neoplásicas (CARVALHO 2002).

As três isoformas das NOS são subdivididas em dois tipos: as constitutivas (cNOS) e as induzidas (iNOS). A NOS-1 (ou NOS neuronal) e a NOS-3 (ou NOS endotelial) são constitutivas, sendo fisiologicamente produzidas e suas ações são dependentes de cálcio e calmodulina.

A NOS-2 (ou NOS macrofágica), ao contrário, não é sintetizada fisiologicamente, mas em respostas inflamatórias ou imunitárias, estimuladas por citocinas ou por lipossacárides de infectantes e não dependentes de cálcio modulina.

A regulação das NOS-2 permite que altos níveis de NO (nmoles) possam ser produzidos e, ao contrário do que ocorre nas NOS-1 e nas NOS-3, que produzem baixos níveis de NO (pmoles). As ações das NOS podem ser antagônicas e suas ações tóxicas são decorrentes de produtos das NOS-2, ou que não ocorre com as NOS constitucionais (BEGNAMI et al. 2004).

A expressão das NOS em geral está presente nas neoplasias de pâncreas, fígado, pulmão, mama, bexiga, sistema nervoso central, próstata, linfomas, esôfago, tumores ginecológicos, de cabeça e pescoço e do sistema nervoso central (SOINI et al. 2000).

O óxido nítrico (NO-do inglês Nítric Oxide) é produzido em tecidos de mamíferos através de uma reação catalisada pelas NOS. Uma das ações do NO pode ser a indução da atividade antitumoral da interleucina 2. Como a interleucina 2 é droga utilizada na terapêutica anti CCR, conhecer as ações das NOS é interessante.

Poucos estudos correlacionam a expressão imunoistoquímica das NOS em CCR. Num deles, *in vitro*, foi demonstrado que a atividade das NOS foi reduzida em células de CCR em comparação ao tecido renal normal e foi inversamente proporcional ao grau. Quando as linhagens celulares foram tratadas com indução com citocinas ou com enxertia de NO, a atividade das NOS nestas células se elevou (JANSSON et al.1998).

A expressão da NOS-induzida (iNOS) por imunohistoquímica, RT-PCR e NADPH-diaforese, se manteve em tecido renal normal e se reduziu

nos casos de CCR, especialmente nos de alto grau nos experimentos de RENAUDIN et al. (2004).

HARA et al. em 2003, verificaram em 50 espécimes cirúrgicos de CCR, que a iNOS não foi expressa no tumor primário e nas metástases. Porém foi expressa em 6 de 11 casos com trombos tumorais e se correlacionou a pior prognóstico em relação aos casos com trombos sem sua expressão.

Em linhagens celulares de CCR submetidas à hipóxia, obteve-se expressão do RNA mensageiro (RNAm) da iNOS e de sua proteína. Esses dados sugerem um importante papel dessa NOS nos processos de adaptação à hipóxia e de invasão venosa e de trombos no CCR (HARA et al. 2003).

- **As Metaloproteases da Matriz Extracelular (MMP - do inglês Matrix Metalloproteinases)**

As MMP (tipos 2 e 9, principalmente) são enzimas relacionadas à digestão da membrana basal e podem contribuir para a invasibilidade vascular de células neoplásicas nos mecanismos de metástases (MADEIRA CAMPOS 2003).

Os níveis de MMP-2 e MMP-9 também estão associados a processos de neovascularização. ZHANG et al. (2002) avaliaram os papéis do VEGF, MMPs 2 e 9 no CCR. Verificaram que 74,3% das células neoplásicas expressaram o VEGF (expressão citoplasmática) e 41,4% e 27,1% expressaram respectivamente a MMP-2 e a MMP-9. O mesmo grupo

demonstrou estreita correlação entre níveis elevados de expressão da MMP9 e do VEGF ( $p < 0,001$ ), além de correlação com grau ( $p < 0,05$ ) e com a densidade de microvasos (MVD), permitindo especular um papel importante da MMP9 no processo angiogênico do CCR (ZHANG et al. 2004)

Outros estudos demonstraram correlação das MMP-2 e MMP-9 com estágio, grau, e mau prognóstico (KUGLER et al. 1998; KAMIA et al. 2003) e que a relação MMP/TIMP (entre as MMPs e seus inibidores -TIMP Tissue Inhibitors of MPs) é positiva nos tumores mais avançados.

Numa análise univariada de 57 portadores de CCR (TAKAHASHI et al. 2002), a sobrevida câncer específica (SCE) foi menor quando os níveis da MMP-2 ativada, bem como sua razão de ativação e os níveis da MMP-9 estavam elevados. Nos portadores de neoplasias confinadas ao órgão e naqueles com metástases, as MMPs e suas razões de ativação não exerceram impacto. Nos pacientes de estágio III, altos índices da razão de ativação da MMP-2 e da MMP-9 ativa influenciaram a mortalidade específica, sugerindo a possibilidade de drogas anti-MMP para pacientes deste grupo. Porém na multivariada, apenas estágio ( $P = 0,0099$ ) e grau ( $P = 0,002$ ) foram preditores de evolução clínica de modo independente (TAKAHASHI et al. 2002).

Um estudo de 178 casos de CCR (16 casos com tecido congelado a fresco) demonstrou que as MMP 2, 9, 11, 14 e 16 foram expressas em menores índices nos CCR de células claras convencionais em comparação aos CCR cromóforos. As MMP 11 e 16 foram fortemente expressas nos CCR papilíferos. A MMP-9 correlacionou-se significativamente com a

sobrevida livre de doença (SLD) ( $p=0,001$ ) na univariada e com SLD na análise multivariada ( $p=0,0054$ ) (CHO et al. 2003)

Similarmente, KALLAKURY et al. (2001) verificaram maiores níveis de expressão das MMP2 e MMP9 e de seus inibidores (TIMPs) nos carcinomas renais tipo papilíferos e de padrão sarcomatóide em comparação aos CCR de células claras ( $p=0,001$  e  $p= 0,003$ , respectivamente). A maior expressão das MMP ocorreu nos tumores de maior grau ( $p=0,001$ ). Embora na análise univariada, todos os marcadores hiperexpressos se associaram a pior sobrevida, na multivariada, apenas o estágio e paradoxalmente, os níveis elevados da TIMP1 se correlacionaram com menor sobrevida.

Num estudo Imunoistoquímico de tecido parafinado, YAGASAKI et al. (2003) avaliaram os níveis de VEGF, MMP2, TGF- $\beta$ 1 (fator transformador de crescimento  $\beta$ -1) e a densidade de microvasos (DMV) em portadores de CCR. Na análise multivariada, apenas a DMV foi um fator prognóstico independente de sobrevida. A MMP2 se correlacionou com tamanho e estágio, mas não com grau. Já o VEGF se correlacionou com estágio e grau. OS autores não encontraram uma correlação significativa entre a expressão do VEGF e da MMP-2, ao contrário do que foi demonstrado em neoplasias de mama (KURIZAKI et al. 1998) e ovário (DAVIDSON et al. 2002).

Analisando 232 casos de CCR localizado, KAWATA et al. (2006) notaram correlação entre níveis de expressão da MMP-9 e a sintomatologia. Os casos MMP-9-positivos se associaram com um acréscimo de 2979% no risco de ocorrência de sintomas sistêmicos significativos. Similarmente, no mesmo ano, um estudo com 132 pacientes com CCR confinados ao órgão,

demonstrou que a imunorreatividade aumentada da MMP2 e da MMP9 se correlacionaram com a presença de sintomas, em comparação ao pacientes com diagnóstico incidental. Neste estudo as expressões de bcl-2 e do Ki-67 não apresentaram diferenças entre pacientes sintomáticos ou não e a sintomatologia se associou a menores taxas de sobrevida específica (HARADA et al. 2006).

Em 120 pacientes com CCR de células claras incidental, a forte expressão de MMP9 incrementou em 774% o risco da ocorrência tumores de grau  $\geq 3$  ( $p = 0,017$ ) e foi um fator prognóstico de sobrevida independente na regressão de Cox ( $p = 0.0028$ ). Níveis elevados do TIMP-2 (inibidor tissular da MMP-2) também tiveram impacto na sobrevida. Deste modo, apesar do bom prognóstico de CCR incidentais, os autores propõem para pacientes deste grupo, com alto grau e/ou com expressões aumentadas de MMP-9 e TIMP-2, um seguimento pós-operatório mais rigoroso (KAWATA et al. 2007).

Pela primeira vez, MIYATA et al. (2007) avaliaram o papel prognóstico da expressão IIQ da MMP-10 no CCR em 103 espécimes de nefrectomia radical. A expressão de MMP 10 se correlacionou com a DMV (CD34) e com o IP (índice proliferativo) (Ki67), contabilizados por um programa de computador. A MMP-10 foi expressa no citoplasma e não no estroma, com positividade em 43,7% dos casos, sendo mais expressa nos tumores sarcomatóides.

A MMP-10 se correlacionou com grau ( $p=0,006$ ) e estágio ( $p<0,001$ ) e foi fator independente para estádios T avançados na multivariada.

Verificaram correlação da MMP 10 com DMV ( $p=0,022$ ) em univariada, mas não com tamanho tumoral ou IP. A MMP-10 teve impacto na sobrevida em análise univariada, mas não na multivariada (MIYATA et al. 2007). Os autores acreditam que esta MMP possa ter algum papel nos processos de invasão neoplásica, o que poderia ser levado em conta na elaboração de drogas contra estes alvos (TIMPS- inibidores tissulares das MMPS)

- **A Densidade de Microvasos (DMV)**

Uma vez que o CCR é neoplasia hipervascularizada e que o mecanismo de angiogênese é de fundamental importância, é interessante a análise da densidade de microvasos (DMV) dessas neoplasias.

O Conceito de DMV, conforme proposto por WEIDNER et al. (1991) em várias neoplasias sólidas geralmente demonstra que tumores com maiores índices de DMV, apresentam pior prognóstico, pois teoricamente teriam maior acesso à corrente sanguínea, com maior possibilidade de disseminação.

Embora o CCR seja um dos tumores malignos mais hipervascularizados, o equilíbrio entre proliferação celular e vascularização nem sempre é estável e a literatura tem mostrado resultados conflitantes, ora correlacionando os maiores índices de DMV a maior risco de metástases e pior sobrevida, ora correlacionando-os à melhor evolução, permanecendo a controvérsia.

Recentes estudos mostram valor prognóstico da densidade de microvasos (DMV) em CCR (NATIV et al. 1998; YOSHINO et al. 2000). Outros correlacionaram a DMV e fatores de mau prognóstico, PARADIS et al.

(2000) demonstraram que a sobrevida em CCR está diretamente associada aos níveis de DMV. DEKEL et al. (2002) correlacionaram maiores índices de DMV ou presença de IVM com maior risco de metástases em CCR.

Embora o tamanho tumoral seja um fator prognóstico importante, eventualmente, um pequeno tumor hipervascularizado, pode ter pior prognóstico que um tumor de maiores dimensões, porém hipovascularizado. Num estudo pioneiro de YOSHINO et al. (1995) a DMV foi o único fator prognóstico para pacientes T1-2 N0 M0, e os níveis de DMV foram significativamente maiores nos pacientes que desenvolveram metástases do que naqueles livres de doença em 3 anos.

Em 1998, YOSHINO et al. analisaram a correlação entre a contagem de microvasos (expressão imunoistoquímica através do fator VIII) e o tamanho tumoral dividido em três grupos ( $\leq 3,0$  cm , 3,1 a 10 cm e  $> 10$  cm) em 62 pacientes com CCR. A DMV foi contada em campos de aumento de 200 vezes e qualquer célula endotelial de coloração acastanhada ou agrupamento de células endoteliais separados de microvasos adjacentes foram contabilizados como um vaso. No seu estudo, a DMV ( $>30$  ou  $< 30$  microvasos por campo 200x) foi o único fator prognóstico para sobrevida em pacientes com tumores de estádios iniciais e com tamanhos menores. Na análise multivariada, a DMV elevada, ao lado da presença de metástases, invasão venosa macroscópica (IVM) e grau histológico foram significantes para sobrevida.

Em 2000, o mesmo grupo de YOSHINO et al. estudou em 96 pacientes (33 com metástases) a importância da DMV, do índice apoptótico (AI) e do

índice proliferativo (IP). O IP foi o fator prognóstico mais importante. Para o grupo todo e para os pacientes sem metástases, os valores da DMV tiveram impacto na análise multivariada para sobrevida, com piores taxas para os pacientes com DMV elevada. Quando se analisou apenas os pacientes com metástases e DMV elevada, tratados versus não tratados com interferon adjuvante, houve uma tendência melhor sobrevida para os tratados ( $p=0,067$ ).

Também numa casuística reduzida (53 pacientes), KAVANTZAS et al. (2007) analisaram a DMV, empregando fator VIII, com um sistema de análise de imagens por computador, e demonstraram correlação entre a DMV e o grau histológico ( $p<0.0001$ ). Células endoteliais isoladas não foram contabilizadas como microvasos. Foram contabilizados capilares, vênulas e arteríolas. Pacientes com tumores de maior grau apresentavam também maiores índices de DMV, com pacientes de grau 3 tendo mais do que o dobro de microvasos que os de grau 2 e cinco vezes mais que os pacientes de grau 1. Os autores discutiram a metodologia de contagem dos microvasos, pois neste trabalho um patologista treinado selecionou as áreas a serem contadas, ao contrário de outros estudos onde todo o processo de contagem é totalmente automatizado.

Num estudo de 54 casos de CCR de células claras, YILDIZ et al. (2007) determinaram a DMV através do marcador CD 34 e a correlacionaram com fatores prognósticos como grau, estágio e invasão venosa microscópica. A DMV foi avaliada em 10 campos consecutivos sob um aumento de 400 vezes ao microscópio óptico. O cutt-off foi 40 microvasos por campo de grande aumento. Neste estudo, ao contrário dos estudos acima, verificou-se

uma correlação inversa dos níveis de DMV com invasão venosa microscópica, metástases, tamanho e estágio tumoral. A DMV não foi um fator prognóstico independente na análise multivariada para sobrevida câncer específica. A associação de baixa DMV e presença de invasão venosa microscópica, configurou um grupo de pior prognóstico (YILDIZ et al. 2007).

Anteriormente, vários autores demonstraram que a DMV não se correlacionou com fatores clínicos patológicos (MACLENNAN e BOSTWICK 1995) e não apresentou valor prognóstico (SUZUKI et al. 2001) ou correlação com a ocorrência de metástases (SLATON et al. 2001).

Avaliando a razão destas relações inversas da DMV com prognóstico, HERBST et al. (1998) e IMAO et al. (2004) por sua vez, encontraram níveis elevados de DMV no tecido cortical renal normal. Acreditaram que o tecido tumoral renal imite em sua diferenciação o tecido cortical. Por isso, talvez pacientes com maior microvasculatura possam estar associados a neoplasias mais diferenciadas e de melhor prognóstico.

Outra especulação é que tumores com grande volume e de alto grau tendem a apresentar desbalanço entre a neovascularização e suprimento sanguíneo e a proliferação celular acentuada, resultando em necrose central e hemorragia. Isto propiciaria menores taxas de DMV em neoplasias mais avançadas (KHOELER et al. 1996).

Somam-se ainda os fatos de que as análises visuais de pequenos vasos são dificultadas mesmos com a imunoistoquímica e suscetíveis à subjetividade e à variabilidade interobservadores (MERTZ et al. 2007).

Na tentativa de esclarecer esta controvérsia, MERTZ et al. (2007) utilizaram o conceito de MVA-área de microvasculatura (do inglês, MVA microvasculature área). Utilizaram o sistema computadorizado AQUA- Análise automatizada quantitativa (do inglês, AQUA -Automated quantitative analysis) e imunofluorescência, para quantificar a MVA e a compararam com a contagem manual da DMV em 228 casos preparados pela técnica do TMA. Para tanto, os endoteliócitos foram corados com CD-34 e empregou-se uma máscara epitelial e estromal com CD-10 e vimentina.

Uma vantagem teórica da avaliação da MVA é que um grande microvaso, que usualmente é considerado como um único vaso no índice de DMV por contagem manual (impacto igual ao de um pequeno microvaso) tem na avaliação da MVA contabilizada toda a sua área, contribuindo para um maior índice de área de microvasculatura, diferentemente de um pequeno microvaso (MERTZ et al. 2007).

Os autores encontraram correlação entre MVA e DMV manual ( $p < 0,001$ ) e a MVA se correlacionou com grau histológico ( $p < 0,001$ ), estágio ( $p = 0,008$ ), presença de metástases ( $p = 0,005$ ) e com padrão sarcomatóide ( $p < 0,001$ ) e SCE ( $p < 0,001$ ). Maiores valores de DMV e de MVA também tiveram correlação inversa com sobrevida. A MVA foi significativa na análise univariada como prognóstico para sobrevida câncer específica (MERTZ et al. 2007).

Numa série com 45 casos, RAICA et al. (2007) estudaram por IHC tradicional a expressão do VEGF e a MDV com uso dos marcadores CD 31 e CD 105. Encontraram expressão do VEGF em 75,5% dos casos e apenas

correlação com tipo histológico papilífero. A DMV foi de 31,68 microvasos/campo e 20,66 microvasos/campo, para CD 31 e CD 105, respectivamente. Não registraram correlação entre a expressão de VEGF e a DMV em ambos os marcadores. (RAICA et al. 2007).

IMAO et al. (2004) demonstraram que a DMV variou de 11 a 301 microvasos por campos de aumento de 400 vezes, com significativa diferença entre casos não metastáticos e casos metastáticos ( $109 \pm 67$  versus  $58 \pm 35$ , respectivamente). As maiores taxas de DMV ( $142 \pm 54 /400x$ ) ocorreram nos menores tumores. Os autores não encontraram correlação com grau e relataram que a DMV elevada esteve associada a casos não metastáticos e os menores índices de DMV estavam correlacionados com disseminação da doença. Determinaram ainda, que o tempo de armazenamento de tecido parafinado não influenciou a positividade da reação com CD 34, mesmo por períodos superiores a 15 anos.)

- **A Densidade de vasos linfáticos (DVL)**

Os estudos da densidade de vasos linfáticos em neoplasias sólidas é algo recente. O marcador biomolecular mais empregado é o D2-40. Nesses estudos, maiores índices de DVL se correlacionaram com a ocorrência de metástases em câncer de mama (CHOI et al. 2005).

Revisando 126 casos de carcinoma de bexiga não metastáticos submetidos à ressecção endoscópica, MIYATA et al. (2006) verificaram correlação da DVL com grau, mas não com estágio. Encontraram na análise univariada, correlação da DVL com taxas de sobrevida livre de metástases.

A associação de DML e IVM elevadas constituíram fator prognóstico independente para sobrevida livre de metástases.

Em contrapartida, num estudo com 30 casos de carcinoma colorretal primário, não se encontrou correlação da DVL com fatores clinicopatológicos ou com o desenvolvimento de metástases. Porém o marcador utilizado não foi o D2-40, mas o LYVE-1 (lymph vessel endothelial hyaluronan receptor-1) (DUFF et al. 2007).

Um único estudo japonês investigou a DVL (aferida pelo D2-40) e fatores prognósticos em CCR em 107 casos. Nessa série a DMV não teve correlação com vários fatores clínicos e patológicos nem mesmo com VEGF e com IVM (IWATA et al. 2008). Desta feita, mais investigações a respeito do papel da linfangiogênese em diversos tumores sólidos (como o CCR) devem ser realizadas.

#### **1.4 O TISSUE MICROARRAY (TMA)**

O câncer é resultado de fenômenos gênicos e epigenéticos concomitantes e ininterruptos (MOHR et al. 2002; HANAHAN e WEINBERG 2004). O estudo simultâneo de vários fatores teoricamente relacionados pode ser útil na compreensão dos fenômenos oncológicos. Deste modo, a técnica do TMA (Microarranjo Tecidual, do inglês- Tissue Microarray) é atraente, pois permite a realização de painéis com múltiplos marcadores sincronicamente e sob mesmas condições operacionais. A partir daí, possibilita-se a análise de vários eventos concomitantes com mais rapidez,

menor custo e maior uniformidade técnica que nos processos imunohistoquímicos habituais (KONONNEN et al.1998; RIMM et al. 2001).

O TMA, descrito por KONONNEN et al. (1998), já foi utilizado em várias neoplasias sólidas com resultados aceitáveis. Através desta técnica, fragmentos microscópicos são obtidos dos blocos de parafina de cada caso (blocos doadores) e são transferidas para um único bloco receptor, que pode comportar até 1000 amostras. Do bloco receptor procede-se a secção de múltiplas lâminas para estudo.

Pode-se realizar uma determinada reacção de IHQ para centenas de casos com um único padrão de desparafinização, hidratação, recuperação de antígenos, incubação com anticorpos ou amplificação e reacção com cromógenos, ressaltando-se a economia de materiais e reagentes. No TMA, utilizam-se poucos microlitros de anticorpos ou reagentes em cada experimento. Numa dosagem habitualmente empregada para um caso nas técnicas tradicionais, pode-se estudar toda uma casuística com o TMA (KONONNEN et al. 1998; RIMM et al. 2001).

Embora neste método, o reduzido tamanho da amostra possa sugerir um risco de uma subavaliação, quando comparados os volume teciduais obtidos com esta técnica (0,6 mm em diâmetro; 0,282 mm<sup>2</sup> /amostra) vários artigos tem revelado valor prognóstico similar de estudos com o TMA em comparação às técnicas habituais (CAMP et al. 2000; MUCI et al. 2000; NOCITO et al. 2001; JACOBSEN et al. 2004). A confecção de mais de uma lâmina receptora com os mesmos casos (RIMM et al. 2001) e com amostras em duplicata em cada bloco receptor, permite confecção de duas a quatro

amostras de cada caso, que submetidas a o mesmo marcador, eliminam este risco hipotético.

À exceção das técnicas de PCR (Polimerase Chain Reaction), que permitem a síntese de DNA para as necessidades de pesquisa, tecidos arquivados em parafina constituem um material de uso limitado e finito. Vantagem adicional TMA é a preservação de maior quantidade de material humano arquivado nos blocos em comparação aos métodos tradicionais. (RIMM et al. 2001).

As técnicas de gene arrays e TMA têm sido preconizadas recentemente como as melhores alternativas para avaliação de múltiplos fatores quanto a prognóstico, patobiologia, respostas a tratamentos e de potenciais alvos terapêuticos moleculares em centenas ou milhares de casos de CCR (LAM et al. 2004).

Recentemente autores tem descrito a utilidade desta técnica nas pesquisas de câncer urológico (MERSEBURGER et al. 2006; SHERGILL et al. 2006) e mais especificamente no CCR (MOCH et al. 1999; LIOU et al. 2004).

## 2 OBJETIVOS

- Estudar através do emprego do TMA, as expressões imunohistoquímicas da Caderina E, Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF), das Sintases do Óxido Nítrico tipos 1,2 e 3 (NOS-1, NOS-2, NOS-3), das Metaloproteases da Matriz Extra-Celular tipo 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9), em pacientes com CCR;
- Estimar a DMV-(Densidade de Microvasos) e a DVL (Densidade de Vasos Linfáticos) intratumorais por imunohistoquímica, através da contagem digital computadorizada de microvasos (anticorpo CD 31) e de linfáticos (anticorpo D2 40);
- Avaliar o valor prognóstico das variáveis biomoleculares e das variáveis demográficas, clínicas e patológicas tendo como estimadores as taxas de Sobrevida Global (SG) e de Sobrevida Livre de Doença (SLD);
- Correlacionar as variáveis biomoleculares com as variáveis demográficas, clínicas e anatomopatológicas selecionadas;
- Avaliar um Modelo Multivariado Hierárquico (MMH) de avaliação de risco de progressão ou recidiva de doença e de morte nesta população.

### **3 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

Foram selecionados os prontuários do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) e o material em arquivo anatomopatológico de portadores de CCR, tratados inicialmente por cirurgia no Departamento de Cirurgia Pélvica do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital A.C. Camargo, entre 1980 e 2005, num total de 110 pacientes, de acordo com critérios de inclusão e exclusão abaixo:

#### **3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

CCR comprovado histologicamente

Tratamento cirúrgico inicial para o CCR, sem tratamentos prévios.

Ausência de outra neoplasia maligna em atividade (exceção aos carcinomas baso e espinocelular de pele).

#### **3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Pacientes tratados em outros serviços

Pacientes submetidos a outros tratamentos para o CCR antes da cirurgia (neoadjuvância, imunoterapia, quimioterapia ou radioterapia prévias). Prontuários com dados incompletos ou faltantes.

Material arquivado em parafina em más condições para a elaboração de novos cortes para imunoistoquímica.

### **3.3 A COLETA DE DADOS**

Todos os prontuários foram revisados com as respectivas lâminas (preparadas a partir de blocos de parafina das áreas tumorais mais representativas). Os dados clínicos e epidemiológicos foram coletados e transcritos em um banco de dados específico.

As variáveis consideradas foram: idade, sexo, cor da pele, antecedentes familiares para CCR, tabagismo, performance/status de acordo com critérios de KARNOFSKY et al. (1949) (*Karnofsky Performance Status - KPS - Anexo 1*) e da (*Eastern Cooperative Oncologic Group - ECOG - Anexo 2*), estratificação de risco cirúrgico da (*American Society of Anesthesiology - ASA Anexo 3*), sintomatologia, tempo de evolução de doença, níveis de hemoglobina pré-operatórios, tipo de cirurgia, data da cirurgia, estadiamento pelo TNM AJCC/UICC 2002, topografia e tamanho da lesão em centímetros, graduação de Fuhrman (FUHRMAN et al. 1982), tipo histológico de acordo com o Consenso de Lyon da Organização Mundial da Saúde de 2002 (EBLE et al. 2004; MERINO et al. 2004; GRIGNON et al. 2004, DELAHUNT e EBLE 2004; STÖRKEL et al. 2004; SRIGLEY e MOCH 2004; DAVIS 2004; ARGANI e LADANYI 2004;), presença de trombos venosos macroscópicos, invasão da gordura perirrenal, acometimento linfonodal, invasão de órgãos adjacentes, IVM (A IVM-invasão venosa

microscópica foi positiva quando havia, ao microscópico ótico, êmbolos neoplásicos no interior de estruturas vasculares), invasão linfática microscópica, presença de necrose, evolução pós-operatória, tempo de seguimento, ocorrência e topografia de metástases e data de sua detecção, tratamento das metástases, situação clínica ao final do estudo, emprego de transfusão, além das análises da Caderina-E, do VEGF, das NOS-1, NOS-2 e NOS-3, das MMP 2 e MMP9, da DMV e da DL.

### **3.4 A CONFECÇÃO DAS LÂMINAS E DO TMA**

As lâminas originais de todos os casos coradas em H&E foram revisadas pelo Serviço de Anatomia patológica (Dra. Isabela Werneck da Cunha e Prof. Dr. Fernando Augusto Soares). Nesta revisão, procedeu-se a reclassificação anatomopatológica das variáveis em estudo de acordo com os critérios previamente estabelecidos.

#### **3.4.1 Técnica de preparo do TMA (Tissue microarray)**

Os 110 blocos de parafina doadores com amostras dos tumores designados por seus números de registro de laudo anatomopatológico correspondentes foram inclusos na construção de um bloco receptor.

O bloco-receptor de parafina de TMA (Beecher Instruments, Silver Spring, MD), foi elaborado a partir de amostras colhidas dos blocos-doadores originais, com agulha de um milímetro de diâmetro (TM Arrayer punch MP10-1,0 mm), após a prévia escolha e marcação de área

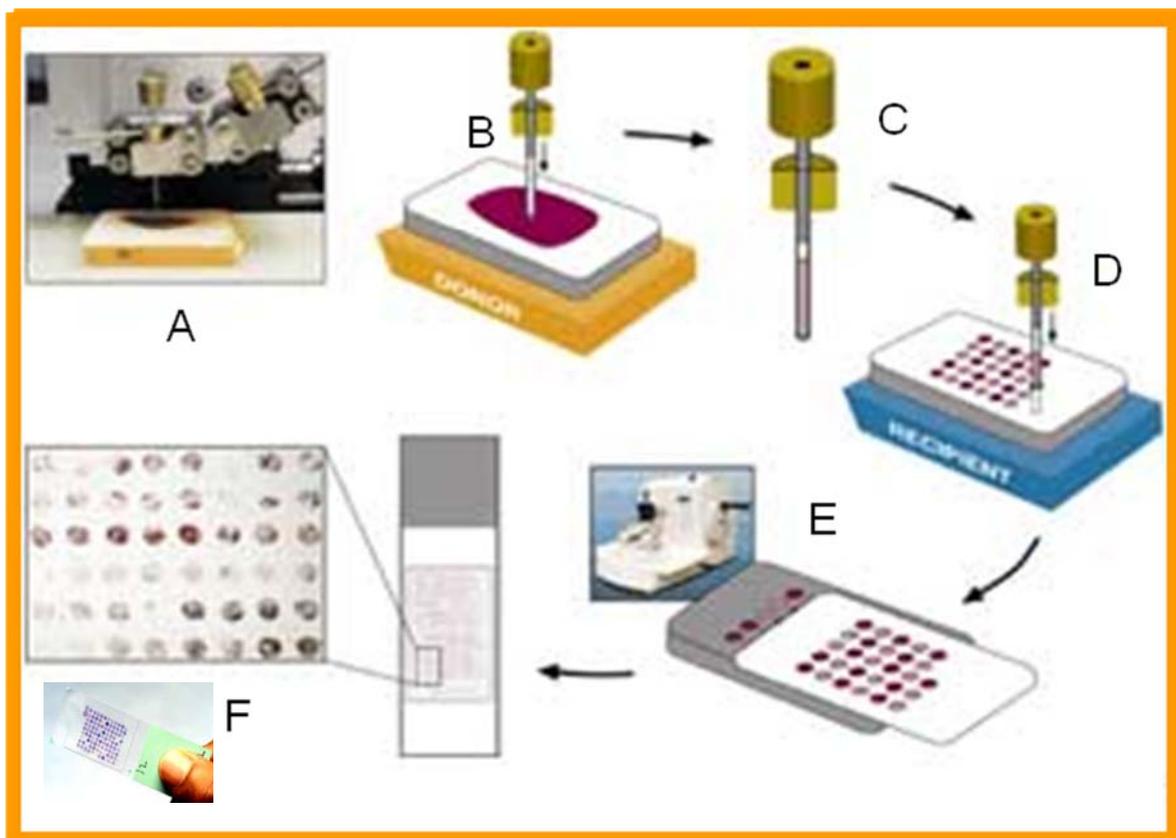
representativa da neoplasia, a partir da lâmina de Hematoxilina Eosina (H&E) original (Figura 4). Foi considerado como suficiente, um mínimo de 10% do diâmetro total de um caso contendo os critérios de elegibilidade de graus e padrões histológicos para o diagnóstico de carcinoma de células renais. Os seguintes subtipos histológicos de CCR foram observados: células claras, papilífero, cromóforo, gene TFE3, ductos coletores e subtipo inclassificável.

Consideramos todos os critérios morfológicos e quantitativos necessários, segundo a literatura, para o diagnóstico definitivo.

Foram realizados *punches* em duplicata (dois cores de cada caso) do bloco de parafina doador e inseridos no bloco de parafina receptor, contendo assim, duas áreas diferentes da neoplasia em cada caso. Efetuamos cortes histológicos de 3 a 4 $\mu$  de espessura do bloco de parafina receptor, até todo o seu desgaste, obtendo-se um total de 100 lâminas numeradas seqüencialmente a partir de “um”. Em seguida para cada reagente, realizamos a reação em duas lâminas, obtidas de níveis diferentes do bloco doador. Neste sistema, para cada marcador estudado, dispomos de amostras em quadruplicata de cada caso.

Os produtos finais de cada reação apresentaram colorações específicas de seus reagentes e se encontraram nas regiões das células em que ocorreu a ligação do antígeno com o anticorpo primário. A Caderina E foi encontrada preferencialmente nas membranas das células epiteliais e tumorais. As MMP (MMP-2 e MMP-9), As NOS (NOS2 e NOS3) e o VEGF,

tiveram expressão preferencialmente citoplasmática. A NOS-1 teve expressão nuclear (Figuras 8 a 23).



**Fonte:** GILTNANE e RIMM (2004).

**Legenda:** Em sentido horário, visualizamos: A: Fotografia do aparelho. B: Representa a agulha perfurando e retirando o cilindro de tecido do bloco doador (cor de vinho). C: Representação da agulha com cilindro tecidual em seu interior. D: Demonstra a inserção da agulha contendo o cilindro de tecidual que será introduzido num dos orifícios do bloco receptor (em branco), como se fosse "macho e fêmea". E: Lâmina resultante da secção do bloco receptor pelo micróscopo (fotografado em no detalhe). A secção de cada cilindro origina um disco tecidual correspondente. F: TMA pronto. O detalhe mostra imagem ampliada de uma região da lâmina, com várias amostras.

**Figura 4** - Representação esquemática do processo de elaboração do TMA- Tissue Microarray.

### 3.4.2 Técnica do preparo imunoistoquímico

Os marcadores imunoistoquímicos empregados, bem suas especificações e respectivas diluições estão assinalados no Quadro 1. As lâminas selecionadas foram previamente tratadas com 3 aminopropiltrietoxi-silano (Sigma, A-3648, EUA) e deixados em estufa a 60°C por 24 horas para melhor adesão.

- **Desparafinização:** A desparafinização dos cortes foi realizada com dois banhos sucessivos de Xilol, o primeiro a 60°C por 20 minutos e o segundo, em temperatura ambiente por 20 minutos. A re-hidratação se deu em quatro banhos sucessivos de Etanol a 100%, a 95%, a 80% e a 70%, respectivamente, durante 30 segundos cada um. As lâminas foram enxaguadas em água corrente e destilada.
- **Recuperação Antigênica:** Procedeu-se então a recuperação antigênica em panela de pressão (Eterna®-Nigro). A solução tampão Citrato 10 mM pH 6,0 foi fervida na panela aberta e só então as lâminas foram mergulhadas e a panela lacrada, com válvula de segurança aberta. Após a saída do vapor saturado, a válvula foi abaixada e a panela pressurizada. As lâminas permaneceram por quatro minutos após a pressurização. A panela ainda fechada foi esfriada por 10 minutos em água corrente e depois de destampada, foi deixada por 10 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas novamente em água corrente e destilada.
- **Bloqueio da Peroxidase Endógena:** A peroxidase endógena foi bloqueada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (água oxigenada a 10 vol), com quatro trocas de

cinco minutos cada. Nova lavagem em água corrente destilada e na seqüência um banho com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-Phosphate buffered saline) 10 mM pH 7,4 por cinco minutos.

- **Incubação dos anticorpos primários:** As reações para identificação dos marcadores foram realizadas utilizando o complexo estreptavidina-biotina.

As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma A9647, EUA) e Azida Sódica (NaN<sub>3</sub>) 0,1%, por 18 horas a 4 °C em câmara úmida.

- **Incubação dos anticorpos secundários:** As lâminas foram novamente lavadas em tampão PBS, com três trocas de três minutos cada e então incubadas com o anticorpo secundário biotilado feito em cabra anti-imunoglobulinas de camundongo e coelho do kit Strept ABC Complex/HRP Duet (mouse/rabbit) (Dako A/S, K 492, Dinamarca), no título pré estabelecido 1: 200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C. Nova lavagem em tampão PBS com três trocas de três minutos cada.
- **Incubação com streptavidina-biotina-peroxidase:** As lâminas foram então incubadas com o complexo estreptavidina e biotina marcadas com peroxidase nos títulos de 1: 200, diluídos em PBS, por 30 minutos a 37°C para amplificação das reações.
- **Revelação das reações com cromógenos.** As reações foram reveladas através da incubação das lâminas em solução substrato

cromógena de Tetrahydrocloro de Diaminobenzidina (DAB) 60mg% (Sigma, D- 5637 EUA); 1 ml de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6% (água oxigenada 20 vol); 100 ml de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Nova lavagem em água corrente e destilada por três minutos.

- Os cortes foram contracorados com Hematoxilina de Harris por um minuto. Após nova lavagem em água corrente e destilada, as lâminas foram diferenciadas em água amoniacal (solução de Hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente destilada.
- **Desidratação das lâminas:** Na seqüência as lâminas foram desidratadas com banhos sucessivos de Etanol a 80%, a 95%, a 100%, por 30 segundos cada um, e em quatro banhos de Xilol de 30 segundos cada.
- Procedeu-se então a montagem das lâminas em Entellan (Merck, 107961, Alemanha).
- **Controles positivo e negativo:** A fidelidade das reações sempre foi atestada através de controles positivos em tecidos sabidamente positivos para os anticorpos estudados (tecido hepático ou tonsilas palatinas ou pele) e de controle negativos, obtidos pela omissão dos anticorpos primários.

**Quadro 1** - Anticorpos empregados, com respectivos clones, títulos, nomes de fabricantes e códigos.

<b>Anticorpos</b>	<b>Clones</b>	<b>Títulos</b>	<b>Fabricantes</b>
Anticorpo policlonal de coelho contra caderina- E	Ab5330	1:3000	Sigma®, EUA. Código c-3678
Anticorpo Monoclonal de camundongo contra metaloproteases da matriz extracelular NMP-2 (Ab-4)	75-7F7	1:40	Oncogene®, EUA. Codigo IM51L
Anticorpo Monoclonal de camundongo contra metaloproteases da matriz extracelular NMP-9 (Ab-3)	56-2A4	1:80	Oncogene®, EUA. Codigo IM37L
Anticorpo Monoclonal de camundongo contra sintase do óxido Nítrico NOS-1 humana	N31030	1:100	Transduction laboratories® Lexington, KY,EUA
Anticorpo Monoclonal de camundongo contra sintase do óxido Nítrico NOS-2 humana	N32020	1:20	Transduction laboratories® Lexington, KY,EUA
Anticorpo Monoclonal de camundongo contra sintase do óxido Nítrico NOS-3 humana	N30020	1:100	Transduction laboratories® Lexington, KY,EUA
Anticorpo Monoclonal de camundongo anti - CD31	JC70A	1:50	Dako ® Carpenteria, CA,EUA
Anticorpo monoclonal contra fator de Crescimento vascular endotelial VEGF	Ac monoclonal IgG 2a	1:100	Santa Cruz®, CA, EUA Código SC 7269
Anticorpo monoclonal de camundongo contra D2-40	M3619	1:100	Biogen EUA®

### 3.5 MICROSCOPIA DIGITAL

A microscopia digital foi realizada com o programa ACIS III (Automated Cellular Imaging System-Chroma Vision Medical Systems®, San Juan Capistrano Califórnia- Estados Unidos da América). Este programa tem a capacidade de reconhecer de modo rápido e sensível, centenas de níveis de intensidade das reações imunoistoquímicas e as converter em uma

escala de valores de intensidades de acordo com as colorações obtidas. O sistema promove análise de coloração e morfometria nuclear. Debris celulares, aglomerações citoplasmáticas e células mononucleares de aspecto hematológicos são excluídos pelo sistema (WANG et al. 2001).

As lâminas do TMA (e suas duplicatas), com suas respectivas reações imunoistoquímicas, foram escaneadas pelo sistema ACIS III e digitalizadas num banco de imagens. Em seguida, as imagens foram geradas num monitor de computador e foram analisadas pelos autores com auxílio de patologistas experimentados que selecionaram em maior aumento 05 áreas de maior intensidade de coloração da amostra. As áreas selecionadas foram lidas pelo programa que quantificou numericamente a intensidade de coloração pelos anticorpos nestas áreas. A intensidade final da reação de cada caso foi calculada através da média das intensidades das reações das cinco áreas selecionadas.

Para a aferição da DMV e da DVL, utilizou-se o mesmo método para cada lâmina e os examinadores selecionaram as cinco áreas com maior concentração de microvasos e linfáticos corados e a partir daí, realizaram a contagem dos mesmos com o sistema ACIS III.

Na análise da Caderina E, consideramos como expressão positiva os casos em que mais de 75% das membranas celulares se coraram por inteiro. Para os casos com coloração de 25 a 50% das membranas, consideramos expressão parcial e para os casos com coloração de menos de 25% das membranas celulares, consideramos como expressão negativa da Caderina E.

### 3.6 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

As informações coletadas foram armazenadas num banco de dados informatizado e analisadas através do programa *Statistical Package for Social Science – SPSS®* (versão 15.0).

Realizaram-se as descrições da população e das variáveis do estudo por meio de estatística descritiva (média, desvio-padrão-dp, mediana e porcentagens) (tabelas 1 a 4). As variáveis biomoleculares VEGF, NOS1, NOS2, NOS3, MMP2, MMP9 e a DMV (CD31) e a DVL (D240) foram categorizadas a partir do valor mediano em “baixa expressão” (menor ou igual à mediana) e “alta expressão” (maior que a mediana).

Nas Figuras 8 a 22 (Seção 3.7-Ilustrações) estão reproduzidas microfotografias de cada um dos marcadores biomoleculares estudados em alta e em baixa expressão imunistoquímica, bem como a DMV e a DVL.

Realizou-se a comparação de média de idade e do tamanho tumoral com a expressão dos marcadores biomoleculares respectivamente através do teste t de Student para amostras independentes e teste de Mann-Whitney. Os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk foram utilizados para verificar a aderência à normalidade das variáveis.

Verificou-se a associação entre a expressão dos marcadores biomoleculares e diversas variáveis do estudo por meio do teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, dependendo dos valores esperados nas tabelas de contingência.

Para o cálculo das probabilidade de sobrevida global (SG), considerou-se o intervalo de tempo transcorrido entre a data da cirurgia e a data do óbito ou do último seguimento. Para a sobrevida livre de doença (SLD), considerou-se o tempo transcorrido até a data da recorrência da doença. A estimativa da sobrevida livre de doença foi realizada apenas para os pacientes sem metástases à distância na admissão e aqueles cujas margens cirúrgicas macroscópicas foram consideradas sem doença. As taxas de sobrevida foram calculadas pelo estimador produto limite de Kaplan Meier, sendo as curvas comparadas pelo teste de log-rank. As variáveis com nível descritivo do teste de até 0,20 e cujos riscos eram proporcionais ao longo do tempo foram selecionadas para a análise multivariada, a qual foi realizada pelo modelo de risco proporcionais de Cox. Avaliou-se a proporcionalidade de riscos por meio dos gráficos  $\ln - \ln [S(t)]$ .

A definição de falha terapêutica diferiu para pacientes com ou sem metástases ao diagnóstico. Para pacientes sem metástases, a ocorrência de recidiva local ou distância foi considerada como falha. Para os pacientes com metástases ao diagnóstico, consideramos como a falha a progressão de doença, através da detecção de novas lesões metastáticas.

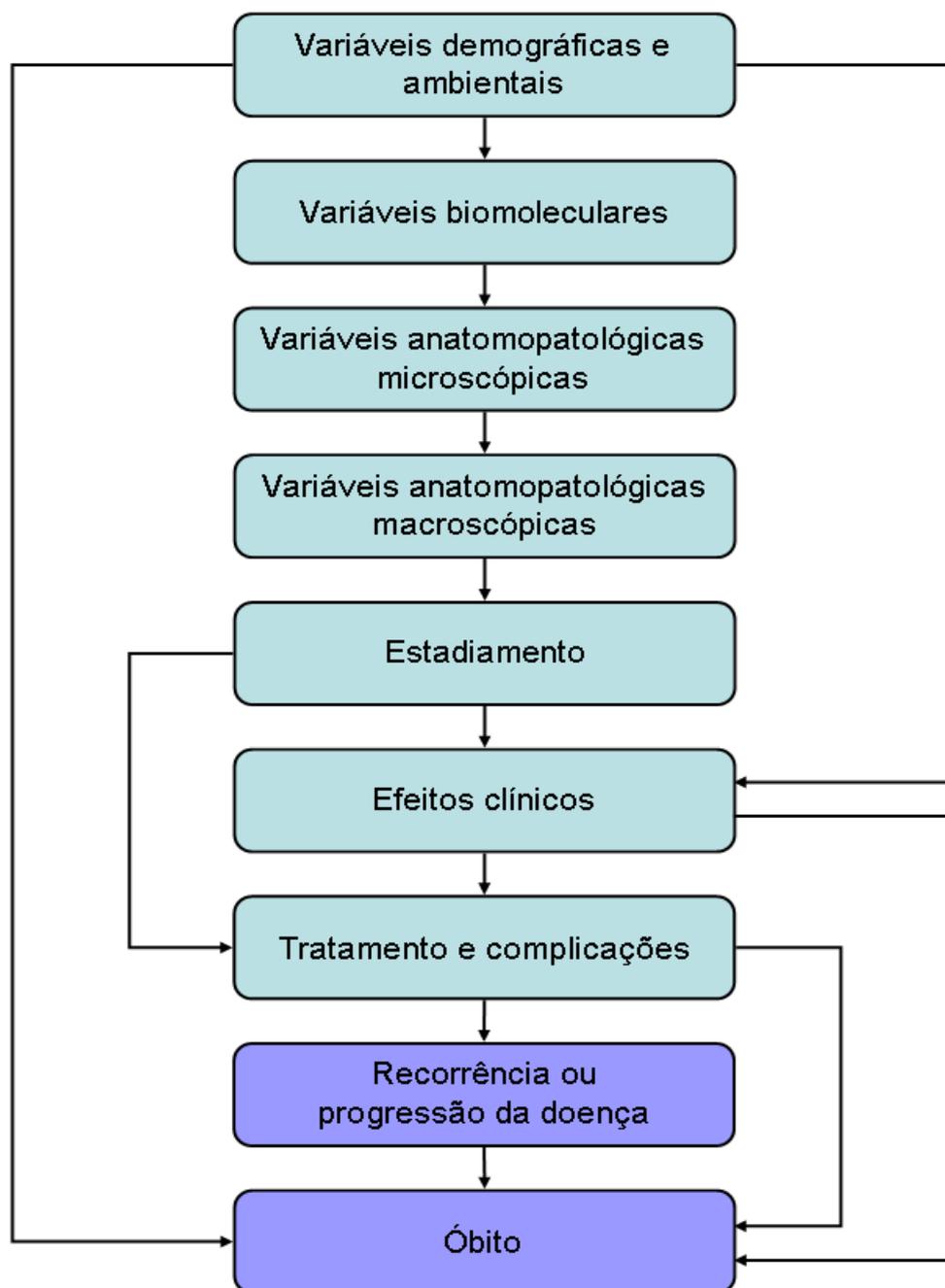
O modelo multivariado hierárquico (MMH) foi construído hierarquicamente baseando-se nos conceitos propostos por VICTORA et al. (1997). Em um modelo hierarquizado, as variáveis não são introduzidas seqüencialmente pelo valor do nível descritivo obtido na análise univariada, mas sim a partir de blocos (ou níveis) hierarquicamente relacionados. O modelo teórico proposto neste trabalho está apresentado na Figura 5 Para

explicar os desfechos (óbito e recorrência), as variáveis foram divididas em oito blocos, a saber: variáveis demográficas e ambientais, variáveis biomoleculares, variáveis anatomopatológicas microscópicas, variáveis anatomopatológicas macroscópicas, estadiamento, efeitos clínicos e tratamento. O marco teórico pressupôs que as variáveis demográficas (como a idade, sexo e cor da pele) e ambientais (tabagismo) poderiam ser responsáveis por diferenças nas expressões biomoleculares dos tumores (variáveis biomoleculares). O perfil biomolecular da neoplasia seria traduzido pelas variáveis anatomopatológicas microscópicas (como o tipo histológico, grau de diferenciação, invasão capilar, etc.), as quais determinariam as características macroscópicas do tumor (como o tamanho, invasão de órgãos adjacentes, multifocalidade, etc). O comportamento biomolecular e anatomopatológico do tumor seria resumido pelas informações contidas no estadiamento (TNM), o qual estaria diretamente relacionado com o *performance status* dos pacientes (efeito clínico da doença). O tratamento dependeria não só do estadiamento, mas também das condições clínicas do doente. A recorrência ou a progressão da doença estariam diretamente relacionadas com o tratamento oferecido e de modo indireto, às demais variáveis. Por fim, o óbito dependeria não só da recorrência ou progressão da doença, mas também de complicações inerentes ao tratamento, do *performance status* e de fatores demográficos e ambientais.

Em cada bloco realizou-se análise multivariada para a determinação dos fatores prognósticos mais expressivos. As variáveis com nível descritivo de até 0,10 foram consideradas como possíveis fatores explicativos. Para a

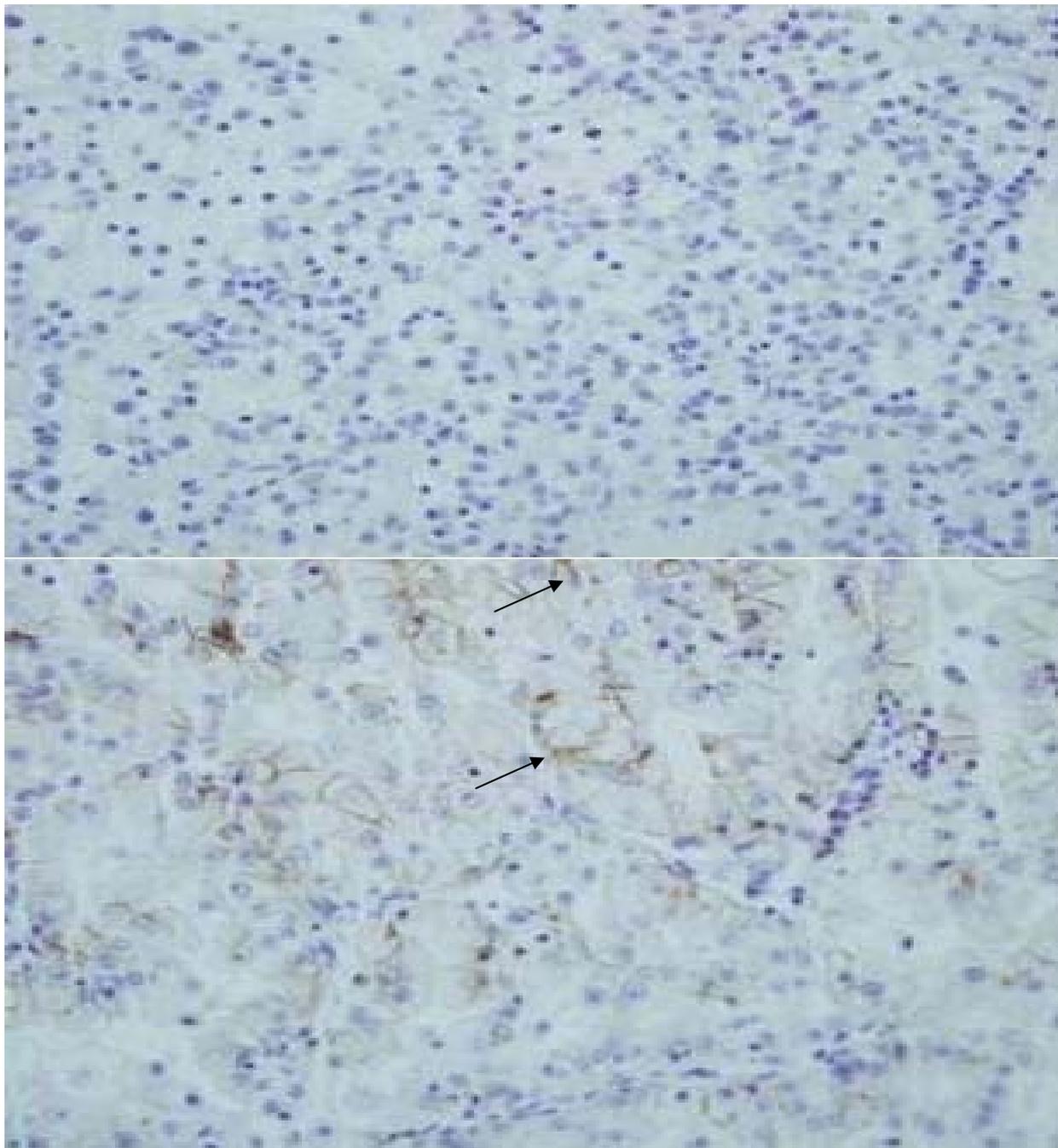
análise final, as variáveis foram colocadas seqüencialmente no modelo respeitando-se a hierarquia teórica anteriormente descrita. Tanto na análise multivariada dos blocos quanto do modelo final empregou-se a técnica de modelagem do tipo *stepwise selection*. Como a idade é uma variável nitidamente relacionada com o óbito, os fatores de risco independentes para este desfecho foram ajustados pela idade (variável contínua) no modelo final. Estimou-se o risco para recorrência e para o óbito através do *hazard ratio* obtido do modelo de Cox. Para o modelo multivariado final, o nível de significância considerado foi de 5%.

A confecção do escore do MMH para avaliar o risco de óbito foi realizada a partir dos valores dos coeficientes de regressão ( $\beta$ ) estimados para cada uma das variáveis independentes identificadas do modelo de Cox. Quando o fator de risco estava ausente, atribuiu-se valor zero e quando presente, 1, 2 ou 3, dependendo-se do valor do  $\beta$ . Para tanto, determinou-se a amplitude de variação do  $\beta$  através da diferença entre o maior e o menor ( $\Delta\beta = \beta$  máximo -  $\beta$  mínimo). Dividiu-se esta amplitude em 3 partes iguais, estando o primeiro valor de corte em  $\beta$  mínimo + ( $\Delta\beta / 3$ ) e o segundo em  $\beta$  mínimo + 2 ( $\Delta\beta / 3$ ). Atribuiu-se 1 ponto às variáveis com valor de  $\beta$  no primeiro terço da amplitude, 2 pontos no segundo terço e 3 pontos no último terço. Os valores atribuídos foram somados, chegando-se a um escore predizer o óbito.



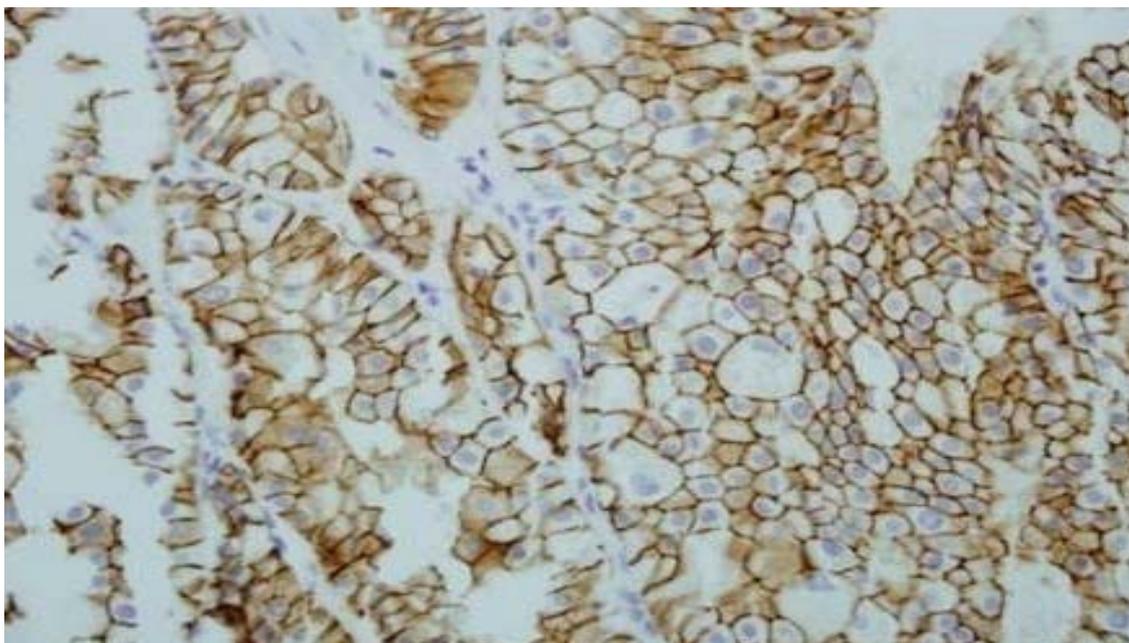
**Figura 5** - Modelo multivariado hierárquico (MMH) teórico para explicar os desfechos relacionados ao câncer.

### 3.7 ILUSTRAÇÕES- MICROFOTOGRAFIAS



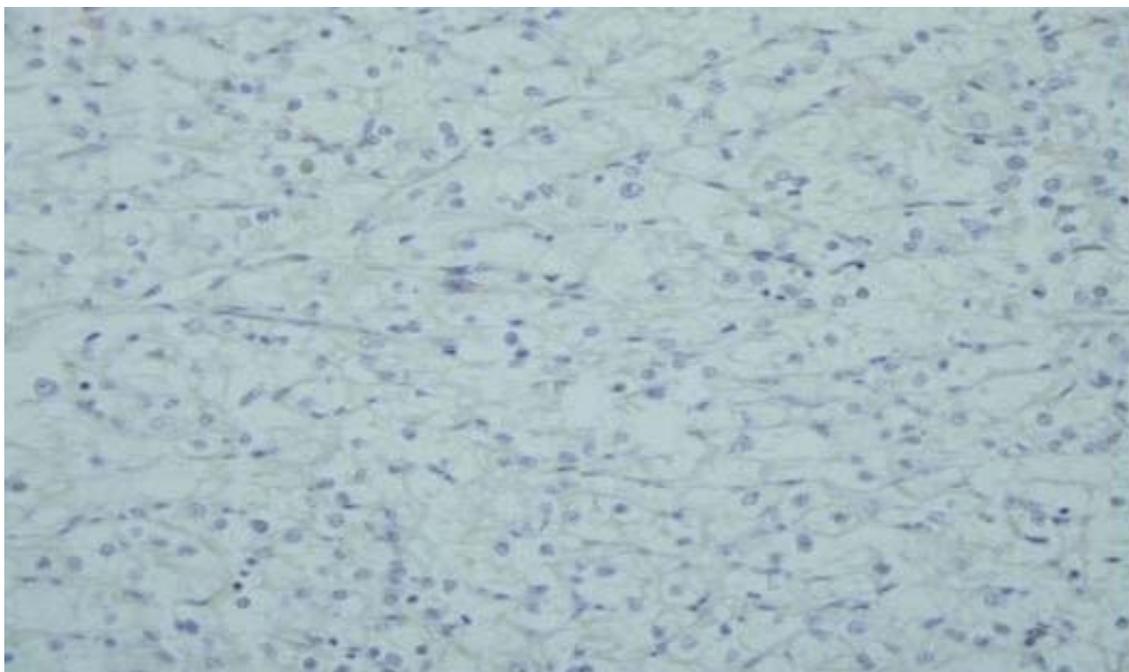
**Legenda:** No Alto, expressão negativa (menos de 25% de membranas coradas). Abaixo, verifica-se expressão parcial com algumas porções (25 a 50%) de membranas celulares de coloração acastanhada (setas).

**Figura 6-** Microfotografias (400x): Expressão imunohistoquímica da caderina E nas membranas celulares de CCR.

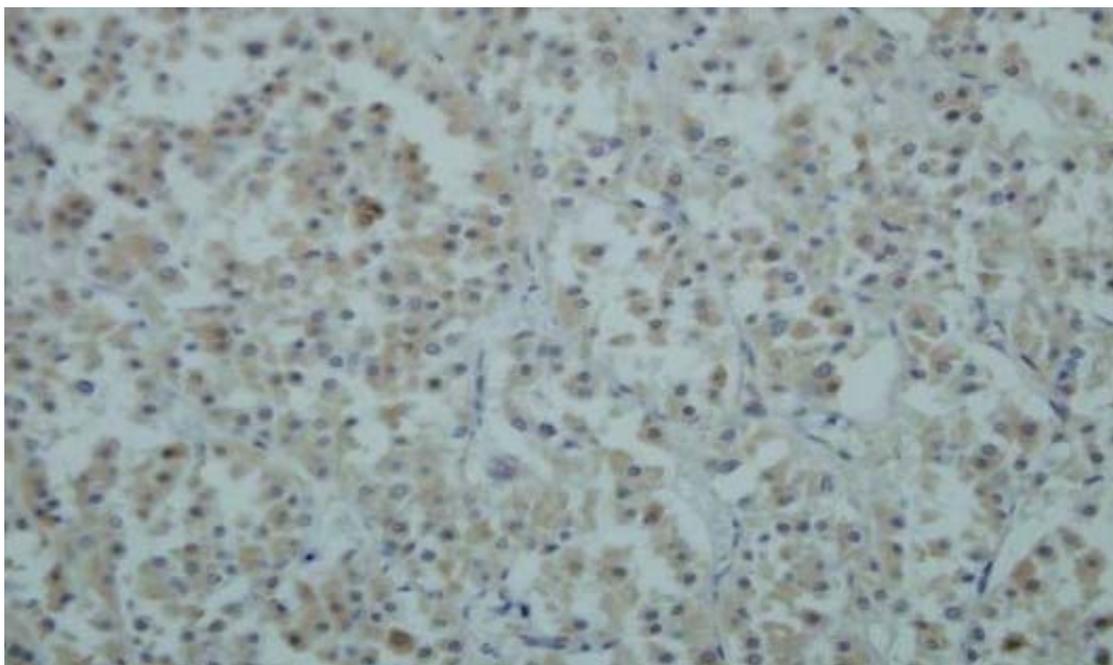


**Legenda:** Verifica-se forte expressão positiva da caderina E em mais de 75% das membranas celulares, com coloração acastanhada.

**Figura 7** - Microfotografia (400x): Expressão imunoistoquímica da caderina E em CCR.

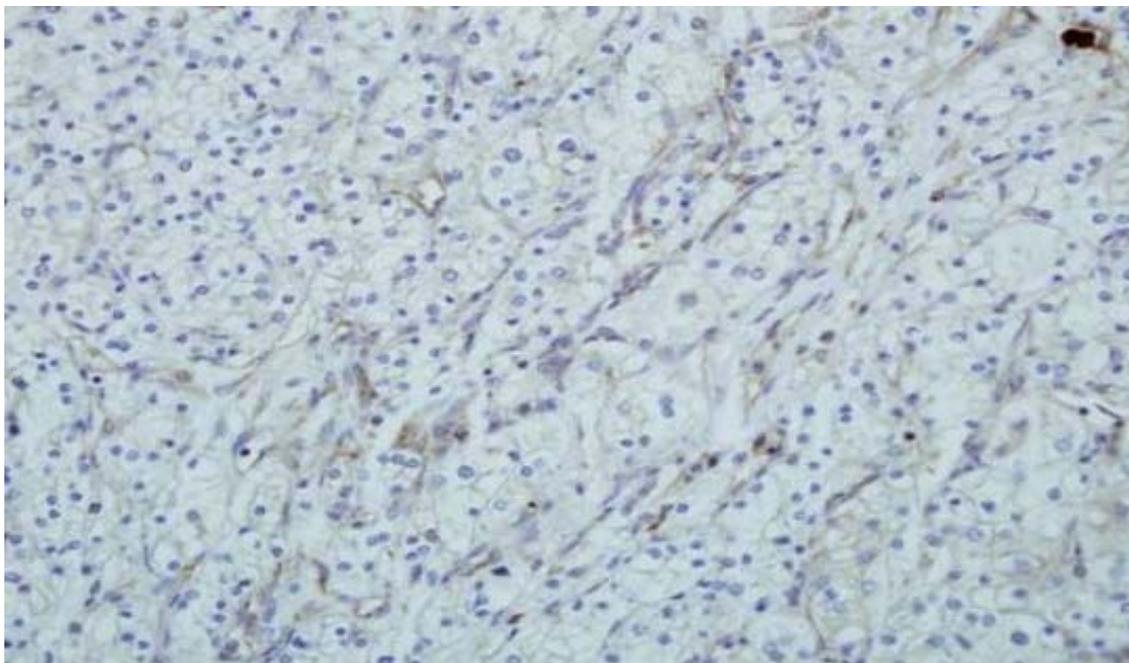


**Figura 8** - Microfotografia (400x): Expressão imunoistoquímica da MMP-2 em CCR de células claras. Baixa expressão citoplasmática.



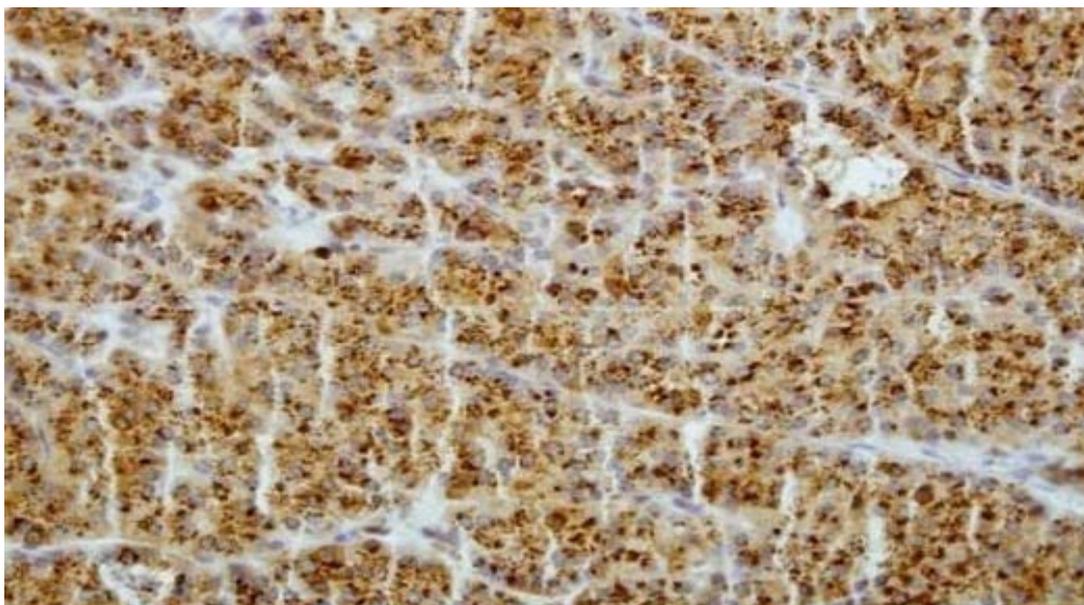
**Legenda:** Alta expressão citoplasmática (coloração acastanhada).

**Figura 9** - Microscopia (400x): Expressão imunoistoquímica da MMP-2 em CCR.



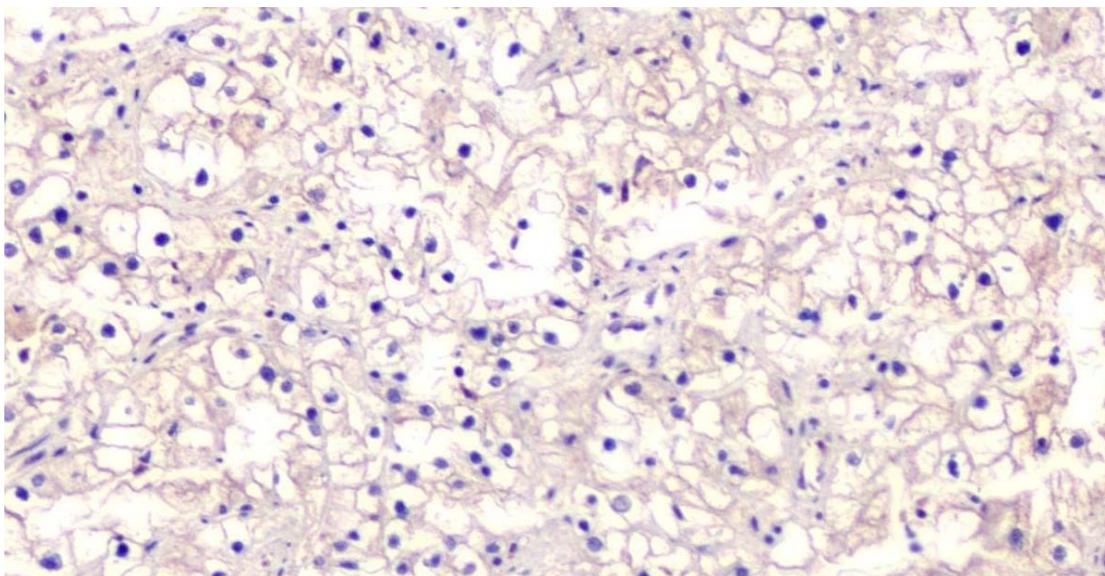
**Legenda:** Baixa expressão citoplasmática.

**Figura 10** - Microfotografia (400x). Expressão imunoistoquímica da MMP-9 em CCR de células claras.



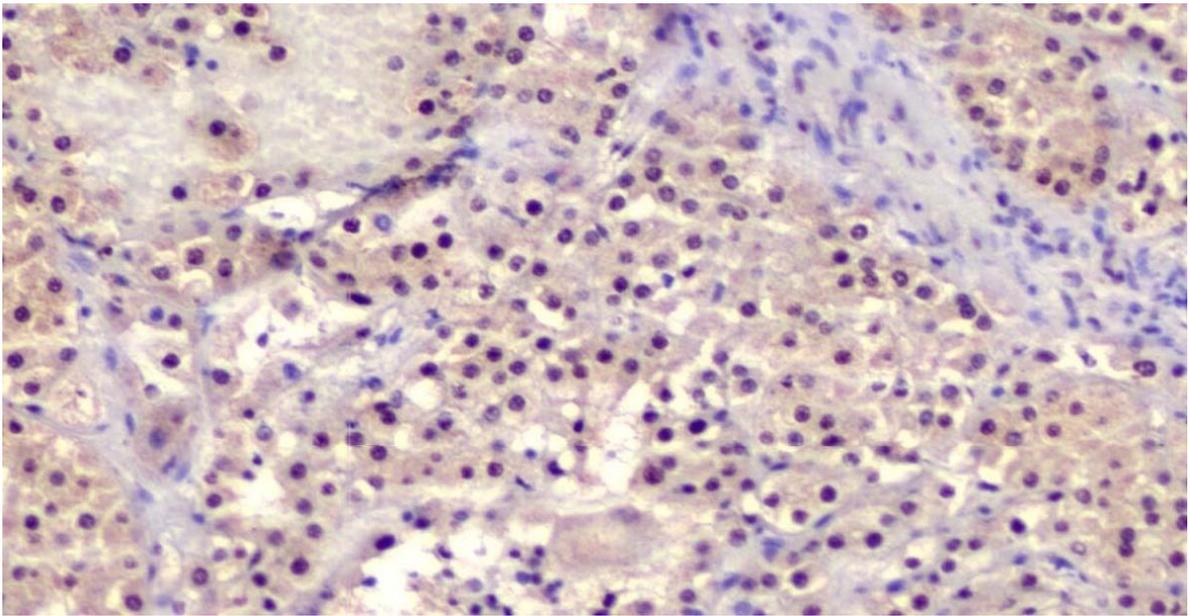
**Legenda:** Alta expressão citoplasmática (coloração marrom).

**Figura 11** - Microfotografia (400x): Expressão imunoistoquímica da MMP-9 em CCR.



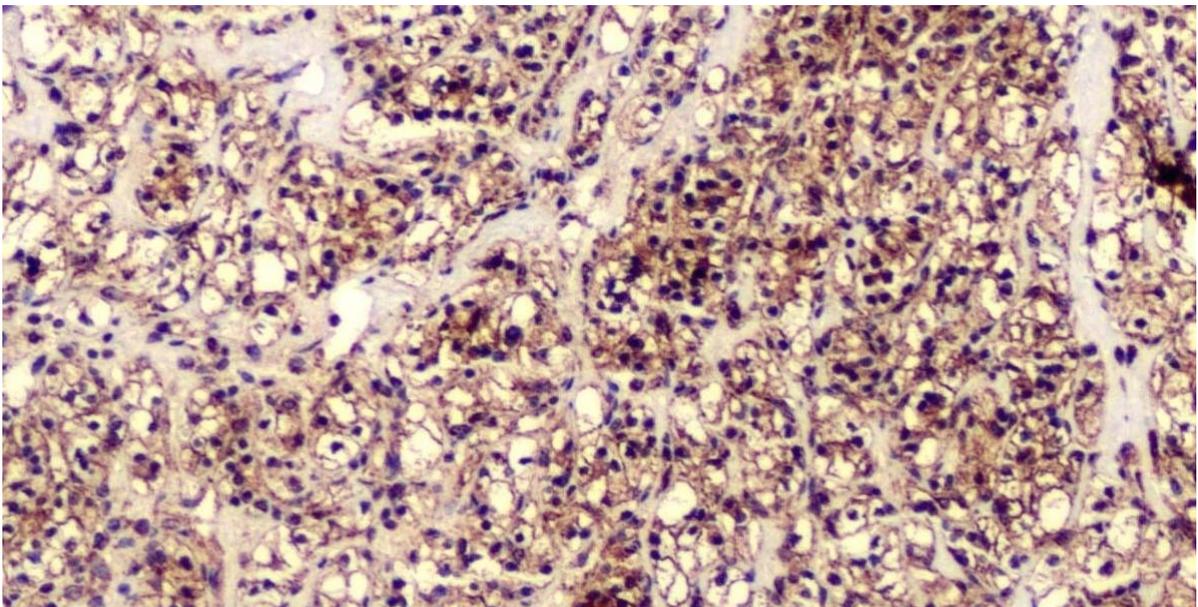
**Legenda:** Baixa expressão nuclear.

**Figura 12** - Microfotografia (400x): Expressão imunoistoquímica da NOS-1 em CCR de células claras.



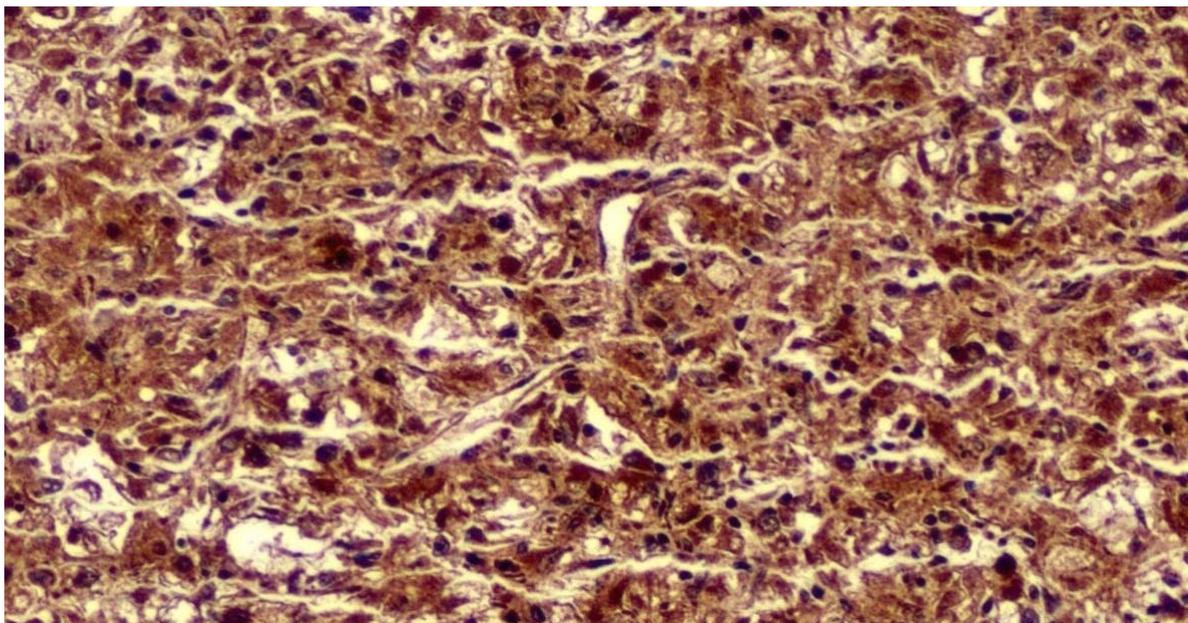
**Legenda:** Alta expressão nuclear (marrom) e menos intensa nocitoplasmática.

**Figura 13** - Microfotografia (400x): Expressão imunoistoquímica da NOS-1 em CCR.



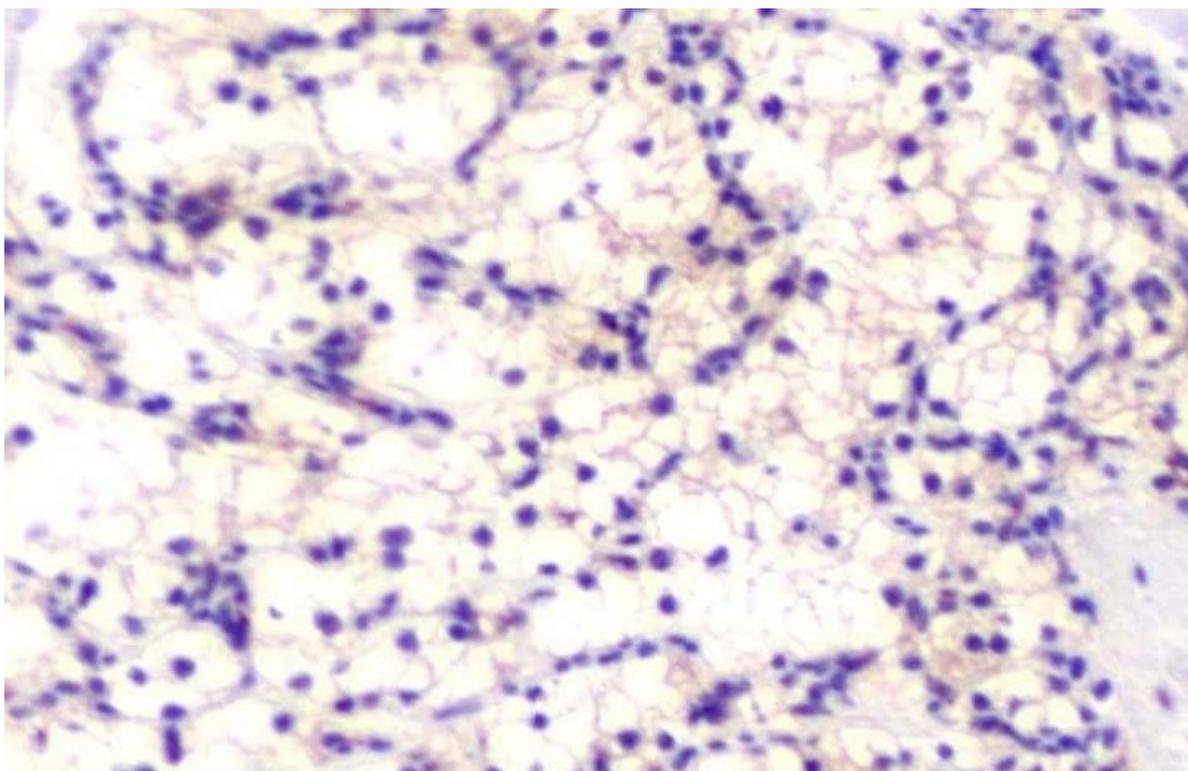
**Legenda:** Baixa expressão citoplasmática.

**Figura 14** - Microfotografia (400x): Expressão imunoistoquímica da NOS-2 em CCR de células claras.



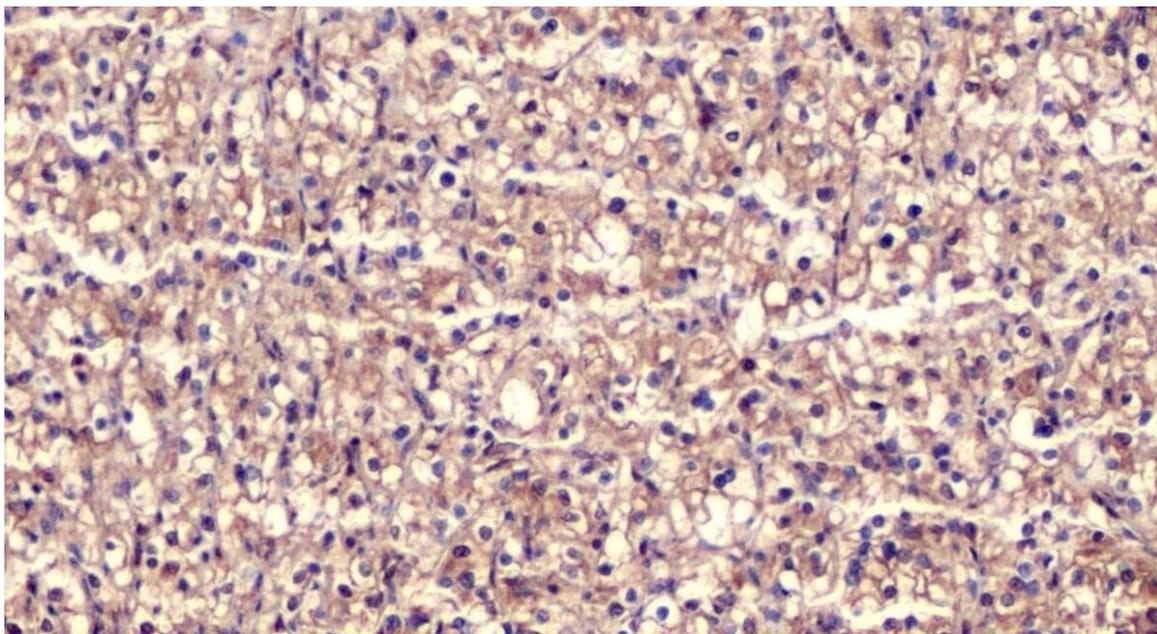
**Legenda:** Alta expressão citoplasmática (marrom).

**Figura 15** - Microfotografia (400x): Expressão imunoistoquímica da NOS-2 em CCR.



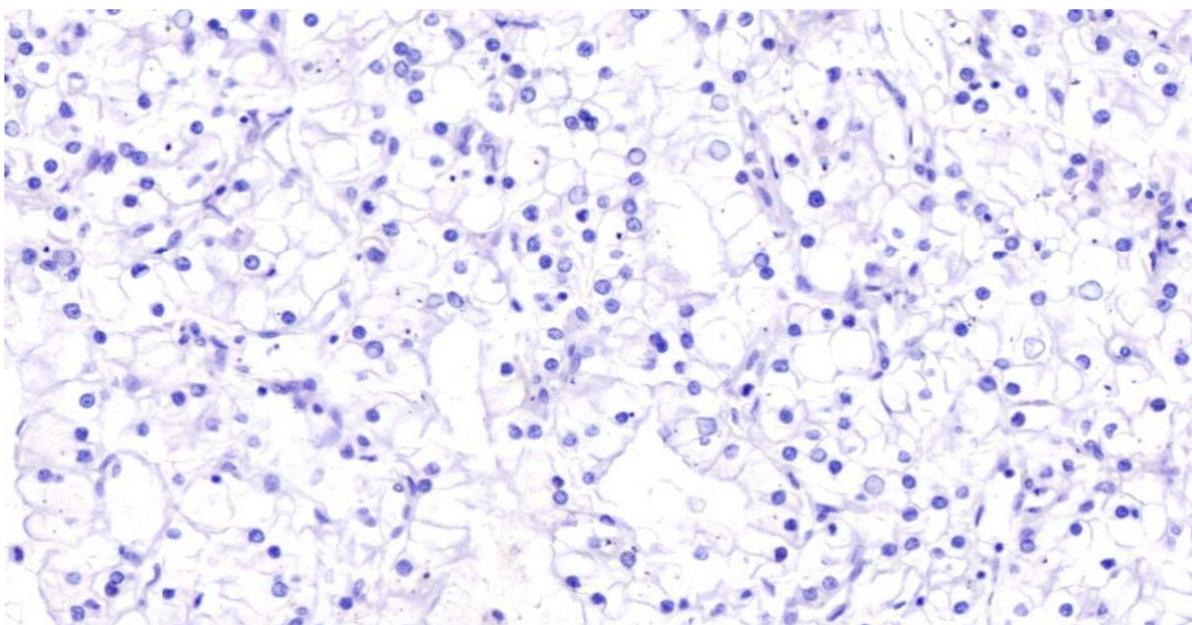
**Legenda:** Baixa expressão citoplasmática.

**Figura 16** - Microfotografia (400x): Expressão imunoistoquímica da NOS-3 em CCR de células claras.



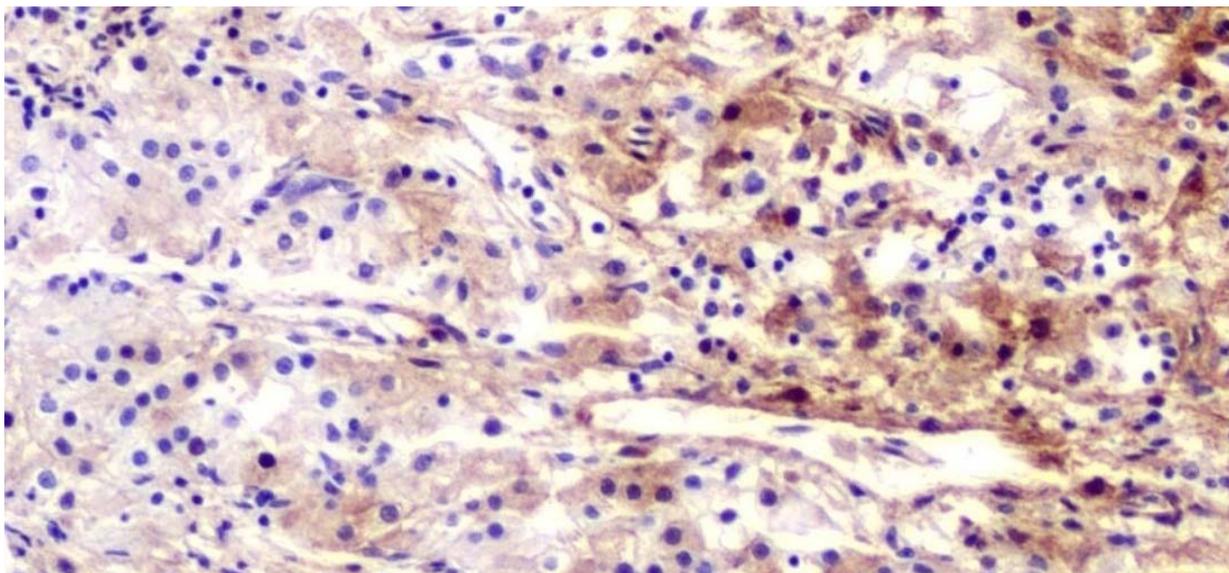
**Legenda:** Alta expressão citoplasmática (coloração acastanhada).

**Figura 17** - Microfotografia (400 x): Expressão imunoistoquímica da NOS-3 em CCR.



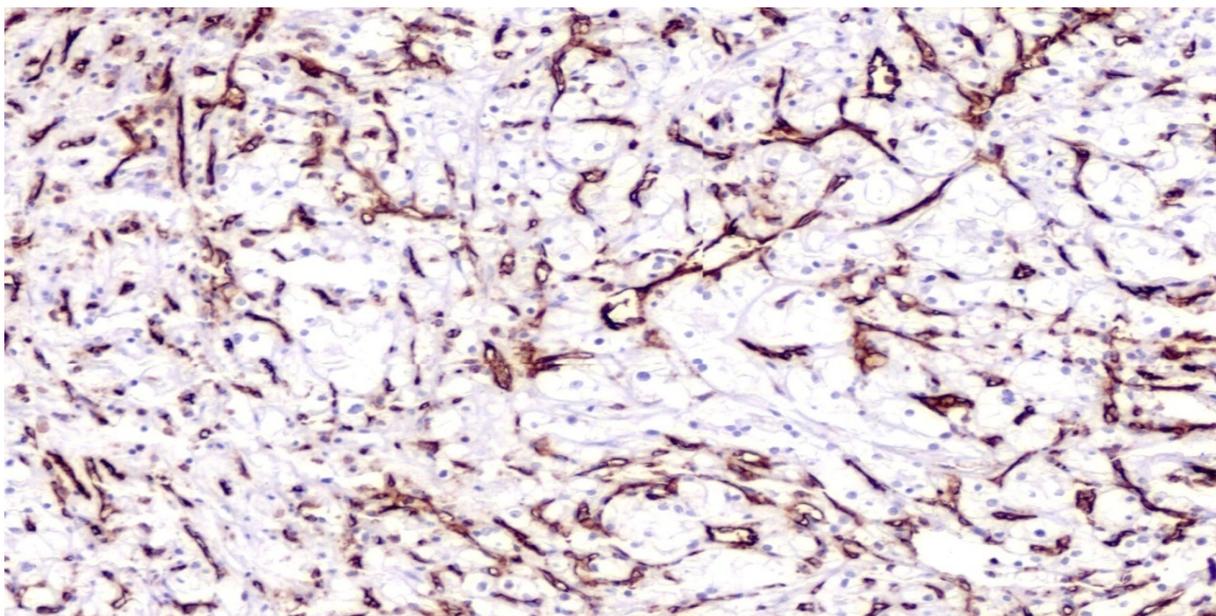
**Legenda:** Baixa expressão citoplasmática.

**Figura 18** - Microfotografia (400x): Expressão imunoistoquímica do VEGF em CCR de células claras.

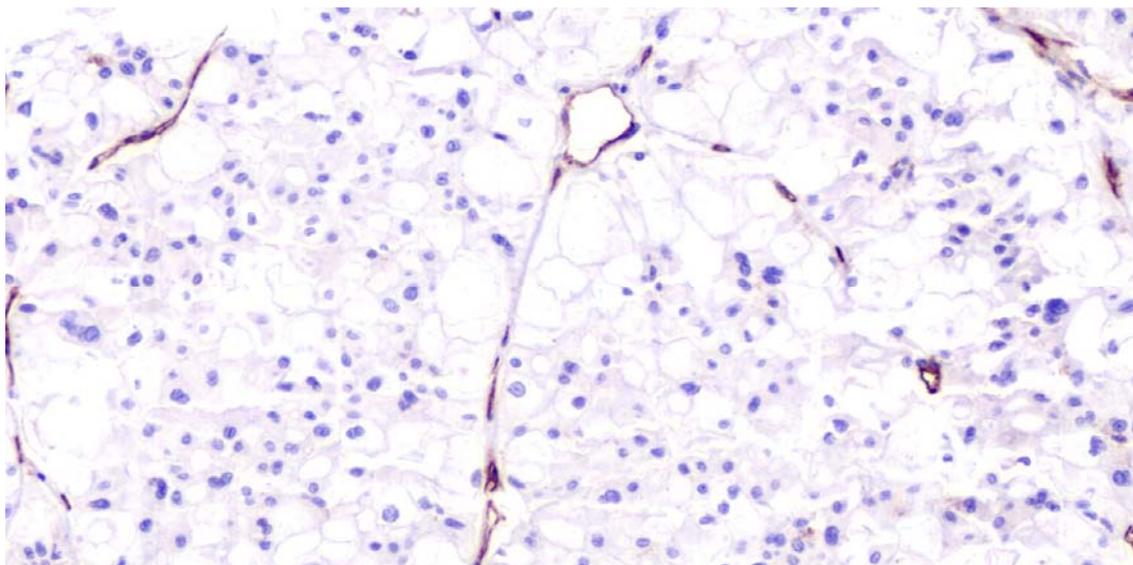


**Legenda:** Alta expressão citoplasmática (coloração acastanhada).

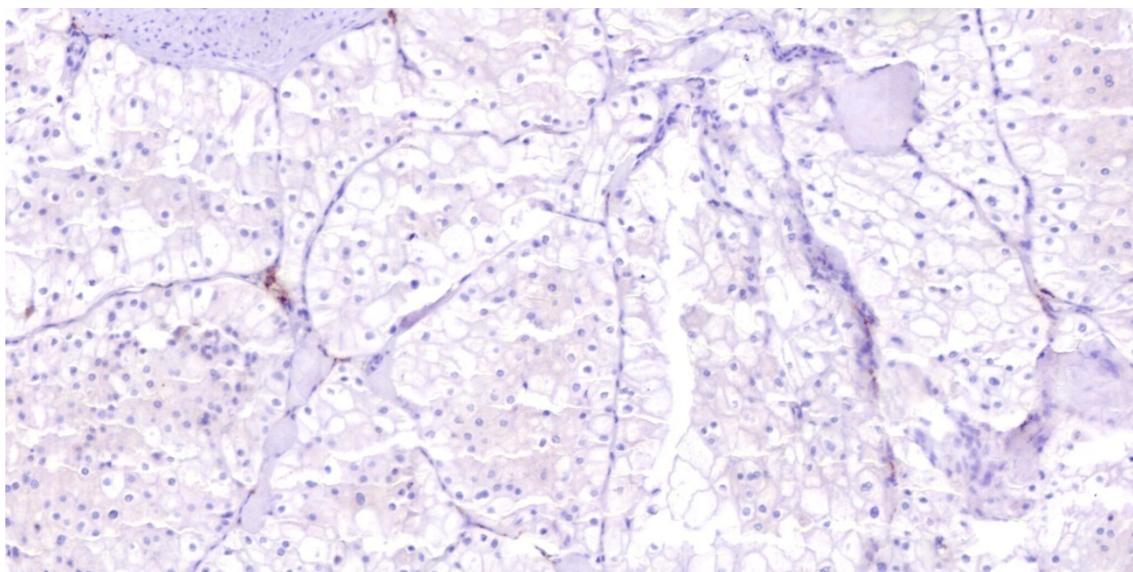
**Figura 19** - Microfotografia (400x): Expressão imunoistoquímica do VEGF em CCR de células claras.



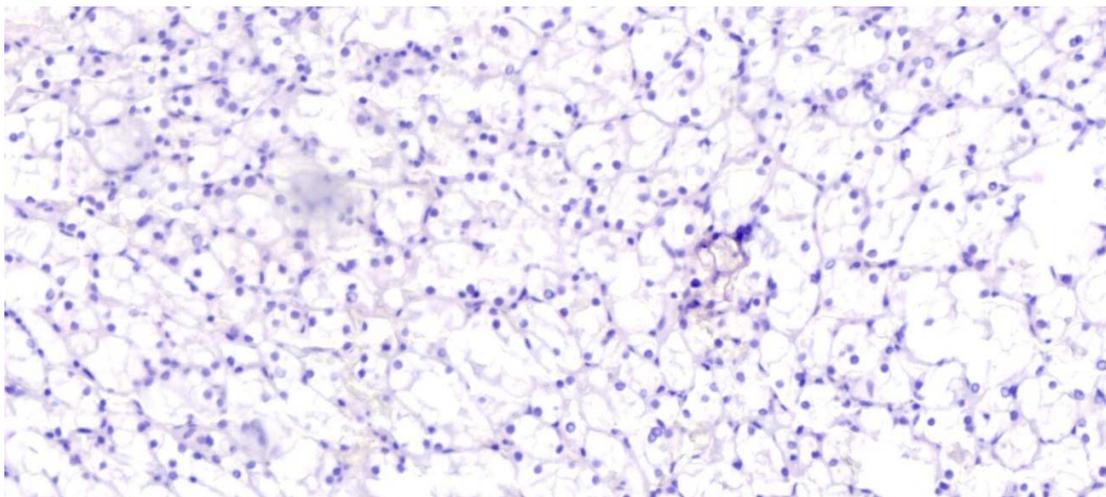
**Figura 20** - Microfotografia (400x) de CCR de células claras com elevada densidade de microvasos (DMV), através da reação imunoistoquímica com marcador CD-31, que realça os microvasos em coloração castanho escura.



**Figura 21** - Microfotografia(400x), CCR de células claras demonstrando baixa densidade de microvasos (DMV), através da reação imunoistoquímica com marcador CD-31, que realça os microvasos em coloração castanho escura.



**Figura 22** - Microfotografia (200x) demonstrando elevada densidade de vasos linfáticos (DVL) em CCR de células claras, através da reação imunoistoquímica com marcador D2-40, que realça os microvasos em coloração castanho escura.



**Legenda:** Através da reação imunoistoquímica com marcador D2-40, que realça os microvasos em coloração castanho escura.

**Figura 23** - Microfotografia (400x), demonstrando baixa densidade de vasos linfáticos (DVL) em CCR de células claras.

### 3.8 CASUÍSTICA

As Tabelas 1, 2 e 3 apresentam as características epidemiológicas, clínicas e patológicas e de estadiamento dos pacientes.

Havia 68 homens (61,8%) e 42 mulheres (38,2%). Havia 97 pacientes brancos (88,2%) e 13 não brancos (11,8%). A idade variou de 23 a 81 anos, com média de 59,9 e mediana de 55 anos. Vinte pacientes (18,2%) tinham menos de 45 anos e metade dos pacientes tinha entre 45 e 59 anos. Sessenta e um pacientes não fumavam e 49 (44,%) eram tabagistas, com consumo variando de 0,5 a 100 cigarros ao dia (média de 23,6 e mediana de 17 cigarros ao dia). Diagnóstico incidental ocorreu em 44 casos (40%). Os sintomas mais comuns foram dor lombar, hematúria e emagrecimento. A tríade clássica (hematúria, dor lombar e massa palpável) esteve presente em

dois pacientes (1,8%). O tempo de evolução médio entre as queixas iniciais e o diagnóstico foi de 3,3 meses (variando de 1 a 48 meses). Três pacientes (2,7%) tinham antecedentes familiares positivos para CCR e dezesseis pacientes (14,5%) apresentavam metástases ao diagnóstico (Tabela 1).

Quanto às classificações de performance-status (P/S), 75,4% dos pacientes apresentavam *Karnofsky Performance Status* (KPS)  $\geq 90$ , e 76,4% dos pacientes foram classificados como ECOG 0. Quanto a Classificação da ASA, verificamos que 64,5% dos pacientes (71 casos) foram classificados como ASA II e 15,5% como ASA I.

Os níveis de hemoglobina variaram de 7,5 g/dl a 20,4 g/dl, com média de 13,4g/dl e mediana de 13,7 g/dl (Tabela 2).

A nefrectomia radical foi realizada em 82 pacientes (76,4%) e a nefrectomia parcial em 28. Transfusão sanguínea foi empregada em 34 casos (30,9%). Complicações precoces foram verificadas em 19 casos (17,3%), sendo as mais frequentes insuficiência renal aguda em 5 casos e complicações cardiovasculares em 3. Complicações tardias acometeram 14 pacientes (12,7%), com predominância de insuficiência renal crônica (Tabela 3).

O tamanho tumoral variou de 2,0 a 24 cm, com média 7,38 cm e mediana 6,5 cm, sendo que em 38 casos (34,5%) as lesões eram menores que 5,0 cm. Houve 57 tumores à esquerda (51,8%), e o pólo superior foi a região mais acometida em 35,5% dos casos. Na mesma proporção, mais de um pólo foi envolvido (Tabela 2). Em 11 casos houve invasão da veia renal (10%) e em três casos houve invasão da veia cava inferior (2,7%). As

invasões da pelve renal e ureter ocorreram em 10 casos (9,1%), da adrenal ipsilateral em 10 casos (9,1%) e da gordura perirrenal em 25 casos (22,7%). Na análise microscópica, predominaram tumores de baixo grau (graus 1 e 2) em 59,1% versus 40,9% de tumores de alto grau (graus 3 e 4). O tipo histológico predominante foi o carcinoma de células claras em 93 casos (84,5%), seguido pelos carcinomas papilíferos (9,1%) e cromófobos (4,5%), TFE3 gene (0,9%), e do carcinoma de ductos coletores (0,9%) (Tabela 4).

Em 57 casos houve necrose tumoral (51,8%). Invasão venosa microscópica (IVM) ocorreu em 27 pacientes (24,5%) e invasão linfática microscópica ocorreu em 12 casos (10,9%) (Tabela 4). Em 100 casos (90,9%) as margens estavam livres e em 10 casos houve margens positivas na peça removida (margens microscópicas positivas em 4 casos) (Tabela 3).

Linfonodos positivos (pN1-2) ocorreram em 12 casos (10,9%). Em 65 casos (59,1%) os linfonodos foram negativos (pN0) e em 33 casos (30%) os linfonodos foram ignorados (pNx) (Tabela 5). Nos 28 casos submetidos à nefrectomia parcial por principio, todos foram considerados como pN0.

Dentre os 82 pacientes submetidos à nefrectomia radical, houve 25 casos (30,4%) em que a linfadenectomia foi considerada adequada (ressecção de 8 ou mais linfonodos; de acordo com o TNM da UICC 2002) e 57 casos (69,6%), em que a ressecção pode ser considerada “inadequada”, de acordo com o mesmo critério (Tabela 3).

Os estádios clínicos I, II, III e IV do TNM 2002 ocorreram respectivamente em 54, 14, 26 e 16 casos (49,1%, 12,7%, 23,6% e 14,5%) (Tabela 5).

Falhas aos 5 anos ocorreram em 28 pacientes (25,5%), sendo 18 recorrências e 10 progressões (entre os pacientes metastáticos ao diagnóstico) (Tabela 6). Predominaram as recorrências pulmonares e ósseas. Oitenta e um por cento dos pacientes com recidiva receberam algum tipo de tratamento para recidiva (radioterapia, cirurgia ou imunoterapia em 29%, 25,8 % e 9,7%, respectivamente).

Ocorreram 31 óbitos (31,7%), dos quais 27 (87%) pelo câncer. Ao final do seguimento havia 68 pacientes (61,8) vivos e sem doença, 7 pacientes (6,4%) vivos com doença, e 4 pacientes (3,6%) perdidos de vista (Tabela 6).

**Tabela 1** - Variáveis epidemiológicas (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Variável	Categoria	N	%
Idade	23-44 anos	20	18,2
	45-59 anos	55	50,0
	60-82 anos	35	31,8
Sexo	Feminino	41	38,2
	Masculino	68	61,8
Cor da Pele	Branços	97	88,2
	Não brancos	13	11,8
Diagnóstico Incidental	Não	66	60,0
	Sim	44	40,0
Sintomas	Não	44	40,0
	Dor lombar	20	18,2
	Hematúria	18	16,4
	Emagrecimento	9	8,2
	Massa	3	2,7
	Febre	2	1,8
	Dois sintomas	8	7,2
	Tríade*	2	1,8
	Outros	4	3,6
História familiar	Não	03	2,7
	Sim	107	97,3
Tabagismo	Não	61	55,5
	Sim	49	44,5
Metástases ao diagnóstico	Não	94	85,5
	Sim	16	14,5
Total	-	110	110

\*hematúria, massa palpável e dor

**Tabela 2** - Variáveis Clínicas (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Variável	Categoria	N	%
Karnofski Performance Status	60	1	0,9
	70	8	6,4
	80	19	17,3
	90	49	44,5
	100	34	30,9
ECOG	0	84	76,4
	1	24	21,8
	2	2	1,8
ASA	1	17	15,5
	2	71	64,5
	3	22	20,0
	4	-	-
	5	-	-
Hemoglobina	≥ 11 g/dl	94	85,5
	<11 g/dl	16	14,5
Lateralidade	Esquerda	57	51,8
	Direta	53	48,2
Tamanho (7,0 cm)	Até 7,0 cm	63	62,6
	Mais de 7,0 cm	47	53,6
Tamanho (5,0 cm)	Até 5,0cm	38	34,5
	De 5,0 a 10 cm	52	47,3
	Mais de 10 cm	20	18,2
Topografia renal Acometida	Pólo superior	39	35,5
	Meso renal	13	11,8
	Pólo inferior	19	17,3
	Mais de um pólo	39	35,5
Total	--	110	100

**Tabela 3** - Variáveis terapêuticas (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Variável	Categoria	N	%
Tipo de cirurgia	Nefrectomia radical	82	74,5
	Nefrectomia parcial	28	25,5
Tempo cirúrgico	Até 3 h	40	36,4
	>3h	70	63,6
Transfusão	Não	76	69,1
	Sim	34	30,9
Incisão	Abdominal	69	62,7
	Lombotomia	41	37,3
Linfadenectomia	Não se aplica*	28	-
	Adequada**	25	30,4
	Indequada	57	69,6
Tempo de internação	Até 7 dias	97	87,3
	Mais de 7 dias	12	12,7
Margens cirúrgicas microscópicas	Livres	100	91,9
	Comprometidas	10	8,1
Complicações precoces	Não	91	82,7
	IRA	5	4,5
	Cardiovasculares	3	2,7
	Íleo prolongado	2	1,8
	Outras	9	8,1
Complicações tardias	Não	96	87,2
	IRC	6	5,5
	Parede	2	1,8
	Outras	6	5,5
Total	--	110	100

\*Pacientes submetidos a nefrectomia parcial

\*\*Ressecção de 8 ou mais linfonodos

**Tabela 4** - Variáveis anatomopatológicas (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Variável	Categoria	N	%
Grau de Fuhrman	1	18	16,4
	2	47	42,7
	3	27	24,5
	4	18	16,4
Tipo histológico	Células claras	93	84,5
	Papilífero	10	9,1
	Cromóforo	5	4,5
	TFE3 GENE	1	0,9
	Ductos coletores	1	0,9
Necrose	Não	53	48,2
	Sim	57	51,8
Invasão seio renal e/ou gordura perirrenal	Não	85	77,3
	Sim	25	22,7
Invasão adrenal	Não	100	90,9
	Sim	10	9,1
Invasão de pélvis renal e/ou ureter	Não	100	90,9
	Sim	10	9,1
Invasão linfática microscópica	Não	98	89,1
	Sim	12	10,9
Invasão venosa microscópica	Não	83	75,5
	Sim	27	24,5
Invasão de v renal	Não	99	90
	Sim	11	10
Invasão de v cava inferior	Não	107	97,3
	Sim	03	2,7
Total	--	110	100

**Tabela 5** - Variáveis de estadiamento (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Variável	Categoria	N	%
Estádio T patológico	T1a	24	21,8
	T1b	30	27,3
	T2	19	17,3
	T3a	16	14,5
	T3b	17	15,5
	T4	4	3,6
EstádioN patológico	pN0	65	59,1
	pN1	7	6,4
	pN2	5	4,5
	pNx	33	30
Estádio clínico agrupado TNM	I	54	49,1
	II	14	12,7
	III	26	23,6
	IV	16	14,5
Total	--	110	100

**Tabela 6** - Desfechos clínicos após o tratamento do tumor primário e situação clínica aos 5 anos do estudo (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Variável	Categoria	N	%
Falhas (Recorrência ou progressão)	Não	82	73,5
	Recorrência	18	16,4
	Progressão	10	10,1
Situação clínica ao Término do Estudo	Vivos s/ doença	68	61,8
	Vivos c/doença	7	6,4
	Mortos por CCR	27	24,5
	Mortos outras causas	4	3,6
	Perdidos de vista	4	3,6
Total	---	110	100

## 4 RESULTADOS

### 4.1 MARCADORES BIOMOLECULARES

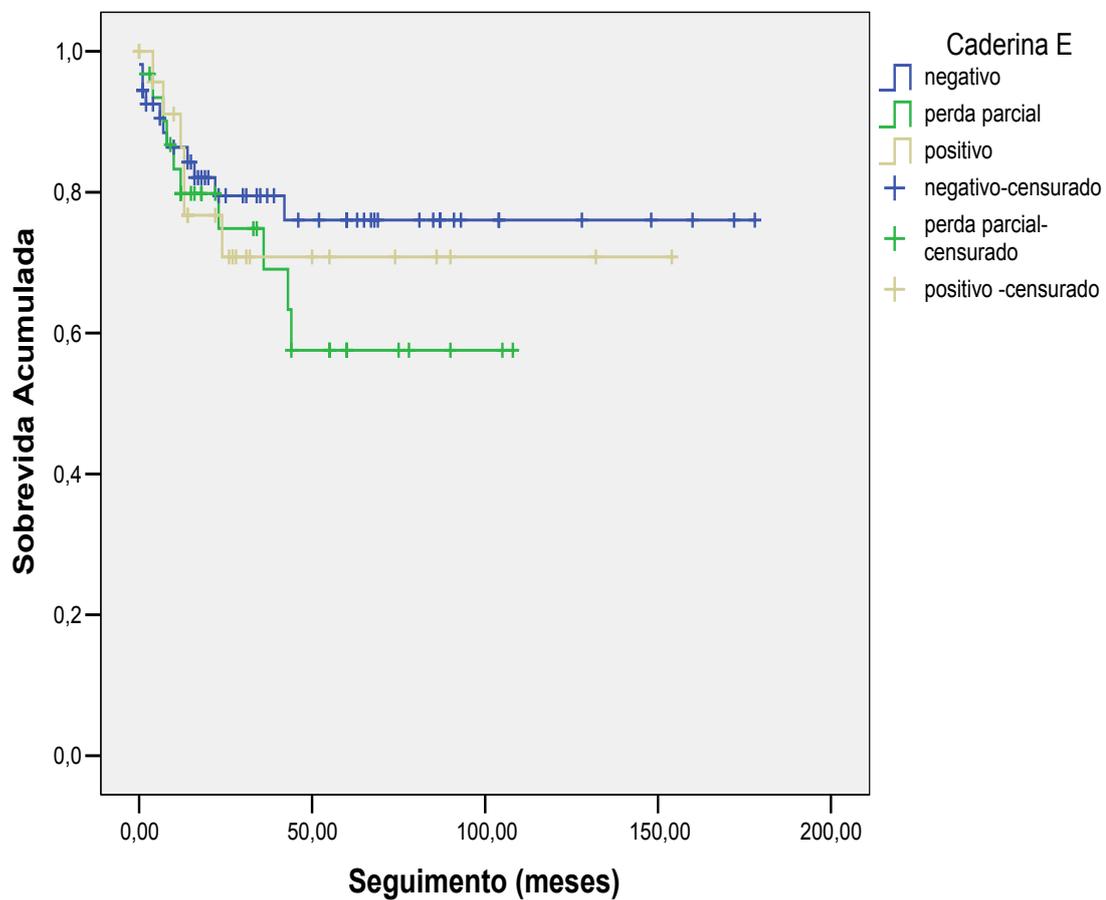
#### 4.1.2 Caderina E

A expressão imunoistoquímica da caderina E nas membranas celulares foi negativa em 54 casos (49,1%), parcial em 31 (28,2%) e positiva em 25 casos (22,7%) (Figuras 6 e 7).

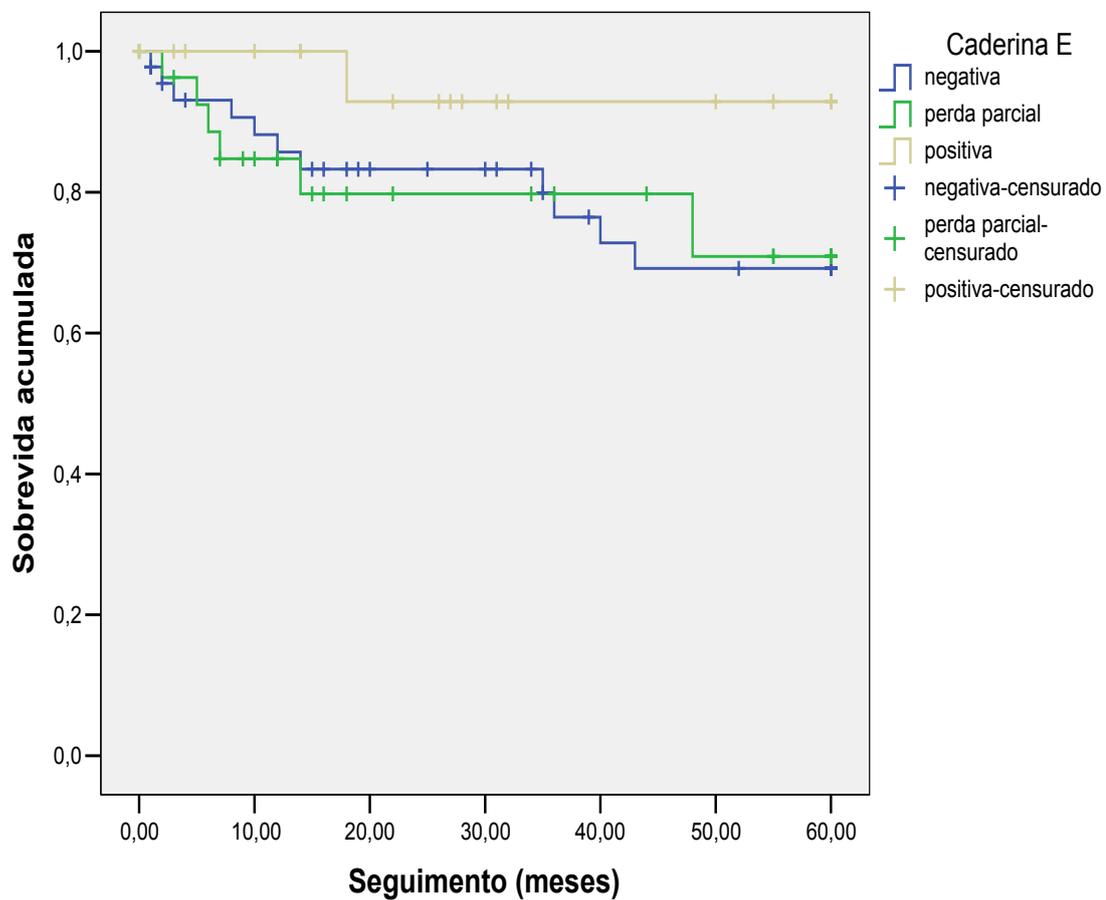
A expressão da caderina E não influenciou de modo significativo a sobrevida global (Figura 24), sendo que a probabilidade de SG aos 5 anos foi de 76%; 57,6% e 70,8%, para os casos de expressão negativa, perda parcial de expressão e expressão positiva, respectivamente ( $p=0,549$ ). Quando agrupados os casos de perda parcial e de expressão negativa, versus os casos de expressão positiva, também não verificamos impacto na SG (69,2 % versus 70,8%, respectivamente,  $p=0,919$ ), (Tabela 23).

As taxas de SLD aos 5 anos também não foram influenciadas pela expressão do marcador, sendo respectivamente de 69,2% 70,9% e 92,9% ( $p=0,269$ ), para os casos de expressão negativa, perda parcial e expressão positiva, respectivamente (Figura 25). Quando agrupados os casos de perda parcial e de expressão negativa versus expressão positiva, também não verificamos impacto na SLD (69,7 % versus 92,9%, respectivamente,  $p=0,105$ ) (Tabela 35).

Também não se verificou correlação da expressão da caderina E ( $p>0,05$ ) com os vários fatores estudados: idade, cor da pele, sexo, tabagismo, tamanho tumoral, tipo de nefrectomia, status linfonodal, grau, tipo histológico, invasão venosa e linfática micro e macroscópica, invasão linfática, invasão de estruturas adjacentes (pelve renal, ureter, gordura perirrenal e adrenal), necrose tumoral e estadiamento TNM (Tabelas 7, 16 e 17). Os níveis de expressão da Caderina E também não se correlacionaram com as classificações de performance status pelo ECOG ( $p=0,628$ ) e KPS ( $p=0,550$ ) e com a classificação de ASA ( $p=0,623$ ).



**Figura 24** - Sobrevida global aos 5 anos, de 110 pacientes com CCR submetidos a nefrectomia, de acordo com a expressão imunoistoquímica da Caderina E,  $p=0,549$ .



**Figura 25** - Sobrevida livre de doença aos 5 anos, de 94 pacientes com CCR sem metástases ao diagnóstico, submetidos à nefrectomia de acordo com a expressão imunoistoquímica da Caderina E,  $p=0,269$ .

**Tabela 7** - Distribuição dos casos segundo a expressão da Caderina E e diversas variáveis do estudo (110 casos de CCR- Hospital A. C. Camargo, 1980 a 2005).

Variável	Categoria	Caderina		Caderina		P
		Negativo / Parcial		Positivo		
		n	(%)	n	(%)	
Sexo	Masculino	53	(62,4)	15	(60,0)	0,831
	Feminino	32	(37,6)	10	(40,0)	
Cor de pele	Branca	75	(88,2)	22	(88,0)	1,000
	Não branca	10	(11,8)	3	(12,0)	
Tabagismo	Não	46	(54,1)	15	(60,0)	0,603
	Sim	39	(45,9)	10	(40,0)	
Tipo histológico	Células claras	73	(85,9)	20	(80,0)	0,531
	Outros	12	(14,1)	5	(20,0)	
Invasão linfática microscópica	Não	76	(89,4)	22	(88,0)	1,000
	Sim	9	(10,6)	3	(12,0)	
Invasão venosa microscópica	Não	66	(77,6)	17	(68,0)	0,324
	Sim	19	(22,4)	8	(32,0)	
Invasão da veia renal	Não	76	(89,4)	23	(92,0)	1,000
	Sim	9	(10,6)	2	(8,0)	
Invasão da veia cava inferior	Não	82	(96,5)	25	(100,0)	1,000
	Sim	3	(3,5)	0	(0,0)	
Invasão da pelve renal ou do ureter	Não	79	(92,9)	21	(84,0)	0,231
	Sim	6	(7,1)	4	(16,0)	
Invasão da gordura ou do seio renal	Não	64	(75,3)	21	(84,0)	0,361
	Sim	21	(24,7)	4	(16,0)	
Invasão da adrenal	Não	77	(90,6)	23	(92,0)	1,000
	Sim	8	(9,4)	2	(8,0)	
Grau de Fuhrman	1 e 2	52	(61,2)	13	(52,0)	0,412
	3 e 4	33	(38,8)	12	(48,0)	
Necrose	Não	39	(45,9)	14	(56,0)	0,373
	Sim	46	(54,1)	11	(44,0)	
Metástase linfonodal	Não	36	(81,8)	12	(75,0)	0,716
	Sim	8	(18,2)	4	(25,0)	
Estadiamento	I e II	49	(57,6)	19	(76,0)	0,097
	III e IV	36	(42,4)	6	(24,0)	
Nefrectomia	Radical	62	(72,9)	20	(80,0)	0,476
	Parcial	23	(27,1)	5	(20,0)	

### 4.1.3 VEGF

A intensidade de expressão imunoistoquímica do VEGF variou de 55 a 80 UDO (Unidade de Densidade Ótica), com média de 54,06 e mediana de 53 (dp 6,18). Verificamos alta expressão do VEGF em 53 casos (47,7%) e baixa expressão em 57 casos (52,3%).

A probabilidade de SG aos 5 anos não foi influenciada por este marcador, sendo 69,9% e 68,2% ( $p=0,966$ ) para os casos com baixa expressão e alta expressão, respectivamente (Figura 26).

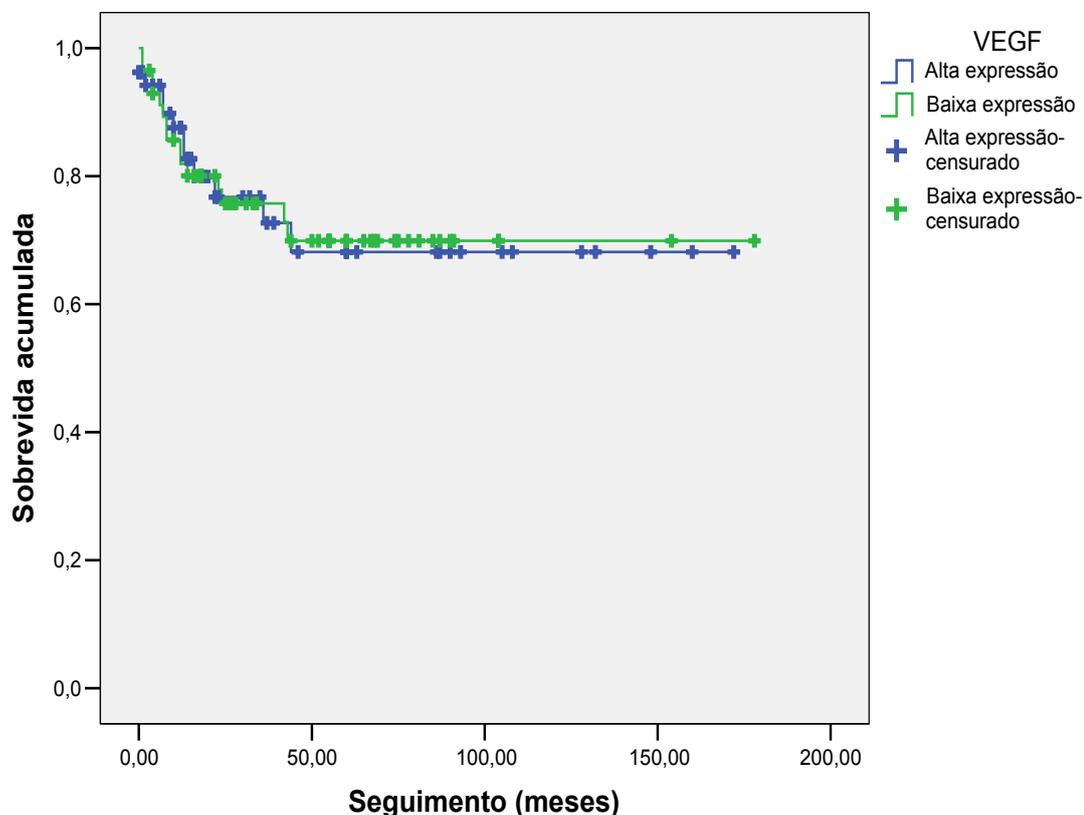
As taxas de SLD também não foram influenciadas pela alta ou baixa expressão do VEGF. A SLD dos pacientes com baixa expressão e com alta expressão do VEGF foi respectivamente de 73,5% e 72,5% ( $p=0,580$ ) (Figura 27).

A expressão IIQ do VEGF não se correlacionou ( $p>0,05$ ) com os seguintes fatores: idade, cor da pele, sexo, tabagismo, tipo de nefrectomia, tamanho tumoral, tipo histológico, invasão venosa microscópica, necrose, status linfonodal e estadiamento.

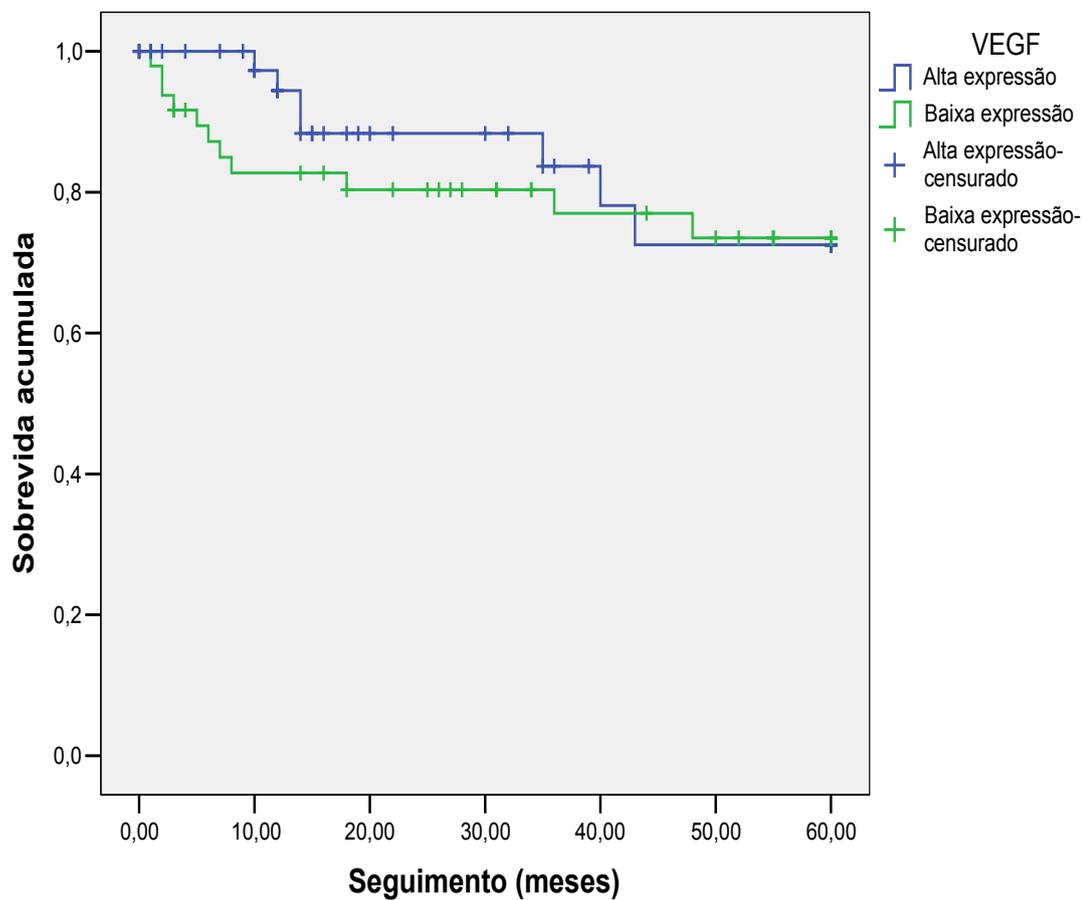
Notou-se correlação entre a expressão deste marcador e o grau de Fuhrman agrupado, a ocorrência de invasão linfática microscópica (Tabelas 8, 16 e 17) e com os maiores níveis da Classificação de ECOG.

Pacientes com alta expressão do VEGF apresentaram 3 vezes mais invasão linfática microscópica ( $p=0,0409$ ) que pacientes com baixa expressão. Pacientes com baixa expressão do VEGF maior incidência de tumores de baixo grau (68,4%) em comparação aos pacientes com alta expressão (49,1%) (Tabela 8).

Pacientes com alta expressão do VEGF, tiveram quase o dobro de casos com Classificação de ECOG 1 e 2 em comparação aos pacientes com baixa expressão (17 versus 9 casos respectivamente,  $p=0,046$ ). Os níveis de expressão do VEGF também não se correlacionaram com as classificações de performance-status pela ASA ( $p=0,776$ ) e KPS ( $p=0,078$ ).



**Figura 26** - Sobrevida global aos 5 anos, de 110 pacientes com CCR submetidos a nefrectomia, de acordo com a expressão imunoistoquímica do VEGF,  $p=0,966$ .



**Figura 27** - Sobrevida livre de doença aos 5 anos, de 94 pacientes com CCR sem metástases ao diagnóstico, submetidos à nefrectomia de acordo com a expressão imunohistoquímica do VEGF,  $p=0,580$ .

**Tabela 8** - Distribuição dos casos segundo a expressão de VEGF e diversas variáveis do estudo (110 pacientes com CCR Hospital A. C. Camargo, 1980 a 2005).

Variável	Categoria	VEGF		VEGF		P
		Baixa expressão (*)		Alta expressão (*)		
		n	(%)	n	(%)	
Sexo	Masculino	34	(59,6)	34	(64,2)	0,627
	Feminino	23	(40,4)	19	(35,8)	
Cor de pele	Branca	48	(84,2)	49	(92,5)	0,181
	Não branca	9	(15,8)	4	(7,5)	
Tabagismo	Não	30	(52,6)	31	(58,5)	0,537
	Sim	27	(47,4)	22	(41,5)	
Tipo histológico	Células claras	46	(80,7)	47	(88,7)	0,247
	Outros	11	(19,3)	6	(11,3)	
Invasão linfática microscópica	Não	54	(94,7)	44	(83,0)	0,049
	Sim	3	(5,3)	9	(17,0)	
Invasão venosa microscópica	Não	43	(75,4)	40	(75,5)	0,997
	Sim	14	(24,6)	13	(24,5)	
Invasão da veia renal	Não	52	(91,2)	47	(88,7)	0,656
	Sim	5	(8,8)	6	(11,3)	
Invasão da veia cava inferior	Não	56	(98,2)	51	(96,2)	0,608
	Sim	1	(1,8)	2	(3,8)	
Invasão da pelve renal ou do ureter	Não	52	(91,2)	48	(90,6)	1,000
	Sim	5	(8,8)	5	(9,4)	
Invasão da gordura ou do seio renal	Não	40	(70,2)	45	(84,9)	0,065
	Sim	17	(29,8)	8	(15,1)	
Invasão da adrenal	Não	52	(91,2)	48	(90,6)	1,000
	Sim	5	(8,8)	5	(9,4)	
Grau de Fuhrman	1 e 2	39	(68,4)	26	(49,1)	0,039
	3 e 4	18	(31,6)	27	(50,9)	
Necrose	Não	27	(47,4)	26	(49,1)	0,859
	Sim	30	(52,6)	27	(50,9)	
Metástase linfonodal	Não	28	(87,5)	20	(71,4)	0,121
	Sim	4	(12,5)	8	(28,6)	
Estadiamento	I e II	33	(57,9)	35	(66,0)	0,380
	III e IV	24	(42,1)	18	(34,0)	
Nefrectomia	Radical	46	(80,7)	36	(67,9)	0,124
	Parcial	11	(19,3)	17	(32,1)	

(\*) As categorias foram definidas a partir do valor mediano de cada marcador na população do estudo.

#### 4.1.4 NOS-1

A intensidade de expressão imunoistoquímica da NOS-1 variou de 1,4 a 139 UDO, com média de 27,32 e mediana de 19,45 (dp 25,7). Verificamos alta expressão da NOS-1 em 55 casos (50%) e baixa expressão em 55 casos (50%).

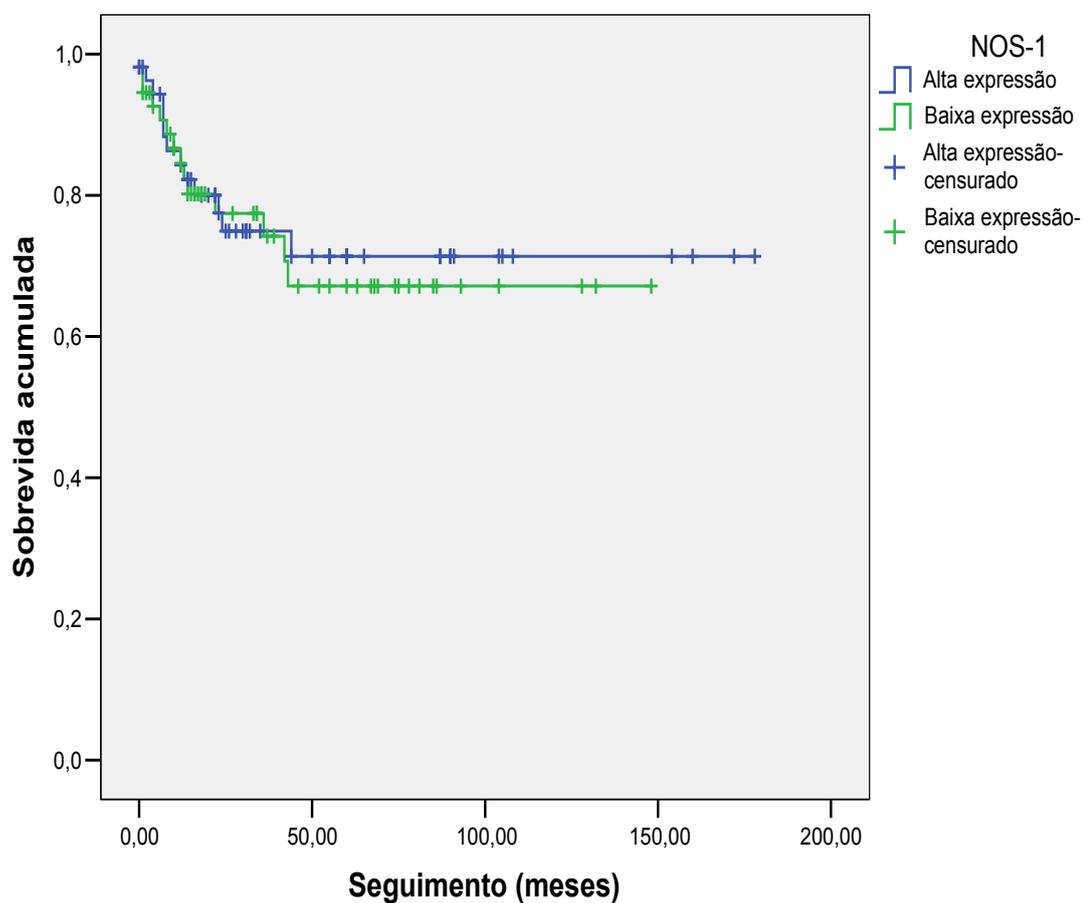
A probabilidade de SG aos 5 anos não foi influenciada por este marcador, sendo 67,1% e 71,4% para os casos com baixa expressão e alta expressão ( $p=0,800$ ), respectivamente (Figura 28). As taxas de SLD aos 5 anos também não foram influenciadas pela alta ou baixa expressão da NOS-1. A SLD dos pacientes com baixa expressão e com alta expressão da NOS-1 foi respectivamente de 67,4% e 80,% ( $p=0,271$ ) (Figura 29).

Notou-se correlação entre a expressão deste marcador e as ocorrências de invasão venosa microscópica e de metástases linfonodais. Pacientes com alta expressão da NOS-1 apresentaram mais metástases linfonodais (34,5% versus 6,5%,  $p=0,007$ ) e o dobro de IVM em comparação aqueles com baixa expressão da NOS-1 (32,7% versus 16,4%;  $p=0,046$ ) (Tabela 9). A expressão da NOS-1 também se correlacionou com tamanho tumoral. Pacientes com alta expressão de NOS-1 tiveram tumores significativamente maiores que os pacientes com baixa expressão (8,2 cm versus 6,5 cm, respectivamente;  $p=0,015$ ) (Tabela 17).

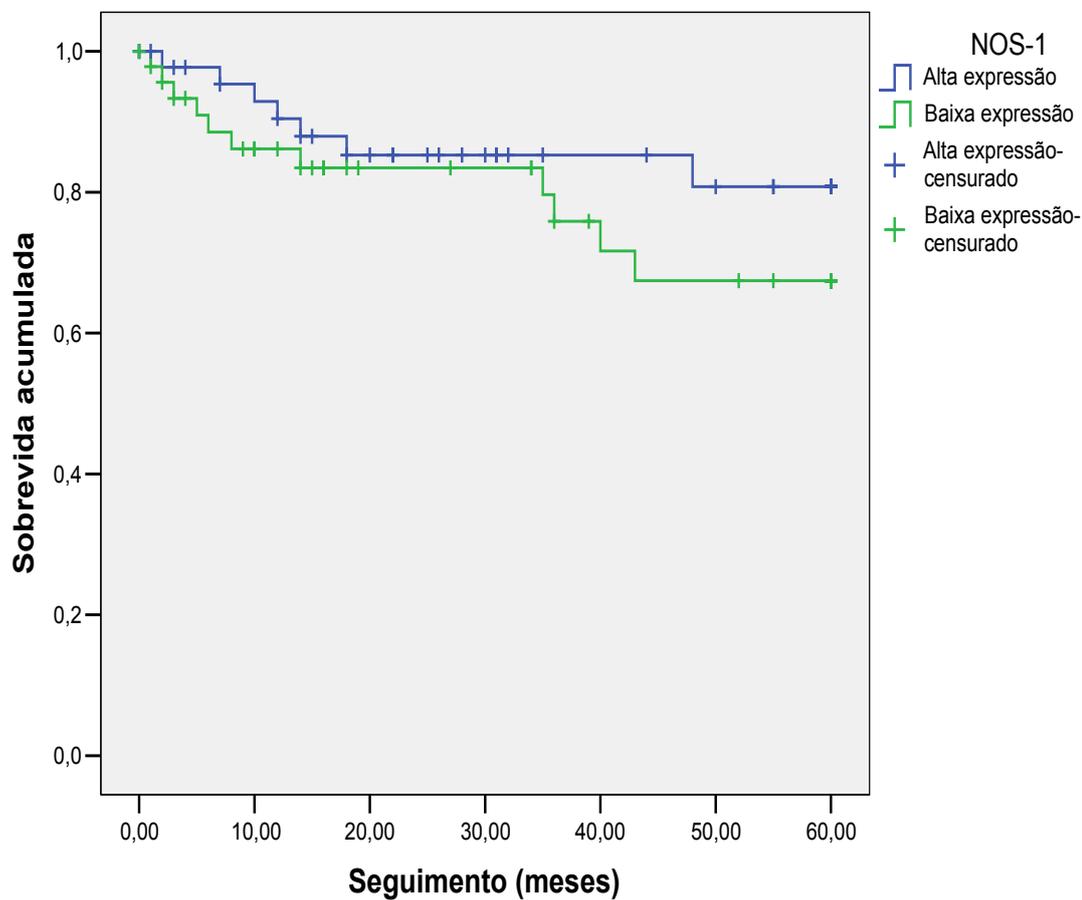
A expressão IIQ da NOS-1 não se correlacionou ( $p>0,05$ ) com os seguintes fatores: idade (Tabela 16), cor da pele, sexo, tabagismo, tipo de nefrectomia, tipo histológico, grau, invasão linfática microscópica, invasão

venosa macroscópica e de estruturas adjacentes (adrenal, vias excretoras e gordura perirrenal), necrose, estadiamento clínico (Tabelas 9).

Os níveis de expressão da NOS-1 também não se correlacionaram com as classificações de performance status pelo ECOG ( $p=0,065$ ), ASA ( $p=0,058$ ) e KPS ( $p=0,508$ ).



**Figura 28** - Sobrevida global aos 5 anos, de 110 pacientes com CCR submetidos a nefrectomia, de acordo com a expressão imunoistoquímica da NOS-1,  $p=0,800$ .



**Figura 29** - Sobrevida livre de doença aos 5 anos, de 94 pacientes com CCR sem metástases ao diagnóstico, submetidos à nefrectomia de acordo com a expressão imunohistoquímica da NOS-1,  $p=0,271$ .

**Tabela 9** - Distribuição dos casos segundo a expressão de NOS1 e diversas variáveis do estudo (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo, 1980 a 2005).

Variável	Categoria	NOS 1		NOS 1		P
		Baixa expressão (*)		Alta expressão (*)		
		n	(%)	n	(%)	
Sexo	Masculino	32	(58,2)	36	(65,5)	0,432
	Feminino	23	(41,8)	19	(34,5)	
Cor de pele	Branca	49	(89,1)	48	(87,3)	0,768
	Não branca	6	(10,9)	7	(12,7)	
Tabagismo	Não	31	(56,4)	30	(54,5)	0,848
	Sim	24	(43,6)	25	(45,5)	
Tipo histológico	Células claras	46	(83,6)	47	(85,5)	0,792
	Outros	9	(16,4)	8	(14,5)	
Invasão linfática microscópica	Não	52	(94,5)	46	(83,6)	0,067
	Sim	3	(5,5)	9	(16,4)	
Invasão venosa microscópica	Não	46	(83,6)	37	(67,3)	0,046
	Sim	9	(16,4)	18	(32,7)	
Invasão da veia renal	Não	50	(90,9)	49	(89,1)	0,751
	Sim	5	(9,1)	6	(10,9)	
Invasão da veia cava inferior	Não	54	(98,2)	53	(96,4)	1,000
	Sim	1	(1,8)	2	(3,6)	
Invasão da pelve renal ou do ureter	Não	52	(94,5)	48	(87,3)	0,185
	Sim	3	(5,5)	7	(12,7)	
Invasão da gordura ou do seio renal	Não	41	(74,5)	44	(80,0)	0,495
	Sim	14	(25,5)	11	(20,0)	
Invasão da adrenal	Não	50	(90,9)	50	(90,9)	1,000
	Sim	5	(9,1)	5	(9,1)	
Grau de Fuhrman	1 e 2	37	(67,3)	28	(50,9)	0,081
	3 e 4	18	(32,7)	27	(49,1)	
Necrose	Não	30	(54,5)	23	(41,8)	0,182
	Sim	25	(45,5)	32	(58,2)	
Metástase linfonodal	Não	29	(93,5)	19	(65,5)	0,007
	Sim	2	(6,5)	10	(34,5)	
Estadiamento	I e II	36	(65,5)	32	(58,2)	0,432
	III e IV	19	(34,5)	23	(41,8)	
Nefrectomia	Radical	38	(69,1)	44	(80,0)	0,189
	Parcial	17	(30,9)	11	(20,0)	

(\*) As categorias foram definidas a partir do valor mediano de cada marcador na população do estudo.

#### 4.1.5 NOS-2

A intensidade de expressão imunoistoquímica da NOS-2 variou de 114 a 176 UDO, com média de 121,8 e mediana de 123 (dp 19,9). Verificamos alta expressão da NOS-2 em 54 casos (49,6%) e baixa expressão em 56 casos (50,4%).

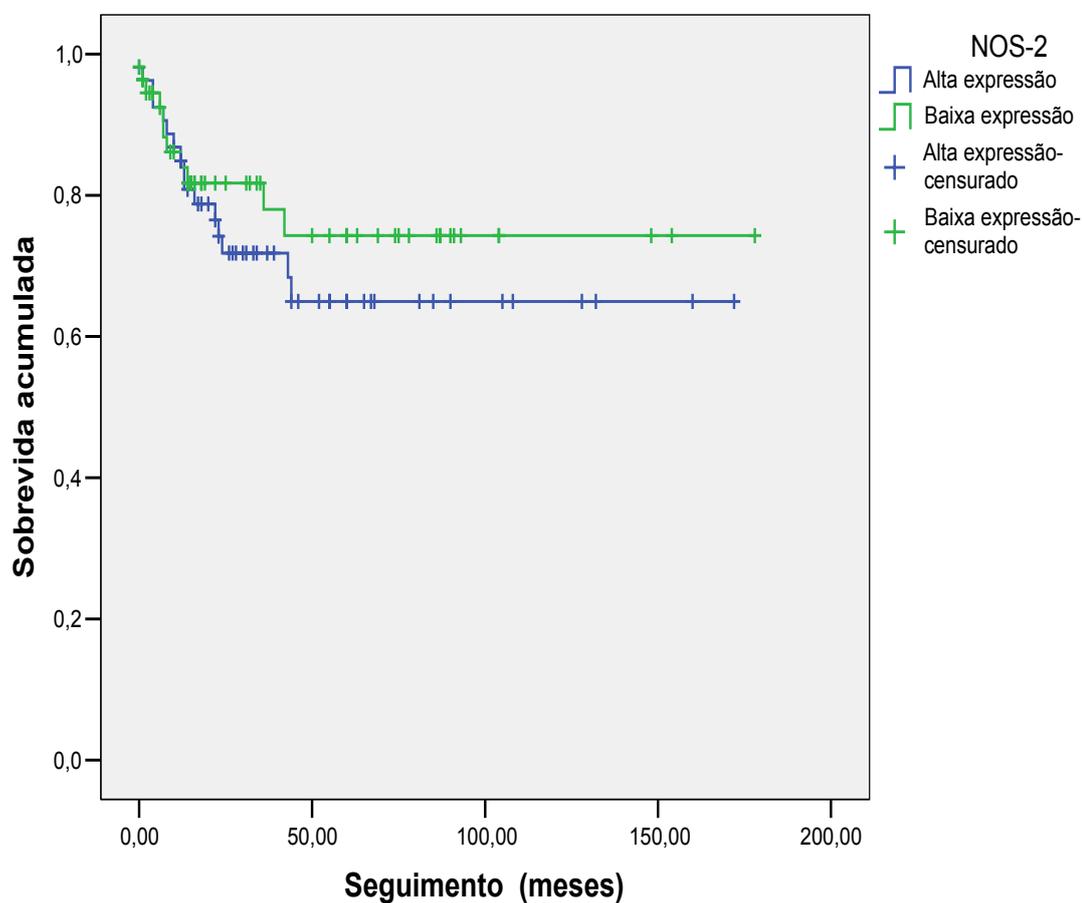
A probabilidade de SG aos 5 anos não foi influenciada por este marcador, sendo 74,3% e 65% para os casos com baixa expressão e alta expressão ( $p=0,447$ ), respectivamente (Figura 30). As taxas de SLD também não foram influenciadas pela alta ou baixa expressão da NOS-2. A SLD dos pacientes com baixa expressão e com alta expressão da NOS-2 foi respectivamente de 81,3% e 67% ( $p=0,187$ ) (Figura 31).

Notou-se correlação entre a expressão deste marcador com o sexo, tipo de nefrectomia e a ocorrência de invasão venosa microscópica (Tabela 10) e tamanho tumoral. Notou-se que os casos de alta expressão de NOS-2 foram mais frequentes entre os homens ( $p=0,027$ ) e entre os submetidos à nefrectomia radical ( $p=0,003$ ). Pacientes com baixa expressão de NOS-2 apresentaram a metade de IVM em comparação aos pacientes com alta expressão da NOS-2 (16,1% versus 33,3%, respectivamente;  $p=0,035$ ) (Tabela 10). Pacientes com alta expressão de NOS-2 tiveram tumores significativamente maiores que os pacientes com baixa expressão (8,6 cm versus 6,2 cm, respectivamente;  $p=0,003$ ) (Tabela 17).

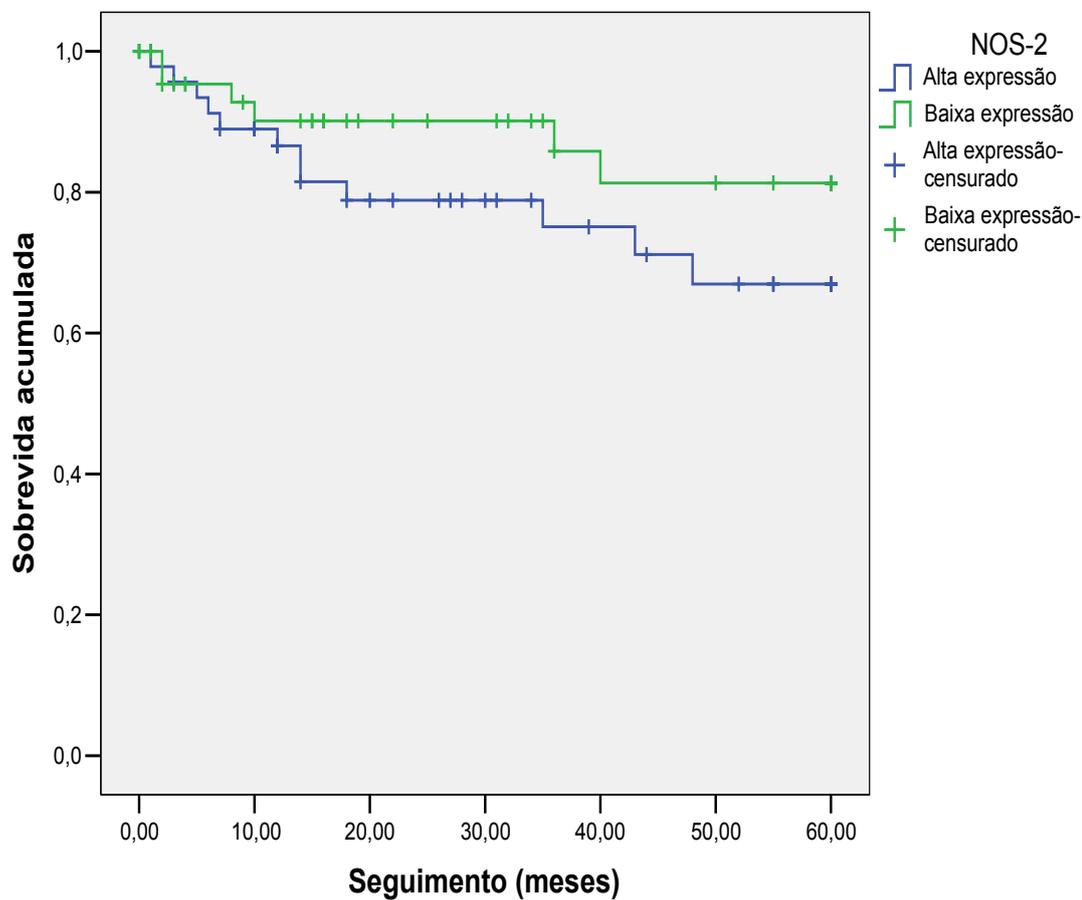
A expressão IIQ da NOS-2 não se correlacionou ( $p>0,05$ ) com os seguintes fatores: idade (Tabela 16), cor da pele, tabagismo, tipo histológico, grau, invasão linfática microscópica, invasão venosa macroscópica e de

estruturas adjacentes (adrenal, vias excretoras e gordura perirrenal), acometimento linfonodal, necrose e estadiamento (Tabela 10).

Os níveis de expressão da NOS-2 também não se correlacionaram com as classificações de performance-status pelo ECOG ( $p=0,431$ ) e ASA ( $p=0,924$ ) e KPS ( $p=0,580$ ).



**Figura 30** - Sobrevida global aos 5 anos, de 110 pacientes com CCR submetidos a nefrectomia, de acordo com a expressão imunohistoquímica da NOS-2,  $p=0,447$ .



**Figura 31** - Sobrevida livre de doença aos 5 anos, de 94 pacientes com CCR sem metástases ao diagnóstico, submetidos à nefrectomia de acordo com a expressão imunohistoquímica da NOS-2,  $p=0,187$ .

**Tabela 10** - Distribuição dos casos segundo a expressão de NOS2 e diversas variáveis do estudo (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Variável	Categoria	NOS 2 Baixa expressão (*)		NOS 2 Alta expressão (*)		P
		n	(%)	n	(%)	
Sexo	Masculino	29	(51,8)	39	(72,2)	0,027
	Feminino	27	(48,2)	15	(27,8)	
Cor de pele	Branca	52	(92,9)	45	(83,3)	0,122
	Não branca	4	(7,1)	9	(16,7)	
Tabagismo	Não	26	(46,4)	35	(64,8)	0,052
	Sim	30	(53,6)	19	(35,2)	
Tipo histológico	Células claras	51	(91,1)	42	(77,8)	0,054
	Outros	5	(8,9)	12	(22,2)	
Invasão linfática microscópica	Não	52	(92,9)	46	(85,2)	0,197
	Sim	4	(7,1)	8	(14,8)	
Invasão venosa microscópica	Não	47	(83,9)	36	(66,7)	0,035
	Sim	9	(16,1)	18	(33,3)	
Invasão da veia renal	Não	53	(94,6)	46	(85,2)	0,098
	Sim	3	(5,4)	8	(14,8)	
Invasão da veia cava inferior	Não	56	(100,0)	51	(94,4)	0,115
	Sim	0	(0,0)	3	(5,6)	
Invasão da pelve renal ou do ureter	Não	53	(94,6)	47	(87,0)	0,199
	Sim	3	(5,4)	7	(13,0)	
Invasão da gordura ou do seio renal	Não	47	(83,9)	38	(70,4)	0,090
	Sim	9	(16,1)	16	(29,6)	
Invasão da adrenal	Não	53	(94,6)	47	(87,0)	0,199
	Sim	3	(5,4)	7	(13,0)	
Grau de Fuhrman	1 e 2	34	(60,7)	31	(57,4)	0,724
	3 e 4	22	(39,3)	23	(42,6)	
Necrose	Não	27	(48,2)	26	(48,1)	0,994
	Sim	29	(51,8)	28	(51,9)	
Metástase linfonodal	Não	22	(84,6)	26	(76,5)	0,434
	Sim	4	(15,4)	8	(23,5)	
Estadiamento	I e II	39	(69,6)	29	(53,7)	0,085
	III e IV	17	(30,4)	25	(46,3)	
Nefrectomia	Radical	35	(62,5)	47	(87,0)	0,003
	Parcial	21	(37,5)	7	(13,0)	

(\*) As categorias foram definidas a partir do valor mediano de cada marcador na população do estudo.

#### 4.1.6 NOS-3

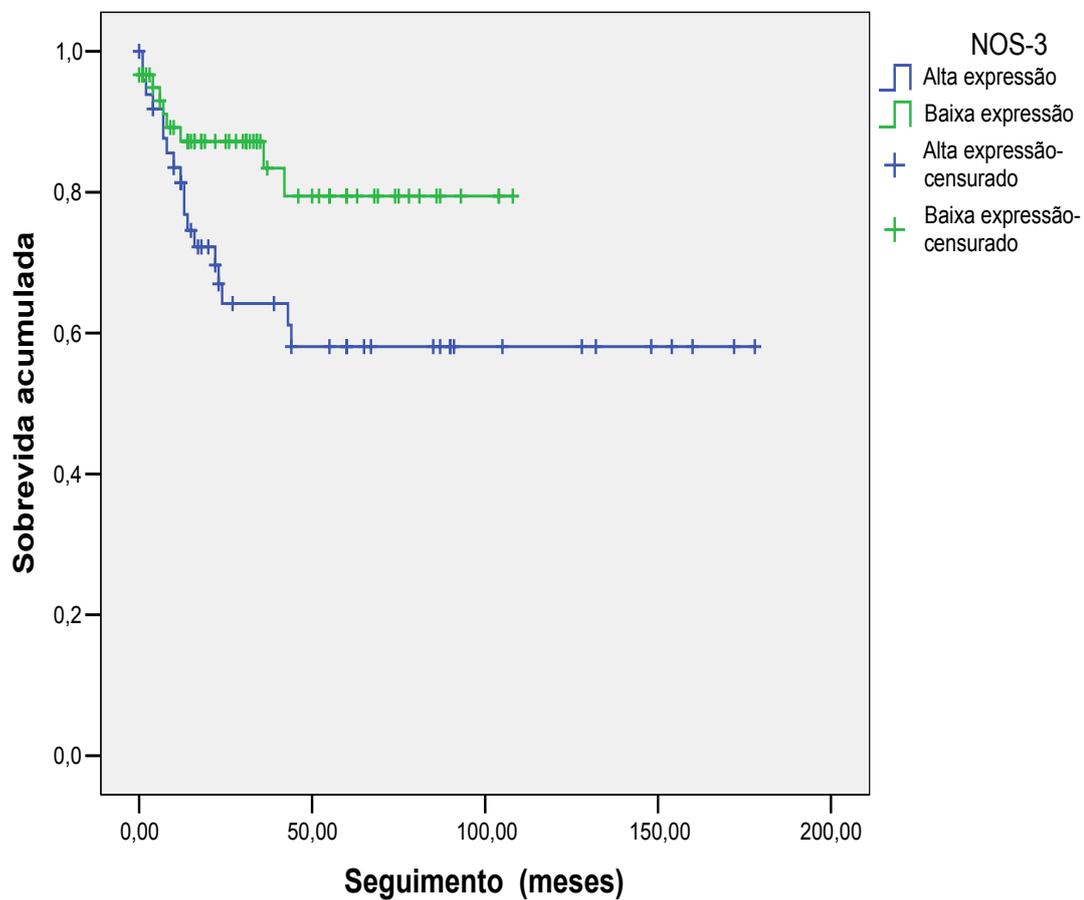
A intensidade de expressão imunoistoquímica da NOS-3 variou de 35 a 92 UDO, com média de 75,5 e mediana de 76 (dp 7,56). Verificamos alta expressão da NOS-2 em 50 casos (45,5%) e baixa expressão em 60 casos (54,5%).

A probabilidade de SG aos 5 anos foi influenciada por este marcador, sendo 79,4% versus 58,1% para os casos com baixa expressão e alta expressão ( $p=0,033$ ), respectivamente (Figura 32). Todavia, as taxas de SLD não foram influenciadas pela alta ou baixa expressão da NOS-3. A SLD aos 5 anos dos pacientes com baixa expressão e com alta expressão da NOS-3 foi respectivamente de 76,2% e 69,3% ( $p=0,198$ ) (Figura 33).

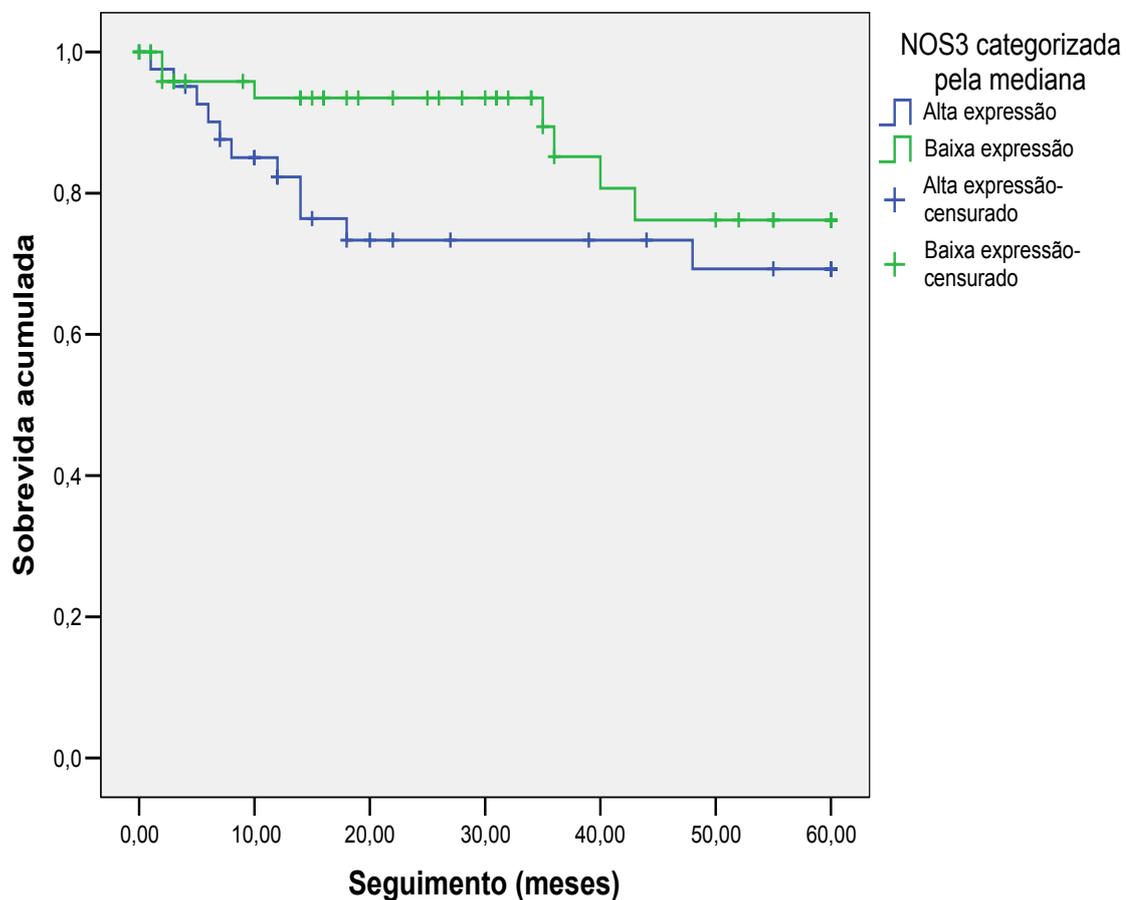
Notou-se correlação entre a expressão deste marcador com o tipo de nefrectomia, com a ocorrência de invasão linfática microscópica, de invasão de pelve renal e ureter e com acometimento linfonodal e com tabagismo e tamanho tumoral. Notou-se que os casos de alta expressão de NOS-3 tiveram maior ocorrência de invasão linfática microscópica ( $p=0,029$ ), e foram mais submetidos a nefrectomia radical (88% dos casos,  $p=0,003$ ). A presença de metástases linfonodais foi maior (31%) nos pacientes com alta expressão da NOS-3 em comparação aos com baixa expressão da NOS-3 (9,7%),  $p=0,029$ . Também a ocorrência de invasão de pelve renal e ureter foi superior nos pacientes com alta expressão da NOS-3 (16%) versus os pacientes com baixa expressão (3,3%),  $p=0,0041$ . Pacientes tabagistas tiveram mais tumores com alta expressão da NOS-3 (Tabela 11).

Pacientes com alta expressão de NOS-3 tiveram tumores significativamente maiores que os pacientes com baixa expressão (9,0 cm versus 6,0 cm, respectivamente;  $p=0,001$ ) (Tabela 17).

A expressão IIQ da NOS-3 não se correlacionou ( $p>0,05$ ) com os seguintes fatores: idade, sexo, cor da pele, tabagismo, tipo histológico, grau, invasão venosa microscópica, necrose e estadiamento (Tabelas 10 e 16). Os níveis de expressão da NOS-3 também não se correlacionaram com as classificações de performance status pelo ECOG ( $p=0,935$ ) e ASA ( $p=0,999$ ) e KPS ( $p=0,747$ ).



**Figura 32** - Sobrevida global aos 5 anos, de 110 pacientes com CCR submetidos a nefrectomia, de acordo com a expressão imunoistoquímica da NOS-3,  $p=0,033$ .



**Figura 33** - Sobrevida livre de doença aos 5 anos, de 94 pacientes com CCR sem metástases ao diagnóstico, submetidos à nefrectomia de acordo com a expressão imunohistoquímica da NOS-3,  $p=0,198$ .

**Tabela 11** - Distribuição dos casos segundo a expressão de NOS3 e diversas variáveis do estudo (110 casos de CCR - Hospital A. C. Camargo, 1980 a 2005).

Variável	Categoria	NOS 3 Baixa expressão (*)		NOS 3 Alta expressão (*)		P
		n	(%)	n	(%)	
Sexo	Masculino	34	(56,7)	34	(68,0)	0,223
	Feminino	26	(43,3)	16	(32,0)	
Cor de pele	Branca	51	(85,0)	46	(92,0)	0,257
	Não branca	9	(15,0)	4	(8,0)	
Tabagismo	Não	27	(45,0)	34	(68,0)	0,016
	Sim	33	(55,0)	16	(32,0)	
Tipo histológico	Células claras	52	(86,7)	41	(82,0)	0,500
	Outros	8	(13,3)	9	(18,0)	
Invasão linfática microscópica	Não	57	(95,0)	41	(82,0)	0,029
	Sim	3	(5,0)	9	(18,0)	
Invasão venosa microscópica	Não	49	(81,7)	34	(68,0)	0,097
	Sim	11	(18,3)	16	(32,0)	
Invasão da veia renal	Não	56	(93,3)	43	(86,0)	0,202
	Sim	4	(6,7)	7	(14,0)	
Invasão da veia cava inferior	Não	59	(98,3)	48	(96,0)	0,590
	Sim	1	(1,7)	2	(4,0)	
Invasão da pelve renal ou do ureter	Não	58	(96,7)	42	(84,0)	0,041
	Sim	2	(3,3)	8	(16,0)	
Invasão da gordura ou do seio renal	Não	49	(81,7)	36	(72,0)	0,228
	Sim	11	(18,3)	14	(18,0)	
Invasão da adrenal	Não	56	(93,3)	44	(88,0)	0,507
	Sim	4	(6,7)	6	(12,0)	
Grau de Fuhrman	1 e 2	35	(58,3)	20	(50,0)	0,859
	3 e 4	25	(41,7)	20	(50,0)	
Necrose	Não	31	(51,7)	22	(44,0)	0,423
	Sim	29	(48,3)	28	(56,0)	
Metástase linfonodal	Não	28	(90,3)	20	(69,0)	0,039
	Sim	3	(9,7)	9	(31,0)	
Estadiamento	I e II	41	(68,3)	27	(54,0)	0,123
	III e IV	19	(31,7)	23	(46,0)	
Nefrectomia	Radical	38	(63,3)	44	(88,0)	0,003
	Parcial	22	(36,7)	6	(12,0)	

(\*) As categorias foram definidas a partir do valor mediano de cada marcador na população do estudo

#### 4.1.7 MMP-2

A intensidade de expressão imunoistoquímica da MMP-2 variou de 45 a 100 UDO, com média de 69,06 e mediana de 69 (dp 8,087). Verificamos alta expressão da MMP-2 em 51 casos (46,4%) e baixa expressão em 59 casos (53,6%).

A probabilidade de SG aos 5 anos não foi influenciada por este marcador, sendo 68,9% versus 69,1% para os casos com baixa expressão e alta expressão ( $p=0,809$ ), respectivamente (Figura 34). As taxas de SLD aos 5 anos também não foram influenciadas pela alta ou baixa expressão da MMP-2. A taxas SLD dos pacientes com baixa expressão e com alta expressão da MMP-2 foram respectivamente de 77% e 60,9% ( $p=0,988$ ) (Figura 35).

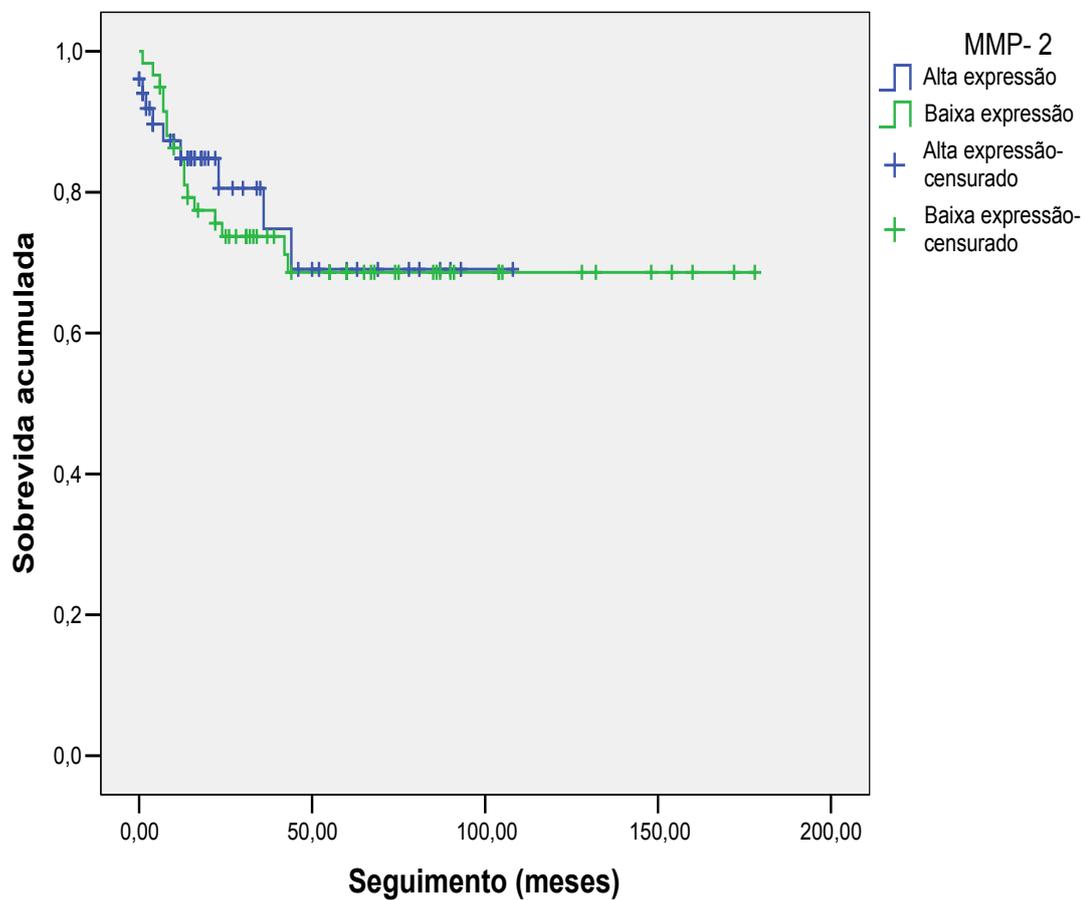
Notou-se correlação entre a expressão deste marcador com a cor de pele, o tipo histológico o grau e o tipo de nefrectomia. A maior parte dos pacientes não brancos apresentou baixa expressão de MMP-2 ( $p=0,017$ ) e, entre os pacientes com baixa expressão de MMP-2, a nefrectomia radical foi mais empregada que a nefrectomia parcial ( $<0,0001$ ). Os pacientes com alta expressão de MMP-2 tiveram menos carcinomas do tipo células claras (76,5%) que os com baixa expressão (91,5%,  $p=0,029$ ) e tiveram mais tumores de alto grau (51% versus 32,2%, respectivamente,  $p=0,046$ ) (Tabela 12).

Verificamos correlação inversa entre a expressão da MMP-2 e o tamanho tumoral. Pacientes com alta expressão de MMP-2 tiveram tumores

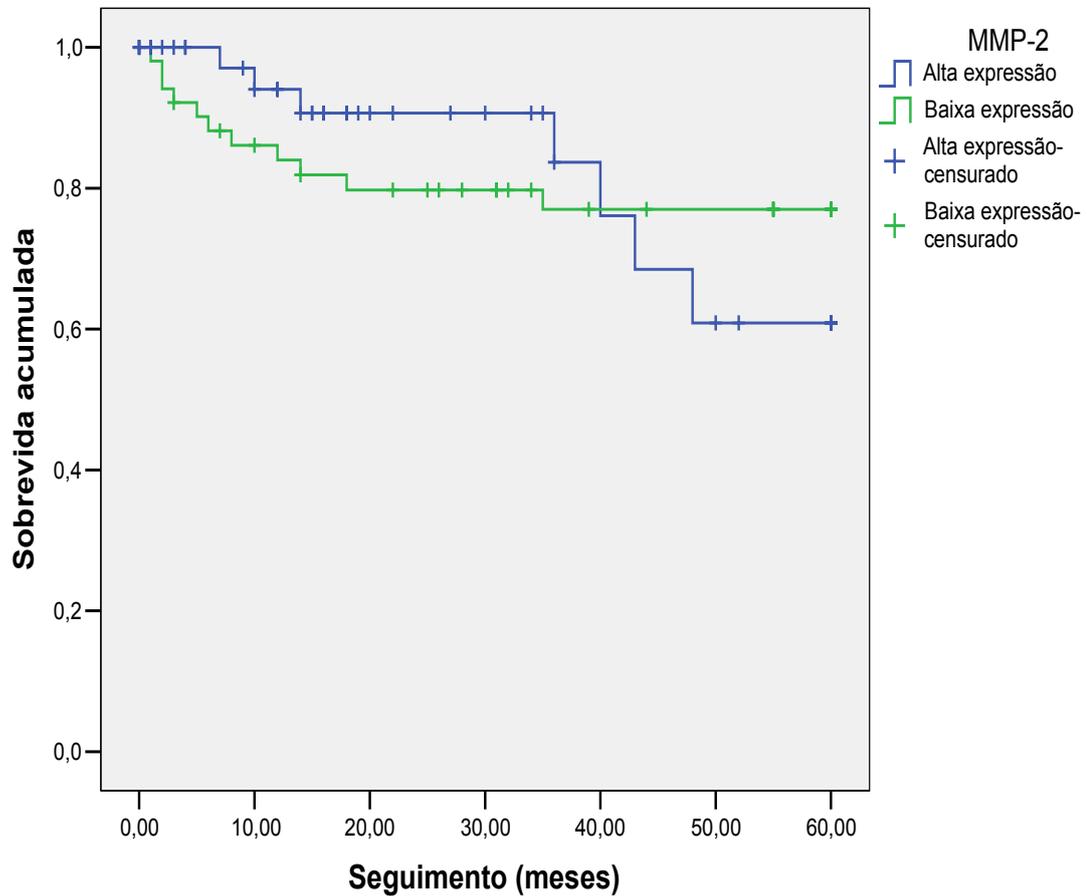
significativamente menores que os pacientes com baixa expressão (6,0 cm versus 8,6 cm, respectivamente;  $p=0,001$ ) (Tabela 17).

A expressão IIQ da MMP-2 não se correlacionou ( $p>0,05$ ) com os seguintes fatores: idade (Tabela 16), sexo, tabagismo, invasão linfática microscópica, invasão venosa, micro e macroscópica, acometimento linfonodal, invasão de estruturas adjacentes (adrenal, vias excretoras e gordura perirrenal), necrose e estadiamento (Tabela 11).

Os níveis de expressão da MMP-2 também não se correlacionaram com as classificações de performance-status pelo ECOG ( $p=0,383$ ), ASA ( $p=0,392$ ) e KPS ( $p=0,512$ ).



**Figura 34** - Sobrevida global aos 5 anos, de 110 pacientes com CCR submetidos a nefrectomia, de acordo com a expressão imunohistoquímica da MMP-2,  $p=0,809$ .



**Figura 35** - Sobrevida livre de doença aos 5 anos, de 94 pacientes com CCR sem metástases ao diagnóstico, submetidos à nefrectomia de acordo com a expressão imunohistoquímica da MMP-2,  $p=0,988$ .

**Tabela 12** - Distribuição dos casos segundo a expressão de MMP2 e diversas variáveis do estudo (Hospital A. C. Camargo, 1980 a 2005).

Variável	Categoria	MMP 2 Baixa expressão(*)		MMP 2 Alta expressão (*)		P
		n	(%)	n	(%)	
Sexo	Masculino	34	(57,6)	34	(66,7)	0,330
	Feminino	25	(42,4)	17	(33,3)	
Cor de pele	Branca	48	(81,4)	49	(96,1)	0,017
	Não branca	11	(18,6)	2	(3,9)	
Tabagismo	Não	35	(59,3)	26	(51,0)	0,380
	Sim	24	(40,7)	25	(49,0)	
Tipo histológico	Células claras	54	(91,5)	39	(76,5)	0,029
	Outros	5	(8,5)	12	(23,5)	
Invasão linfática microscópica	Não	53	(89,8)	45	(88,2)	0,789
	Sim	6	(10,2)	6	(11,8)	
Invasão venosa microscópica	Não	42	(71,2)	41	(80,4)	0,263
	Sim	17	(28,8)	10	(19,6)	
Invasão da veia renal	Não	52	(88,1)	47	(92,2)	0,483
	Sim	7	(11,9)	4	(7,8)	
Invasão da veia cava inferior	Não	58	(98,3)	49	(96,1)	0,596
	Sim	1	(1,7)	2	(3,9)	
Invasão da pelve renal ou do ureter	Não	55	(93,2)	45	(88,2)	0,509
	Sim	4	(7,8)	6	(11,8)	
Invasão da gordura ou do seio renal	Não	45	(76,3)	40		0,787
	Sim	14	(23,7)	11	(21,6)	
Invasão da adrenal	Não	56	(94,9)	44	(86,3)	0,183
	Sim	3	(5,1)	7	(13,7)	
Grau de Fuhman	1 e 2	40	(67,8)	25	(49,0)	0,046
	3 e 4	19	(32,2)	26	(51,0)	
Necrose	Não	25	(42,4)	28	(54,9)	0,190
	Sim	34	(57,6)	23	(45,1)	
Metástase linfonodal	Não	29	(82,9)	19	(76,0)	0,513
	Sim	6	(17,1)	6	(24,0)	
Estadiamento	I e II	32	(54,2)	36	(70,6)	0,078
	III e IV	27	(45,8)	15	(29,4)	
Nefrectomia	Radical	54	(91,5)	28	(54,9)	< 0,001
	Parcial	5	(8,5)	23	(45,1)	

(\*) As categorias foram definidas a partir do valor mediano de cada marcador na população do estudo.

#### 4.1.8 MMP-9

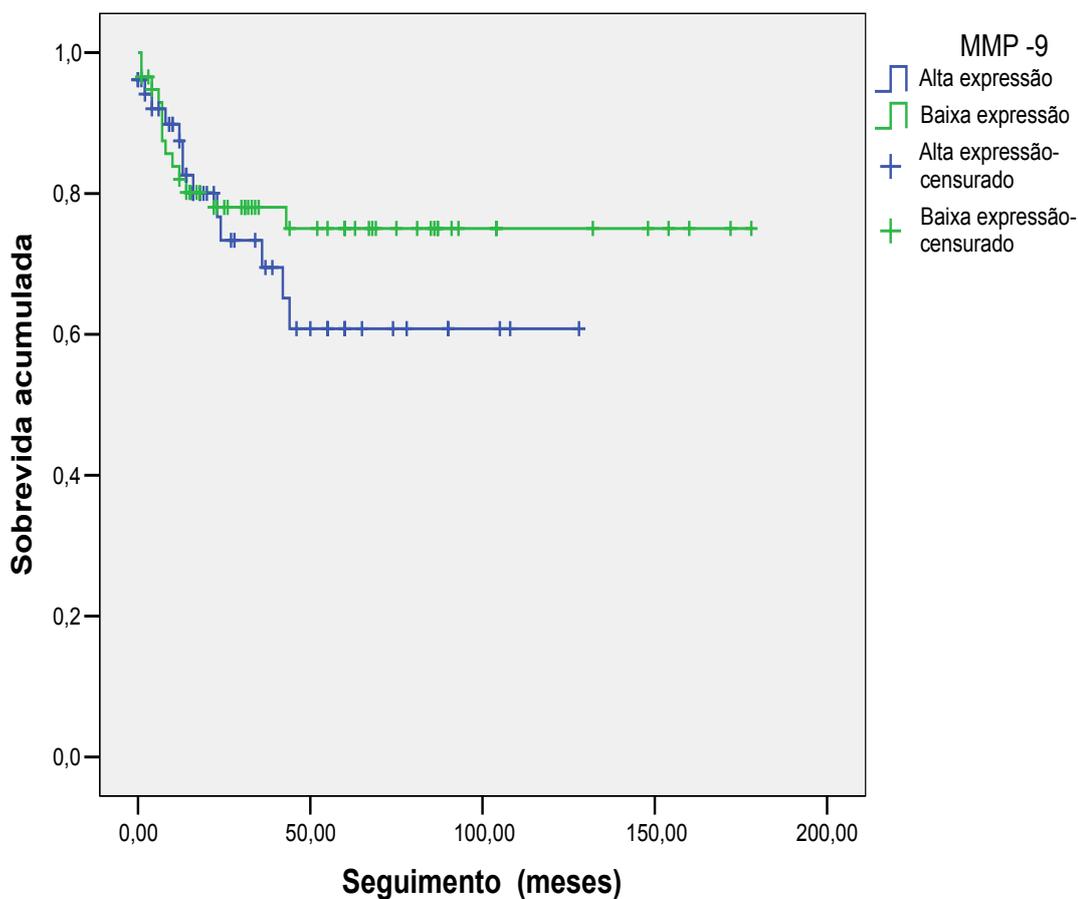
A intensidade de expressão imunoistoquímica da MMP-9 variou de 74 a 142 UDO, com média de 94,3 e mediana de 91 UDO (dp 16,95). Verificamos alta expressão da MMP-9 em 53 casos (47,8%) e baixa expressão em 58 casos (52,2%).

A probabilidade de SG aos 5 anos não foi influenciada por este marcador, sendo 75% versus 60,8% para os casos com baixa expressão e alta expressão ( $p=0,400$ ), respectivamente (Figura 36). As taxas de SLD também não foram influenciadas pela alta ou baixa expressão da MMP-9. A SLD aos 5 anos dos pacientes com baixa expressão e com alta expressão da MMP-9 foi respectivamente de 76,9% e 68,5% ( $p=0,859$ ) (Figura 37).

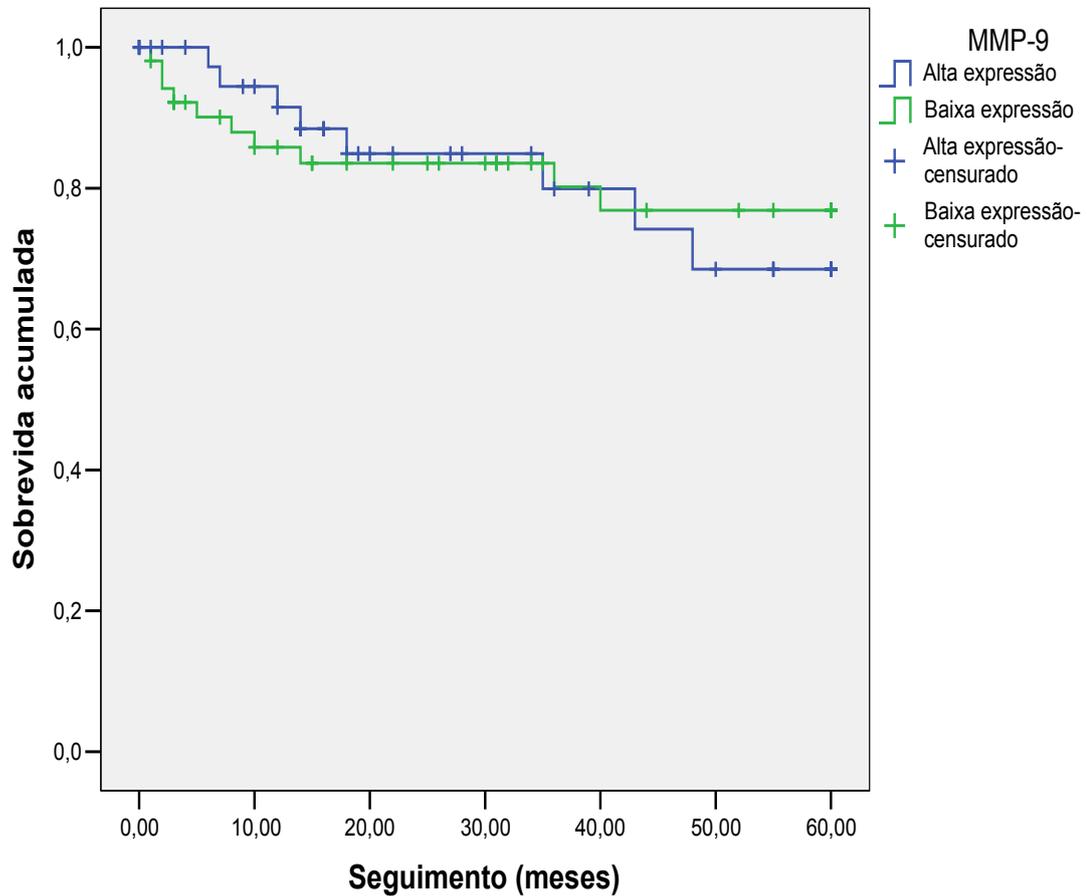
Notou-se correlação entre a expressão deste marcador com o tabagismo, tipo histológico e o grau. A Alta expressão da MMP-9 esteve mais freqüentemente associada a neoplasias de alto grau, a maior percentual de tumores de tipos não células claras e aos pacientes não tabagistas ( $p=0,009$ ;  $0,009$  e  $0,047$ , respectivamente) (Tabela 13).

A expressão IIQ da MMP-9 não se correlacionou ( $p>0,05$ ) com os seguintes fatores: idade, sexo, cor da pele, tipo de nefrectomia, tamanho tumoral, invasão linfática microscópica, invasão venosa macro e microscópica, invasão de estruturas adjacentes (adrenal, vias excretoras e gordura perirrenal), acometimento linfonodal, necrose e estadiamento (Tabelas 13,16 e 17).

Os níveis de expressão da MMP-2 também não se correlacionaram com as classificações de performance-status pelo ECOG ( $p=0,444$ ), ASA ( $p=0,217$ ) e KPS ( $p=0,585$ ).



**Figura 36** - Sobrevida global aos 5 anos, de 110 pacientes com CCR submetidos a nefrectomia, de acordo com a expressão imunohistoquímica da MMP-9;  $p=0,400$ .



**Figura 37** - Sobrevida livre de doença aos 5 anos, de 94 pacientes com CCR sem metástases ao diagnóstico, submetidos à nefrectomia de acordo com a expressão imunohistoquímica da MMP-9;  $p=0,859$ .

**Tabela 13** - Distribuição dos casos segundo a expressão de MMP9 e diversas variáveis do estudo (Hospital A. C. Camargo, 1980 a 2005).

Variável	Categoria	MMP 9		MMP 9		P
		Baixa expressão (*)		Alta expressão (*)		
		n	(%)	n	(%)	
Sexo	Masculino	31	(53,4)	37	(71,2)	0,056
	Feminino	27	(46,6)	15	(28,8)	
Cor de pele	Branca	54	(93,1)	43	(82,7)	0,091
	Não branca	4	(6,9)	9	(17,3)	
Tabagismo	Não	27	(46,6)	34	(65,4)	0,047
	Sim	31	(53,4)	18	(34,6)	
Tipo histológico	Células claras	54	(93,1)	39	(75,0)	0,009
	Outros	4	(6,9)	13	(25,0)	
Invasão linfática microscópica	Não	54	(93,1)	44	(84,6)	0,154
	Sim	5	(6,9)	8	(15,4)	
Invasão venosa microscópica	Não	47	(81,0)	36	(69,2)	0,151
	Sim	11	(19,0)	16	(30,8)	
Invasão da veia renal	Não	52	(88,1)	47	(92,2)	0,483
	Sim	7	(11,9)	4	(7,8)	
Invasão da veia cava inferior	Não	58	(98,3)	49	(96,1)	0,596
	Sim	1	(1,7)	2	(3,9)	
Invasão da pelve renal ou do ureter	Não	55	(93,2)	45	(88,2)	0,509
	Sim	4	(6,8)	6	(11,8)	
Invasão da adrenal	Não	56	(94,9)	44	(86,3)	0,183
	Sim	3	(5,1)	7	(13,7)	
Grau de Fuhrman	1 e 2	41	(70,7)	24	(46,2)	0,009
	3 e 4	17	(29,3)	28	(53,8)	
Necrose	Não	24	(41,4)	29	(55,8)	0,132
	Sim	34	(58,6)	23	(44,2)	
Metástase linfonodal	Não	30	(88,2)	18	(69,2)	0,068
	Sim	4	(11,8)	8	(30,8)	
Estadiamento	I e II	36	(62,1)	32	(61,5)	0,954
	III e IV	22	(37,9)	20	(38,5)	
Nefrectomia	Radical	43	(74,1)	39	(75,0)	0,917
	Parcial	15	(25,9)	13	(25,0)	

(\*) As categorias foram definidas a partir do valor mediano de cada marcador na população do estudo.

#### 4.1.9 A Densidade de Microvasos – DMV

A DMV aferida pela expressão IIQ do CD 31 variou de 0,01 a 3,28 microvasos/área, com média de 0,71 e mediana de 0,55 microvasos/ (dp: 0.632).

A probabilidade de SG aos 5 anos foi influenciada de modo limítrofe por este marcador, sendo 58% para os casos com baixa DMV versus 79,9% para os casos com DMV elevada ( $p=0,052$ ), respectivamente (Figura 38).

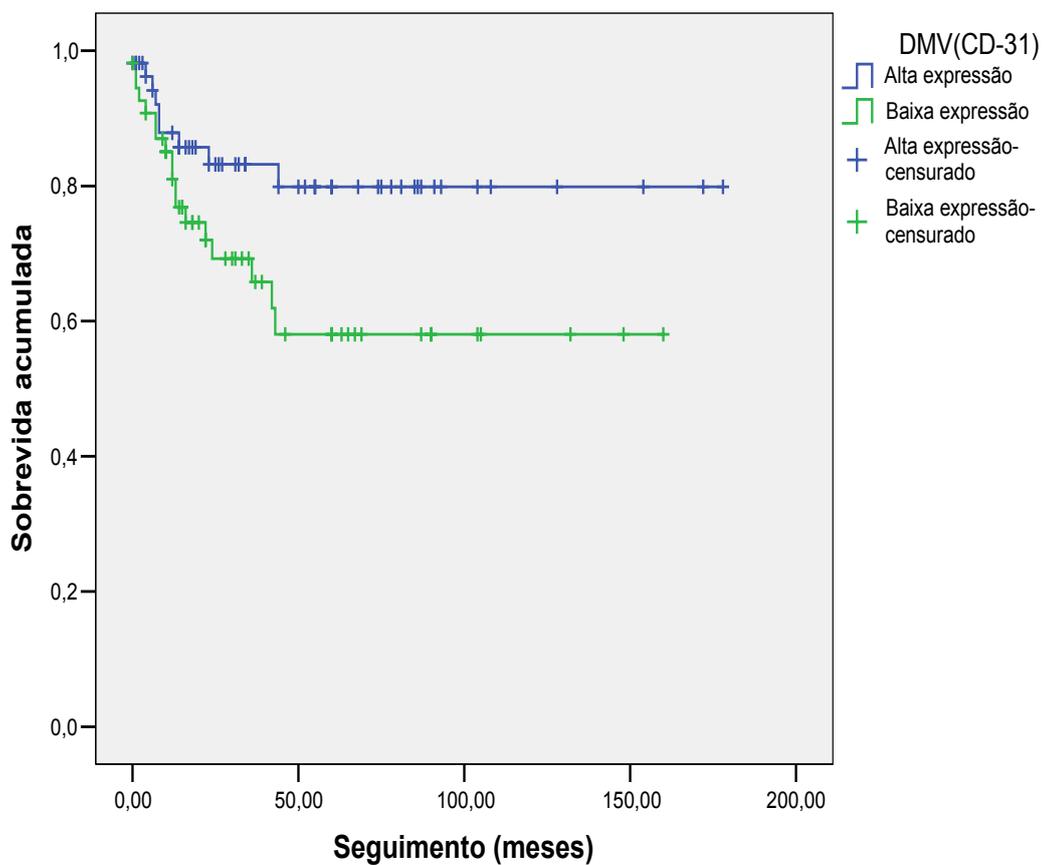
As taxas de SLD também não foram influenciadas pelos níveis de DMV. A SLD aos 5 anos dos pacientes com baixa DMV e com DMV elevada foi respectivamente de 57,1% e 86,3% ( $p=0,059$ ) (Figura 39).

Notamos correlação entre a DMV e a ocorrência de invasão da adrenal e com o estadiamento clínico. A invasão da adrenal foi mais freqüente entre os pacientes com menor densidade de microvasos por área (14,5%) em comparação aos pacientes maior DMV (3,6%,  $p=0,047$ ). Também se notou maior percentual de tumores de estádios avançados (III e IV) entre os pacientes com menor DMV em comparação aos pacientes com maior DMV (47,3% versus 29,1%, respectivamente,  $p=0,050$ ) (Tabela 14).

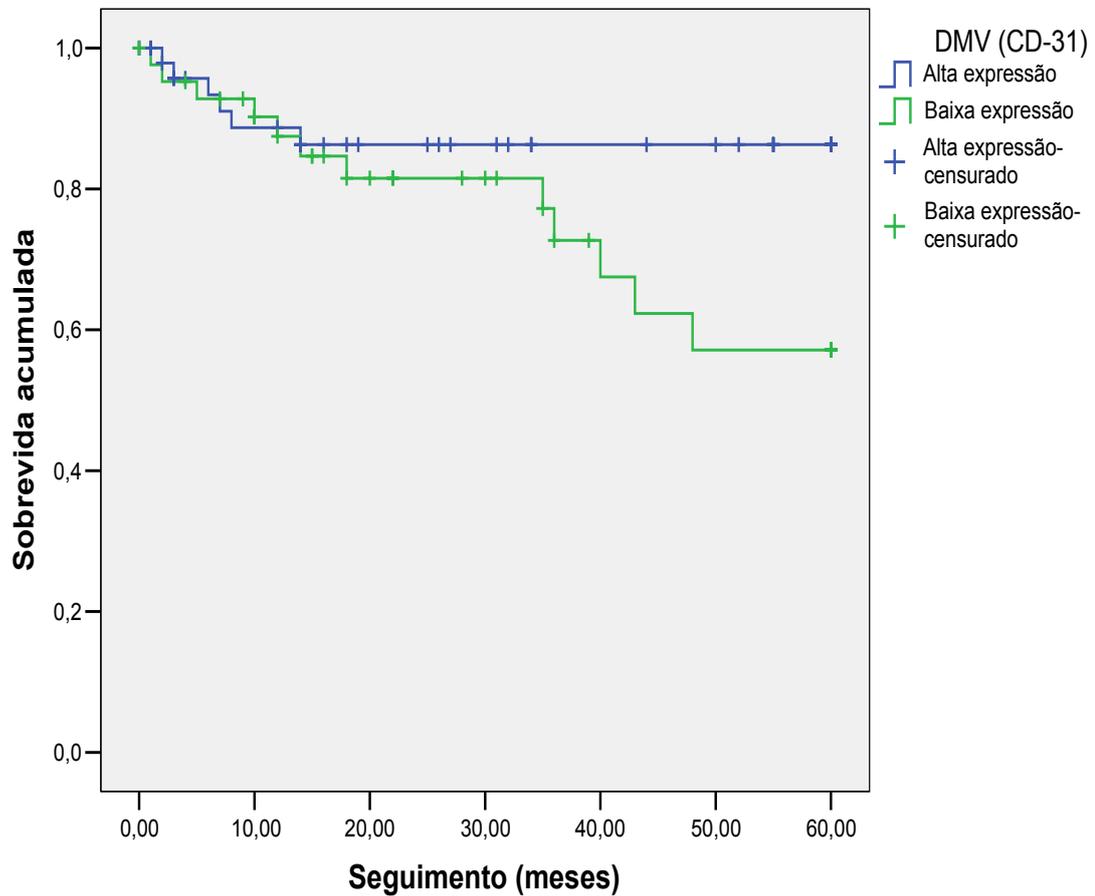
Também se encontrou correlação entre a DMV e o KPS. Dentre os 27 pacientes com  $KPS < 90$ , o predomínio foi de pacientes com baixa DMV (18 pacientes), versus 9 pacientes com DMV elevada ( $p=0,047$ ). A DMV não se correlacionou com as classificações de ASA ( $p=0,155$ ) ou de ECOG ( $p=0,074$ ).

A DMV aferida pelo CD31, não se correlacionou ( $p > 0,05$ , Tabelas 13, 16 e 17) com Idade, sexo, cor da pele, tabagismo, tamanho tumoral, tipo

histológico, grau, necrose, IVM e invasão linfática microscópica, invasão de gordura, v renal, v. cava inferior, linfonodos, pelve renal e ureter ou com o tipo de nefrectomia.



**Figura 38** - Sobrevida global aos 5 anos, de 110 pacientes com CCR submetidos a nefrectomia, de acordo com a expressão imunohistoquímica da DMV  $p=0,052$ .



**Figura 39** - Sobrevida livre de doença aos 5 anos, de 94 pacientes com CCR sem metástases ao diagnóstico, submetidos à nefrectomia de acordo com a expressão imunohistoquímica da DMV,  $p= 0,059$ .

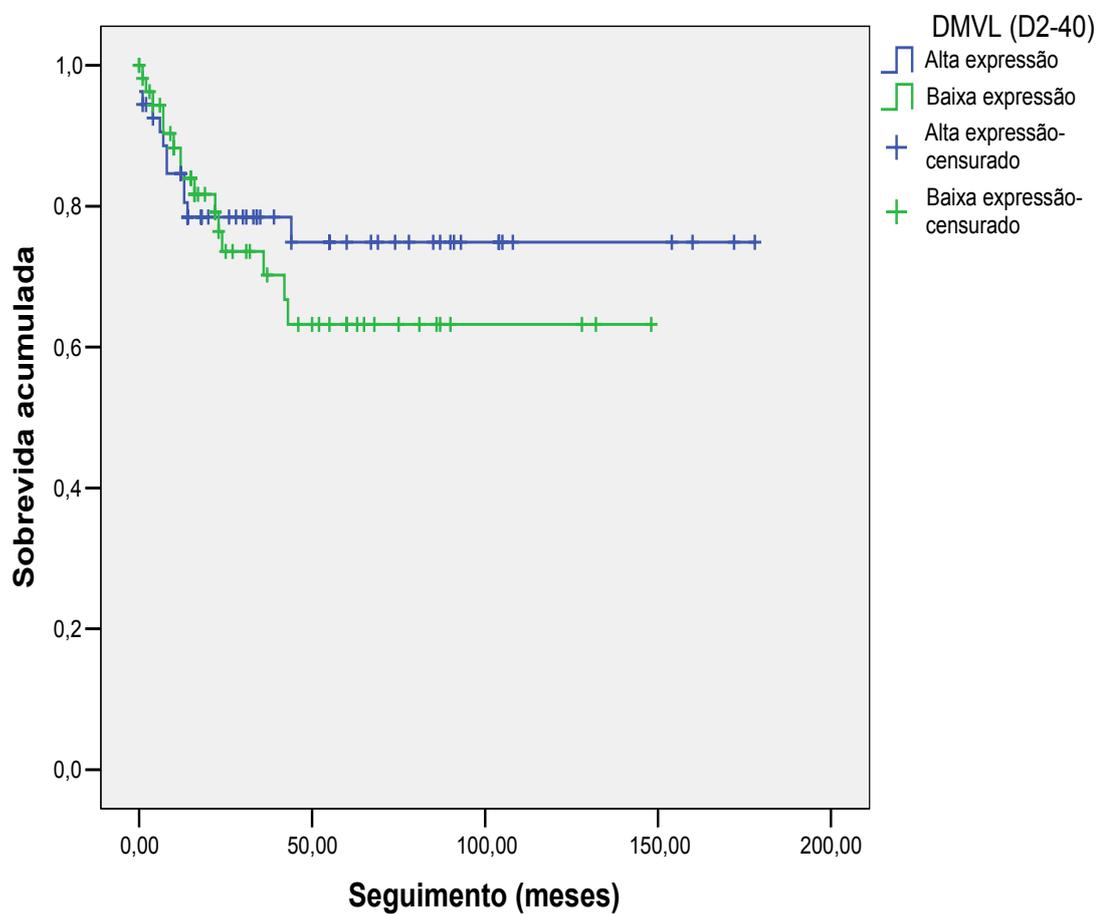
**Tabela 14** - Distribuição dos casos segundo a expressão de CD31 e diversas variáveis do estudo (Hospital A. C. Camargo, 1980 a 2005).

Variável	Categoria	DMV (CD31) Baixa expressão (*)		DMV (CD31) Alta expressão (*)		P
		n	(%)	n	(%)	
Sexo	Masculino	33	(60,0)	35	(63,6)	0,695
	Feminino	22	(40,0)	20	(36,4)	
Cor de pele	Branca	50	(90,9)	47	(85,5)	0,376
	Não branca	5	(9,1)	8	(14,5)	
Tabagismo	Não	35	(63,6)	26	(47,3)	0,084
	Sim	20	(36,4)	29	(52,7)	
Tipo histológico	Células claras	49	(89,1)	44	(80,0)	0,187
	Outros	6	(10,9)	11	(20,0)	
Invasão linfática microscópica	Não	47	(85,5)	51	(92,7)	0,221
	Sim	8	(14,5)	4	(7,3)	
Invasão venosa microscópica	Não	39	(70,9)	44	(80,0)	0,268
	Sim	16	(29,1)	11	(20,0)	
Invasão da veia renal	Não	48	(87,3)	51	(92,7)	0,340
	Sim	7	(12,7)	4	(7,3)	
Invasão da veia cava inferior	Não	53	(96,4)	54	(98,2)	1,000
	Sim	2	(3,6)	1	(1,8)	
Invasão da pelve renal ou do ureter	Não	48	(87,3)	52	(94,5)	0,185
	Sim	7	(12,7)	3	(5,5)	
Invasão da gordura ou do seio renal	Não	40	(72,7)	45	(81,8)	0,255
	Sim	15	(27,3)	10	(18,2)	
Invasão da adrenal	Não	47	(85,5)	53	(96,4)	0,047
	Sim	8	(14,5)	2	(3,6)	
Grau de Fuhrman	1 e 2	31	(56,4)	34	(61,8)	0,561
	3 e 4	24	(43,6)	21	(38,2)	
Necrose	Não	24	(43,6)	29	(52,7)	0,340
	Sim	31	(56,4)	26	(47,3)	
Metástase linfonodal	Não	24	(75,0)	24	(85,7)	0,301
	Sim	8	(25,0)	4	(14,3)	
Estadiamento	I e II	29	(52,7)	39	(70,9)	0,050
	III e IV	26	(47,3)	16	(29,1)	
Nefrectomia	Radical	40	(72,7)	42	(76,4)	0,662
	Parcial	15	(17,3)	13	(23,6)	

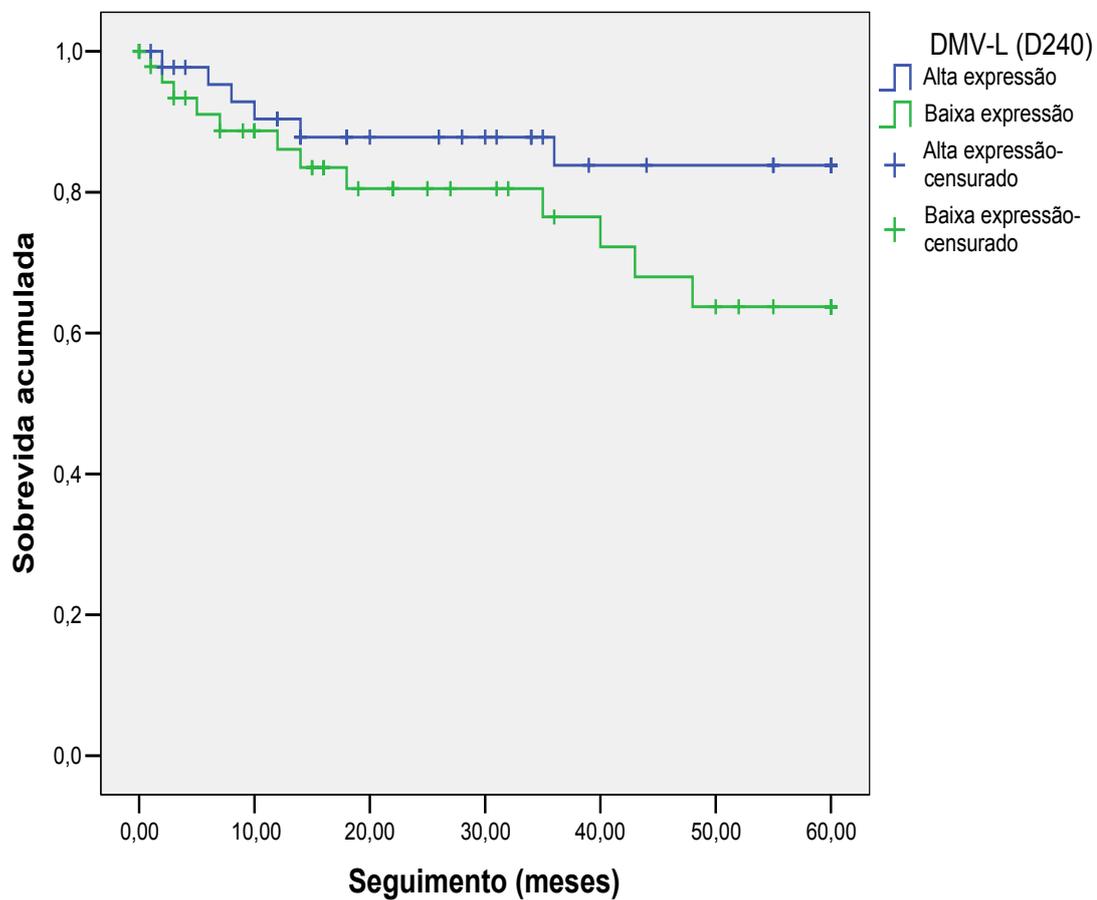
#### 4.1.10 A Densidade de Vasos Linfáticos DVL

A DVL aferida pelo D2-40 variou de 0,00 a 2,45 microvasos/área, com média de 0,45 e mediana de 0,32 microvasos/área (dp: 0,47). A probabilidade de SG aos 5 anos não foi influenciada por este marcador, sendo 63,2% versus 74,9% para os casos com baixa DVL e DVL elevada ( $p=0,532$ ), respectivamente (Figura 40).

As taxas de SLD também não foram influenciadas pelos níveis de DVL. A SLD aos 5 anos dos pacientes com baixa DVL e com alta DVL foi respectivamente de 63,7% e 83,8% ( $p=0,120$ ) (Figura 41). A DVL não se correlacionou a nenhuma das variáveis estudadas ( $p>0,05$ ), conforme as Tabelas 15,16 e17. Também não se correlacionou com as classificações de performance status pelo ECOG ( $p=0,431$ ) e ASA ( $p=0,704$ ) e KPS ( $p=0.320$ ).



**Figura 40** - Sobrevida global aos 5 anos, de 110 pacientes com CCR submetidos a nefrectomia, de acordo com a expressão imunohistoquímica da DVL;  $p=0,532$ .



**Figura 41** - Sobrevida livre de doença aos 5 anos, de 94 pacientes com CCR sem metástases ao diagnóstico, submetidos à nefrectomia de acordo com a expressão imunohistoquímica da DMV;  $p=0,120$ .

**Tabela 15** - Distribuição dos casos segundo a expressão de densidade de vasos linfáticos DVL D240 e diversas variáveis do estudo (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo, 1980 a 2005).

Variável	Categoria	DVL (D240)		DVL (D240)		P
		Baixa expressão(*)		Alta expressão (*)		
		n	(%)	n	(%)	
Sexo	Masculino	35	(62,5)	33	(61,1)	0,881
	Feminino	21	(37,5)	21	(38,9)	
Cor da pele	Branca	51	(91,1)	46	(85,2)	0,339
	Não branca	5	(8,9)	8	(14,8)	
Tabagismo	Não	34	(60,7)	27	(50,0)	0,258
	Sim	22	(39,3)	27	(50,0)	
Tipo histológico	Células claras	46	(82,1)	47	(87,0)	0,478
	Outros	10	(17,9)	7	(13,0)	
Invasão linfática microscópica	Não	49	(87,5)	49	(90,7)	0,586
	Sim	7	(12,5)	5	(9,3)	
Invasão venosa microscópica	Não	43	(76,8)	40	(74,1)	0,741
	Sim	13	(23,2)	14	(25,9)	
Invasão da veia renal	Não	50	(89,3)	49	(90,7)	0,799
	Sim	6	(10,7)	5	(9,3)	
Invasão da veia cava inferior	Não	54	(96,4)	53	(98,1)	1,000
	Sim	2	(3,6)	1	(1,9)	
Invasão da pelve renal ou do ureter	Não	53	(94,6)	47	(87,0)	0,199
	Sim	3	(5,4)	7	(13,0)	
Invasão da gordura ou do seio renal	Não	43	(76,8)	42	(77,8)	0,901
	Sim	13	(23,2)	12	(22,2)	
Invasão da adrenal	Não	51	(91,1)	49	(90,7)	1,000
	Sim	5	(8,9)	5	(9,3)	
Grau de Fuhrman	1 e 2	33	(58,9)	32	(59,3)	0,972
	3 e 4	23	(41,1)	22	(40,7)	
Necrose	Não	30	(53,6)	23	(42,6)	0,249
	Sim	26	(46,4)	31	(57,4)	
Metástase linfonodal	Não	23	(79,3)	25	(80,6)	0,897
	Sim	6	(20,7)	6	(19,4)	
Estadiamento	I e II	34	(60,7)	34	(63,0)	0,808
	III e IV	22	(39,3)	20	(37,0)	
Nefrectomia	Radical	39	(69,6)	43	(79,6)	0,229
	Parcial	17	(30,4)	11	(20,4)	

#### 4.1.11 Idade e fatores biomoleculares

Não se encontrou diferença estatística significativa entre as idades médias dos pacientes com alta ou baixa expressão dos marcadores estudados nesta série, conforme consta na Tabela 16.

**Tabela 16** - Idade média dos pacientes segundo a expressão dos marcadores biomoleculares (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Variável	Categoria (*)	N	Idade Média (Anos)	P (Teste T)
Caderina E	Negativo/Perda parcial	85	55,8	0,155
	Positivo	25	52,0	
VEGF	Baixa expressão	57	55,2	0,788
	Alta expressão	53	54,6	
NOS 1	Baixa expressão	55	56,8	0,089
	Alta expressão	55	53,0	
NOS 2	Baixa expressão	56	56,1	0,310
	Alta expressão	54	53,8	
NOS 3	Baixa expressão	60	55,6	0,528
	Alta expressão	50	54,2	
MMP 2	Baixa expressão	59	55,7	0,477
	Alta expressão	51	54,1	
MMP 9	Baixa expressão	58	55,6	0,552
	Alta expressão	52	54,2	
DMV (CD31)	Baixa expressão	55	54,7	0,815
	Alta expressão	55	55,2	
DVL (D240)	Baixa expressão	56	54,7	0,841
	Alta expressão	54	55,2	

(\*) As categorias do VEGF, NOS 1, NOS 2, NOS 3, MMP 2, MMP 9, DMV(CD31) e DVL(D240) foram definidas a partir do valor mediano de cada marcador na população do estudo.

#### **4.1.12 Tamanho Tumoral e fatores biomoleculares**

Verificamos correlação direta entre os níveis de expressão de todas as NOS e tamanho tumoral. Pacientes com alta expressão de NOS-1, NOS-2 e NOS-3, tiveram neoplasias de maior tamanho que seus pares com baixa expressão. Com a MMP-2, a correlação foi inversa, sendo que pacientes com alta expressão MMP-2 tiveram neoplasias de menor tamanho que pacientes com baixa expressão. A Caderina E, VEGF, MMP-9, DMV e DMV-L não se correlacionaram com o tamanho tumoral (Tabela 17).

**Tabela 17** - Tamanho Tumoral médio, segundo a expressão dos marcadores biomoleculares (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Variável	Categoria (*)	N	Tamanho médio (cm)	P (mann-whitney)
Caderina E	Negativo / Perda parcial	85	7,2	0,755
	Positivo	25	7,9	
VEGF	Baixa expressão	57	7,6	0,247
	Alta expressão	53	7,2	
NOS 1	Baixa expressão	55	6,5	0,015
	Alta expressão	55	8,2	
NOS 2	Baixa expressão	56	6,2	0,003
	Alta expressão	54	8,6	
NOS 3	Baixa expressão	60	6,0	< 0,001
	Alta expressão	50	9,0	
MMP 2	Baixa expressão	59	8,6	0,001
	Alta expressão	51	6,0	
MMP 9	Baixa expressão	58	7,6	0,493
	Alta expressão	52	7,2	
DMV (CD31)	Baixa expressão	55	8,1	0,123
	Alta expressão	55	6,7	
DVL (D240)	Baixa expressão	56	6,4	0,077
	Alta expressão	54	8,4	

(\*) As categorias do VEGF, NOS 1, NOS 2, NOS 3, MMP 2, MMP 9, CD31 e D240 foram definidas a partir do valor mediano de cada marcador na população do estudo.

## 4.2 ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL

### 4.2.1 Análise univariada

Ao analisarmos fatores demográficos e de estilo de vida, não encontramos impacto significativo destas variáveis. Obviamente os pacientes mais jovens tiveram SG superior, porém sem significância estatística.

Curiosamente os tabagistas tiveram taxas de SG ligeiramente superior aos não tabagistas (Tabela 18).

**Tabela 18** - Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos segundo as variáveis demográficas e de estilo de vida (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Variável	Categoria	N	SG (% 5 anos)	P
Idade	Até 55 anos	61	77,7	0,198
	> 55 anos	49	60,2	
	Até 45 anos	25	75,4	0,620
	> 45 anos	85	67,7	
Raça	Branco	97	69,0	0,822
	Não branco	13	66,7	
Sexo	Feminino	68	66,2	0,405
	Masculino	42	73,9	
Tabagismo	Não	61	62,1	0,269
	Sim	49	77,7	

SG: Sobrevida global.

De acordo com a Tabela 19, as classificações de performance-status e a classificação de ASA, bem como a sintomatologia e os níveis de hemoglobina foram significativos na análise univariada. Pacientes com pouco ou nenhum impacto da doença no estado geral (ECOG 0 e KPS 90-100) tiveram SG muito superior (quase 80%) a daqueles com impacto causado pela doença (cerca de 30%). Pacientes com mais co-morbidades (classificações II e III de ASA), também atingiram menores taxas de SG aos 5 anos em comparação aos pacientes ASA I, à semelhança dos pacientes sintomáticos ou com hemoglobina menor que 11g/dl.

**Tabela 19** - Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos segundo as variáveis clínicas (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Variável	Categoria	N	SG (% 5 anos)	P
ECOG	0	84	78,2	0,001
	1 + 2	26	31,0	
Escala de Karnofski	90-100	83	79,1	< 0,001
	≤ 80	27	29,9	
	100	34	95,5	< 0,001
	90	49	68,9	
	80	19	33,8	
	60-70	8	30,0	
ASA	1	17	94,1	0,004
	2	71	71,4	
	3	22	39,0	
Sintomas	Não	44	84,1	0,004
	Sim	66	60,0	
Hemoglobina	≥ 11,0 g/dl	94	74,5	0,023
	< 11,0 g/dl	16	43,3	

SG: Sobrevida global.

As variáveis relacionadas ao tratamento e a evolução pós operatória não tiveram impacto na análise univariada para SG (Tabela 20), com exceção da realização de transfusão, sendo que os pacientes transfundidos tiveram metade da probabilidade de SG aos 5 anos em relação aos não transfundidos.

Embora sem significância estatística, verificamos que nos pacientes em que se realizou a linfadenectomia considerada com adequada (ressecção de 8 ou mais linfonodos) tiveram maior probabilidade de SG em

5 anos, em comparação pacientes em que se ressecou menos de 8 linfonodos, ou não se realizou a ressecção linfática.

**Tabela 20** - Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos segundo as variáveis relacionadas ao tratamento (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Variável	Categoria	N	Sg (% 5 anos)	P
Tipo de nefrectomia	Radical	82	66,2	0,294
	Parcial	28	78,1	
Incisão cirúrgica	Incisão abdominal	69	67,1	0,456
	Lombotomia	41	70,9	
Linfadenectomia	8 linfonodos ou mais	26	83,3	0,069
	Menos de 8 linfonodos	34	56,2	
	Não realizada / sem linfonodos	50	69,8	
	Adequada (#)	26	83,3	0,145
	Inadequada (#)	84	64,4	
Cirurgia realizada	Nefrectomia radical e linfadenectomia adequada (#)	25	82,5	0,123
	Nefrectomia radical e linfadenectomia inadequada (#)	57	59,1	
	Nefrectomia parcial	28	78,1	
Margens cirúrgicas	Livres	100	70,9	0,086
	Comprometidas	10	57,1	
Transusão	Não	76	88,5	< 0,001
	Sim	34	43,0	
Tempo cirúrgico	Até 3 horas	40	60,3	0,618
	> 3 horas	70	72,3	
Dias de internação	Até 7 dias	97	68,9	0,580
	> 7 dias	12	75,0	
Complicações pós-operatórias precoces	Não	91	68,5	0,637
	Sim	19	71,3	
Complicações pós-operatórias tardias	Não	96	69,2	0,670
	Sim	14	68,2	

SG: Sobrevida global. (#)Linfadenectomia adequada (8 ou mais linfonodos regionais dissecados)Linfadenectomia inadequada (menos de 8 linfonodos regionais dissecados ou linfadenectomia não realizada)

Todas as variáveis anatomopatológicas microscópicas estudadas, (exceto o tipo histológico) afetaram de modo significativo a probabilidade de SG aos 5 anos na análise univariada. Pacientes com neoplasias de alto grau, acometimento linfonodal, presença de necrose, IVM e invasão linfática microscópica tiveram as piores taxas de SG (Tabela 21).

**Tabela 21** - Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos segundo as variáveis anatomopatológicas microscópicas (110 pacientes com CCR-Hospital A. C. Camargo).

Variável	Categoria	N	SG (% 5 anos)	P
Grau de Fuhrman	Baixo grau (I e II)	65	77,9	0,010
	Alto grau (III e IV)	45	56,6	
Tipo histológico	Células claras	93	74,0	0,100
	Papilífero	10	43,0	
	Cromóforo	5	0,0	
	Outros	2	0,0	
	Células claras	93	74,0	0,062
	Não células claras	17	40,4	
Invasão venosa microscópica	Não	83	76,8	0,001
	Sim	27	49,0	
Invasão linfática microscópica	Não	98	73,6	0,001
	Sim	12	37,0	
Invasão vascular microscópica (sanguínea e/ou linfática)	Não	81	78,0	0,001
	Sim	29	47,5	
Necrose tumoral	Não	53	76,6	0,022
	Sim	57	61,9	
Metástase linfonodal	Não	48	79,7	< 0,001
	Sim	12	28,1	
	Ignorado	50	69,8	

SG: Sobrevida global.

O tamanho tumoral e as variáveis anatomopatológicas macroscópicas afetaram a probabilidade de SG aos 5 anos, com exceção da presença de multifocalidade ou invasão adrenal. Pacientes com tumores > 7,0 cm, acometendo mais de um pólo renal e com invasão de estruturas adjacentes, com exceção da adrenal, tiveram menores taxas de SG (Tabela 22).

**Tabela 22** - Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos segundo as variáveis anatomopatológicas macroscópicas (110 pacientes com CCR-Hospital A. C. Camargo).

Variável	Categoria	N	SG (% 5 anos)	P
Tamanho do tumor	Até 7 cm	63	82,6	0,003
	> 7 cm	47	53,6	
Multifocalidade	Não	104	68,3	0,632
	Sim	6	83,3	
Topografia da lesão no rim	Somente em um pólo do rim	71	82,8	< 0,001
	Mais de um pólo do rim	39	47,7	
Invasão da veia renal	Não	99	72,6	0,008
	Sim	11	45,5	
Invasão da veia cava inferior	Não	107	70,7	0,095
	Sim	3	33,3	
Invasão da pelve renal ou do ureter	Não	100	72,5	0,003
	Sim	10	40,0	
Invasão da gordura ou do seio renal	Não	85	73,9	0,016
	Sim	25	53,3	
Invasão da adrenal	Não	100	70,6	0,582
	Sim	10	39,4	

SG: Sobrevida global.

A Tabela 23 mostra resumidamente o que já foi demonstrado anteriormente, em que dentre as variáveis biomoleculares estudadas, apenas a alta expressão da NOS-3 e a baixa DMV (limítrofe:  $p=0,052$ ), tiveram impacto negativo na chances de SG em 5 anos.

**Tabela 23** - Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos segundo as variáveis biomoleculares (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Variável	Categoria (*)	N	Sg (% 5 anos)	P
VEGF	Baixa expressão	57	69,9	0,966
	Alta expressão	33	68,2	
NOS 1	Baixa expressão	55	67,1	0,800
	Alta expressão	55	71,4	
NOS 2	Baixa expressão	56	74,3	0,447
	Alta expressão	54	65,0	
NOS 3	Baixa expressão	60	79,4	0,033
	Alta expressão	50	58,1	
MMP 2	Baixa expressão	59	68,6	0,809
	Alta expressão	51	69,1	
MMP 9	Baixa expressão	58	75,0	0,400
	Alta expressão	52	60,8	
Caderina	Negativo	54	76,0	0,549
	Perda parcial	31	57,6	
	Positivo	25	70,8	
	Negativo / Perda parcial	85	69,2	0,919
DMV (CD31)	Baixa expressão	55	58,0	0,052
	Alta expressão	55	79,9	
DVL (D240)	Baixa expressão	56	63,2	0,532
	Alta expressão	54	74,9	

SG: Sobrevida global. (\*) As categorias do VEGF, NOS 1, NOS 2, MMP, MMP 9, DMV (CD-31) e DMV-L (D2-40) foram definidas a partir do valor mediano de cada marcador na população do estudo.

Pacientes com estádios clínicos avançados (estádios III e IV) tiveram piores probabilidade de SG aos 5 anos, em comparação aos estádios I e II. Tanto quando analisados separadamente como quando agrupados em estádios inicial e avançado (Tabela 24).

**Tabela 24** - Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos segundo o estadiamento (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Variável	Categoria	N	Sg (% 5 anos)	P
Estadiamento	I	54	91,7	< 0,001
	II	14	71,3	
	III	26	59,5	
	IV	16	22,9	
	Estádio inicial (I e II)	68	85,5	< 0,001
	Estádio avançado (III e IV)	42	46,0	

SG: Sobrevida global.

Conforme se visualiza na Tabela 25, a ocorrência de falha terapêutica, tanto como recidiva ou como recorrência, afetaram de modo significativo a probabilidade de SG aos 5 anos desta população. Para pacientes com recidiva, a probabilidade de estar vivos em 5 anos foi 30%, para pacientes com progressão (já metastáticos ao diagnóstico) essa chance foi zero.

**Tabela 25** - Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos segundo as variáveis de seguimento (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Variável	Categoria (*)	N	Sg (% 5 anos)	P
Falha da doença	Não	82	88,4	< 0,001
	Recorrência da doença	18	30,9	
	Progressão da doença	10	0,0	
	Não	82	88,4	< 0,001
	Sim (recorrência ou progressão)	28	22,6	

SG: Sobrevida global.

#### 4.2.2 Análise Multivariada

De acordo com as análises univariadas da SG, identificamos através do modelo de Cox os seguintes fatores de risco independentes para a morte em 5 anos: Estadiamento agrupado (I e II versus III e IV), grau agrupado (1 e 2 versus 3 e 4), KPS agrupado (90-100 versus  $\leq 80$ ), falha (recidiva e progressão) e a idade como variável contínua, que serviu para ajuste com as demais variáveis (variável com menor risco HR:1,1) (Tabela 26).

**Tabela 26** - Fatores de risco independentes para o óbito identificados pelo modelo de riscos proporcionais de Cox (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Variável	Categoria	Hr	Ic 95% (hr)	P
Estadiamento	Estádios I e II	1,0	Referência	0,007
	Estádios III e IV	4,5	1,5 – 13,4	
Grau histológico (Fuhrman)	Graus 1 e 2	1,0	Referência	0,014
	Graus 3 e 4	2,9	1,2 – 6,7	
Escala de Karnofski	90 – 100	1,0	Referência	0,038
	≤ 80	2,5	1,1 – 6,1	
Falha	Não	1,0	Referência	< 0,001
	Recorrência de doença	6,3	2,4 – 16,6	
	Progressão de doença	5,5	1,9 – 16,0	
Idade	(Variável contínua)	1,1	1,0 – 1,1	0,028

HR: Hazard ratio.

IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

Com as variáveis selecionadas na análise de Cox ajustada pela idade (HR 1,1) atribuímos uma pontuação de acordo com o maior ou menor risco para o evento estudado. As maiores pontuações foram para pacientes com falhas terapêuticas (3 pontos) seguidos pelos pacientes com estádios avançados (2 pontos) e pelos pacientes com neoplasias de alto grau ou com KPS ≤ 80 (1 ponto), conforme a Tabela 26.

**Tabela 27** - Pontos atribuídos às variáveis para a confecção do escore para prever a sobrevida global (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Variável	Categoria	Coefficiente regressão (*)	de	Ponto atribuído
Estadiamento	Estádios I e II	-		0
	Estádios III e IV	1,506		2
Grau histológico (Fuhrman)	Graus 1 e 2	-		0
	Graus 3 e 4	1,055		1
Escala de Karnofski	90 – 100	-		0
	≤ 80	0,932		1
Falha	Não	-		0
	Recorrência de doença	de 1,841		3
	Progressão de doença	de 1,707		3

(\*) Os coeficientes de regressão estão ajustados pela idade.

Com a pontuação estabelecida, distribuímos os casos num escore para a ocorrência de óbito em 5 anos (Tabela 28). Este escore variou de 0 a 7 pontos. Nenhum paciente com escore zero morreu e 100% dos pacientes com escore 7 morreram em 5 anos. A porcentagem de pacientes mortos foi similar nos escores 1 e 2 e crescente a partir do escore 3. Mais da metade dos pacientes com escores  $\geq 4$  morreram pela doença (Tabela 27).

**Tabela 28** - Número e porcentagem de casos conforme a pontuação do escore e a ocorrência de óbito, num período de acompanhamento de 5 anos (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Pontuação no escore	Óbito		Total
	Não	Sim	
0	38 (100,0%)	0 (0,0%)	38 (100,0%)
1	14 (87,5%)	2 (12,5%)	16 (100,0%)
2	15 (88,2%)	2 (11,8%)	17 (100,0%)
3	6 (75,0%)	2 (25,0%)	8 (100,0%)
4	4 (44,4%)	5 (55,6%)	9 (100,0%)
5	2 (50,0%)	2 (50,0%)	4 (100,0%)
6	4 (25,0%)	12 (75,0%)	16 (100,0%)
7	0 (0,0%)	2 (100,0%)	2 (100,0%)

Qui-quadrado de tendência linear:  $P < 0,001$

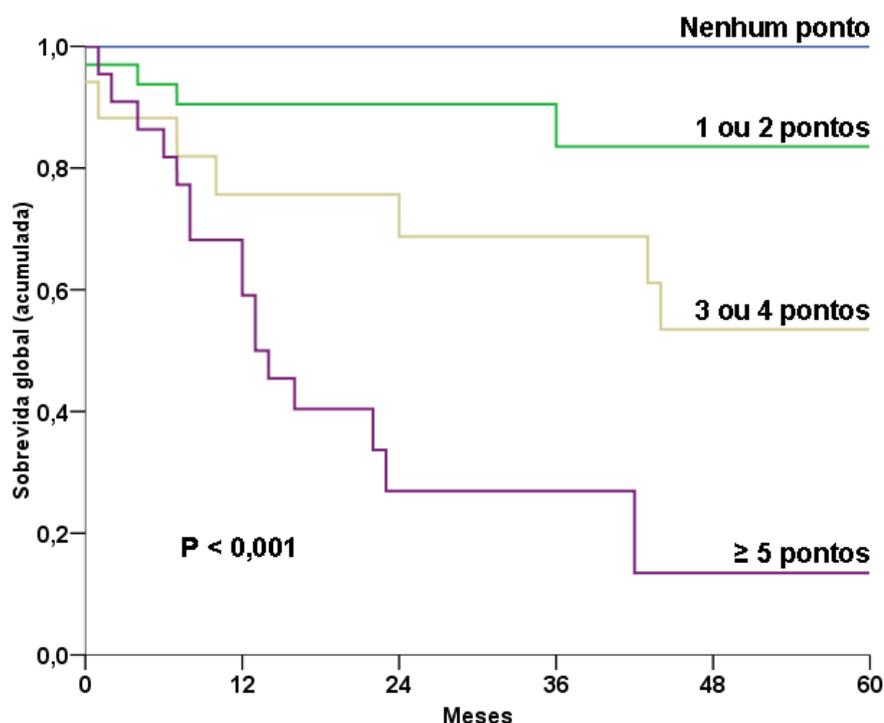
De acordo com a pontuação obtida no escore, categorizamos os pacientes em 4 grupos com probabilidades decrescentes de SG aos 5 anos: Escores 0, 1-2, 3-4 e 5-7.

A probabilidade de estar vivo em 5 anos foi respectivamente de 100%, 83,5%, 53,5% e 13,5% para os pacientes de escores 0, 1-2, 3-4 e  $\geq 5$ , conforme a Tabela 29 e a Figura 42.

**Tabela 29** - Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos segundo a pontuação obtida no escore para predizer o óbito (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Pontuação	N	Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos
0	38	100,0%
1 – 2	33	83,5%
3 – 4	17	53,5%
5 - 7	22	13,5%

Teste de log-rank:  $P < 0,001$



**Legenda:** Para a confecção do escore foram consideradas as variáveis identificadas no modelo de riscos proporcionais de Cox, a saber: estadiamento, grau histológico, escala de Karnofski e falha da doença (recorrência ou progressão), todas ajustadas pela idade. (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo, 1980 a 2005).

**Figura 42** - Curvas de sobrevida global segundo a pontuação obtida no escore para predizer o óbito.

Quando optamos por retirar do escore original a variável falha de doença (recidiva ou progressão), obtivemos um escore simplificado do MMH. Com este escore simplificado, a pontuação máxima obtida não foi mais 7 pontos, mas 4 pontos, uma vez que foram excluídos os 3 pontos respectivos às falhas terapêuticas.

Este escore simplificado variou, portanto de 0 a 4 pontos e conforme demonstrado na Tabela 30, apenas 2,4% dos pacientes com 0 pontos morreram, versus cerca de 20% dos pacientes com 1 ou 2 pontos. Entre os pacientes com 3 ou 4 pontos registrou-se cerca de 62% de óbitos (Tabela 30).

**Tabela 30** - Número e porcentagem de casos conforme a pontuação do escore simplificado MMH e a ocorrência de óbito, num período de acompanhamento de 5 anos (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Pontuação no escore simplificado	Óbito		Total
	Não	Sim	
0	40 (97,6%)	1 (2,4%)	41 (100,0%)
1	15 (78,9%)	4 (21,1%)	19 (100,0%)
2	17 (81,0%)	4 (19,0%)	21 (100,0%)
3	8 (38,1%)	13 (61,9%)	21 (100,0%)
4	3 (37,5%)	5 (62,5%)	8 (100,0%)

Qui-quadrado de tendência linear:  $P < 0,001$

De acordo com a pontuação obtida neste escore simplificado do MMH, categorizamos novamente os pacientes, agora em 3 grupos, com probabilidades decrescentes de SG aos 5 anos: Escores 0, 1-2, 3-4.

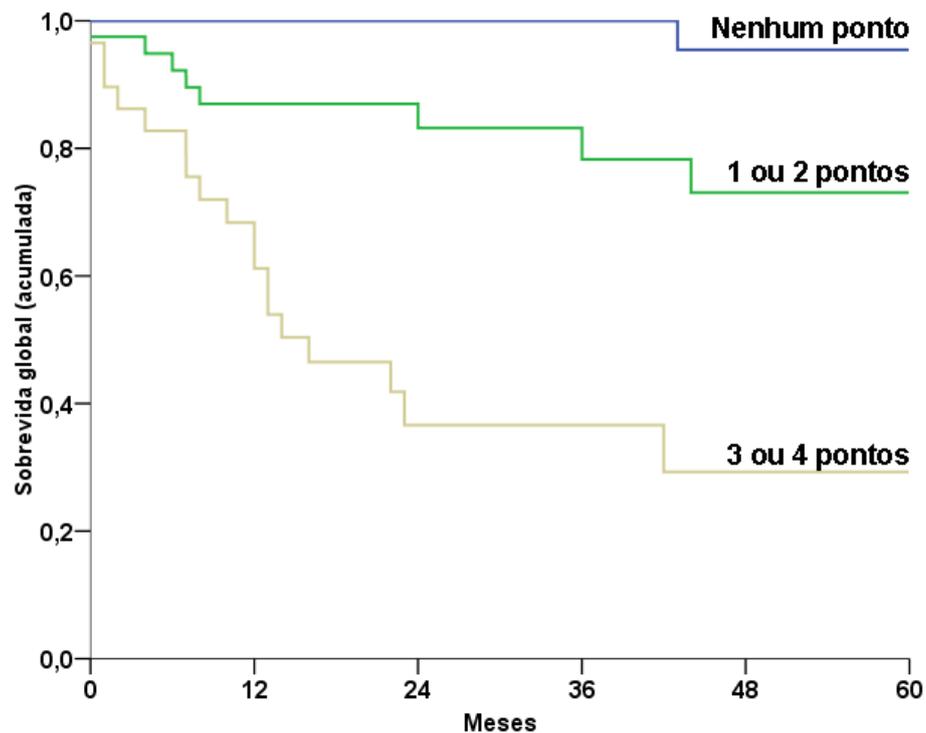
A probabilidade de estar vivo em 5 anos foi respectivamente de 95,5%, 73,1%, 29,3% para os pacientes de escores 0, 1-2, 3-4, conforme a Tabela 31 e a Figura 43.

**Tabela 31** - Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos segundo a pontuação obtida no escore simplificado do MMH para predizer o óbito. (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo).

Pontuação no Escore simplificado	N	Probabilidade de sobrevida global aos 5 anos
0	41	95,5%
1 – 2	40	73,1%
3 – 4	29	29,3%

---

Teste de log-rank: P<0,001



**Legenda:** Para a confecção do escore foram consideradas as variáveis identificadas no modelo de riscos proporcionais de Cox, a saber: estadiamento, grau histológico, escala de Karnofski, todas ajustadas pela idade. A variável falha da doença foi suprimida (110 pacientes com CCR- Hospital A. C. Camargo, 1980 a 2005).

**Figura 43** - Curvas de sobrevida global segundo a pontuação obtida no escore simplificado do MMH para predizer o óbito.

### 4.3 ANÁLISE de SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

#### 4.3.1 Análise Univariada

Nenhuma das variáveis demográficas e de estilo de vida influenciaram a probabilidade de SLD em 5 anos. Embora sem níveis de significância estatística, pacientes mais velhos (maiores que 45 e que 55 anos) tiveram taxas de SLD superiores aos mais jovens (Tabela 32).

**Tabela 32** - Probabilidade de sobrevida livre de doença aos 5 anos segundo as variáveis demográficas e de estilo de vida (94 pacientes com CCR sem metástases ou margens positivo - Hospital A. C. Camargo, 1980 a 2005).

Variável	Categoria	N (*)	Slid	P
			(% 5 anos)	
Idade	Até 55 anos	53	70,7	0,850
	> 55 anos	41	77,1	
	Até 45 anos	22	63,8	0,601
	> 45 anos	72	76,4	
Raça	Branco	83	75,2	0,885
	Não branco	11	62,5	
Sexo	Feminino	55	77,7	0,546
	Masculino	39	69,6	
Tabagismo	Não	55	68,4	0,067
	Sim	39	82,7	

(\*) Os pacientes com metástase à distância na admissão ou com margens cirúrgicas macroscópicas comprometidas foram excluídos da análise.

A maioria dos fatores clínicos estudados não influenciou as probabilidades de SLD em 5 anos, com exceção dos níveis de hemoglobina. Pacientes com hemoglobina inferior a 11 g/dl tiveram probabilidade de SLD em 5 anos de 57% versus 77% para os pacientes com hemoglobina > 11 g/dl (p=0,042), conforme Tabela 33.

**Tabela 33** - Probabilidade de sobrevida livre de doença aos 5 anos segundo as variáveis clínicas (94 pacientes com CCR sem metástases ou margens positivas - Hospital A. C. Camargo, 1980 a 2005).

Variável	Categoria	N (*)	Slid (% 5 anos)	P
ECOG	0	76	75,2	0,432
	1 -2	18	70,3	
Escala de Karnofski	90-100	75	76,2	0,152
	≤ 80	19	66,4	
	100	33	75,1	
	90	42	76,0	
	80	12	73,3	
ASA	60-70	7	55,6	0,334
	1	17	88,2	
	2	61	73,6	
	3	16	50,8	
Sintomas	Não	41	82,8	0,066
	Sim	53	67,5	
Hemoglobina	≥ 11,0 g/dl	82	77,2	0,042
	< 11,0 g/dl	12	57,1	

(\*) Os pacientes com metástase à distância na admissão ou com margens cirúrgicas macroscópicas comprometidas foram excluídos da análise

Em sintonia com o verificado na tabela anterior, a necessidade de transfusão sanguínea foi o único fator entre as variáveis relacionadas ao tratamento que teve impacto nas taxas de SLD aos 5 anos (Tabela 34).

Pacientes que receberam transfusão tiveram menores taxas de SLD que os não transfundidos (55,7% versus 81,1%, respectivamente,  $p=0,005$ ).

**Tabela 34** - Probabilidade de sobrevida livre de doença aos 5 anos segundo as variáveis relacionadas ao tratamento (94 pacientes com CCR sem metástases ou margens positivas- Hospital A. C. Camargo, 1980 a 2005).

Variável	Categoria	N (*)	Slid (% 5 anos)	P
Tipo de nefrectomia	Radical	68	71,5	0,171
	Parcial	26	72,9	
Incisão cirúrgica	Incisão abdominal	59	70,6	0,143
	Lombotomia	35	74,9	
Linfadenectomia	8 linfonodos ou mais	24	70,5	0,436
	Menos de 8 linfonodos	26	65,1	
	Não realizada / sem linfonodos	44	79,9	
	Adequada (#)	24	70,5	0,631
	Inadequada (#)	70	75,0	
Cirurgia realizada	Nefrectomia radical e linfadenectomia adequada (#)	23	75,7	0,357
	Nefrectomia radical e linfadenectomia inadequada (#)	45	68,9	
	Nefrectomia parcial	26	72,9	
Margens cirúrgicas (microscópicas)	Livres	88	74,8	0,961
	Comprometidas	6	0,0 (§)	
Transfusão	Não	68	81,1	0,005
	Sim	26	55,7	
Tempo cirúrgico	Até 3 horas	33	63,1	0,305
	> 3 horas	61	77,5	
Dias de internação	Até 7 dias	86	76,4	0,388
	> 7 dias	7	33,3	
Complicação pós-operatória precoce	Não	79	72,9	0,564
	Sim	15	80,2	
Complicação pós-operatória tardia	Não	84	74,1	0,900
	Sim	10	75,0	

(\*) Os pacientes com metástase à distância na admissão ou com margens cirúrgicas macroscópicas comprometidas foram excluídos da análise. (§) Apenas 1 paciente foi considerado para o cálculo da probabilidade de sobrevida. Os outros 5 pacientes foram censurados antes de 60 meses (sem doença). (#)Linfadenectomia adequada (8 ou mais linfonodos regionais dissecados)Linfadenectomia inadequada (menos de 8 linfonodos regionais dissecados ou linfadenectomia não realizada)

Dentre as variáveis anatomopatológicas microscópicas estudadas, apenas a invasão linfática microscópica teve impacto na probabilidade de SLD aos 5 anos. A sobrevida livre de doença foi significativamente reduzida (30%) nos pacientes com este tipo de invasão versus os demais (76.8%). A ocorrência de invasão capilar microscópica, independente do tipo, venoso ou linfático, também interferiu na SLD (Tabela 35).

**Tabela 35** - Probabilidade de sobrevida livre de doença aos 5 anos segundo as variáveis anatomopatológicas microscópicas (94 pacientes com CCR sem metástases ou margens positivas- Hospital A. C. Camargo, 1980 a 2005).

Variável	Categoria	N (*)	Slid (% 5 anos)	P
Grau de Fuhrman	Baixo grau (1 e 2)	61	75,6	0,519
	Alto grau (3 e 4)	33	71,7	
Tipo histológico	Células claras	83	76,1	0,623
	Papilífero	6	53,3	
	Cromóforo	5	75,0	
	Outros	0	--	
Invasão microscópica	venosa Não	83	76,1	0,338
	venosa Não células claras	11	51,9	
Invasão microscópica	venosa Sim	76	76,9	0,145
	venosa Sim	18	61,4	
Invasão microscópica	linfática Não	89	76,8	0,021
	linfática Sim	5	30,0	
Invasão capilar (sanguínea e/ou linfática)	Não	75	89,6	0,048
	Sim	19	57,7	
Necrose tumoral	Não	49	66,4	0,781
	Sim	45	80,5	
Metástase linfonodal	Não	44	69,9	0,361
	Sim	6	60,0	
	Ignorado	44	79,9	

(\*) Os pacientes com metástase à distância na admissão ou com margens cirúrgicas macroscópicas comprometidas foram excluídos da análise.

Dentre as variáveis anatomopatológicas macroscópicas, o tamanho tumoral (> 7cm), o acometimento de mais de um pólo renal, a invasão da veia renal e da gordura perirrenal foram fatores que tiveram impacto significativos na redução das probabilidades de SLD, conforme a Tabela 36.

**Tabela 36** - Probabilidade de sobrevida livre de doença aos 5 anos segundo as variáveis anatomopatológicas macroscópicas (94 pacientes com CCR sem metástases ou margens positivas- Hospital A. C. Camargo, 1980 a 2005).

Variável	Categoria	N (*)	Slid (% 5 anos)	P
Tamanho do tumor	Até 7 cm	59	79,9	0,011
	> 7 cm	35	63,1	
Multifocalidade	Não	90	74,7	0,984
	Sim	4	66,7	
Topografia da lesão no rim	Somente em um pólo do rim	66	78,6	0,020
	Mais de um pólo do rim	28	61,3	
Invasão da veia renal	Não	89	76,8	0,014
	Sim	5	30,0	
Invasão da veia cava inferior	Não	91	74,5	0,283
	Sim	3	66,7	
Invasão da pelve renal ou do ureter	Não	90	73,7	0,883
	Sim	4	75,0	
Invasão da gordura ou do seio renal	Não	75	80,2	0,001
	Sim	19	51,5	
Invasão da adrenal	Não	88	74,9	0,992
	Sim	6	0,0 (#)	

(\*) Os pacientes com metástase à distância na admissão ou com margens cirúrgicas macroscópicas comprometidas foram excluídos da análise.

(#) Apenas 1 paciente foi considerado para o cálculo da probabilidade de sobrevida. Os outros 5 pacientes foram censurados antes de 60 meses (sem doença).

Como demonstrado anteriormente, nenhuma das variáveis biomoleculares estudadas teve impacto significativa na probabilidade de SLD aos 5 anos (Tabela 37). Apenas a densidade de Microvasos (DMV) teve significância pouco superior ao limite estabelecido ( $p=0,059$ ) e apresentou correlação inversa com as taxas de SLD. Pacientes com DMV elevada tiveram maior probabilidade de SLD do que os com baixa DMV (86,3% versus 57,1%, respectivamente).

**Tabela 37** - Probabilidade de sobrevida livre de doença aos 5 anos segundo as variáveis biomoleculares (94 pacientes com CCR sem metástases ou margens positivas- Hospital A. C. Camargo, 1980 a 2005).

Variável	Categoria (#)	N (*)	Slid (% 5 anos)	P
VEGF	Baixa expressão	48	73,5	0,580
	Alta expressão	46	72,5	
NOS 1	Baixa expressão	47	67,4	0,271
	Alta expressão	47	80,8	
NOS 2	Baixa expressão	47	81,3	0,187
	Alta expressão	47	67,0	
NOS 3	Baixa expressão	52	76,2	0,198
	Alta expressão	42	69,3	
MMP 2	Baixa expressão	51	77,0	0,988
	Alta expressão	43	60,9	
MMP 9	Baixa expressão	52	76,9	0,859
	Alta expressão	42	68,5	
Caderina	Negativo	45	69,2	0,269
	Perda parcial	28	70,9	
	Positivo	21	92,9	
	Negativo /Perda parcial	73	69,7	0,105
	Positivo	21	92,9	
DMV (CD31)	Baixa expressão	43	57,1	0,059
	Alta expressão	51	86,3	
DVL (D240)	Baixa expressão	48	63,7	0,120
	Alta expressão	46	83,8	

(#) As categorias do VEGF, NOS 1, NOS 2, MMP 2, MMP 9, DMV (CD-31) e DMV-L (D240) foram definidas a partir do valor mediano de cada marcador na população do estudo.

(\*) Os pacientes com metástase à distância na admissão ou com margens cirúrgicas macroscópicas comprometidas foram excluídos da análise.

O estadiamento clínico foi um fator significativo nas taxas de SLD aos 5 anos.

Pacientes com estádios II e III tiveram piores índices em comparação aos pacientes de estágio I (Tabela 38).

**Tabela 38** - Probabilidade de sobrevida livre de doença aos 5 anos segundo o estadiamento (94 pacientes com CCR sem metástases ou margens positivas- Hospital A. C. Camargo, 1980 a 2005).

Variável	Categoria	N (*)	Slid (% 5 anos)	P
Estadiamento	I	54	85,9	< 0,001
	II	13	75,0	
	III	25	46,6	
	IV (#)	2	100,0	
	Estádio inicial (I e II)	67	84,4	< 0,001
	Estádio avançado (III e IV) (#)	27	51,2	

(\*) Os pacientes com metástase à distância na admissão ou com margens cirúrgicas macroscópicas comprometidas foram excluídos da análise.

(#) Estádio IV por doença loco-regional avançada, mas não por metástase à distância

#### 4.3.2 Análise Multivariada

Na análise multivariada pelo modelo de Cox, apenas o estadiamento clínico permaneceu como fator prognóstico independente para a sobrevida livre de doença. A probabilidade de recorrência de doença foi 9,5 vezes maior para pacientes do estágio III, conforme demonstrado na Tabela 39.

**Tabela 39** - Fatores de risco independentes para recorrência identificados pelo modelo de riscos proporcionais de Cox (94 pacientes com CCR sem metástases ou margens positivas- Hospital A. C. Camargo, 1980 a 2005). (\*)

Variável	Categoria	Hr	Ic 95% (hr)	P
Estadiamento	Estádio I	1,0	Referência	
	Estádio II	3,5	0,7 – 17,6	0,122
	Estádio III	9,5	2,7 – 33,7	< 0,001
	Estádio IV (#)	NA	NA	NA

HR: Hazard ratio

IC95%: Intervalo de confiança de 95%

(\*) Os pacientes com metástase à distância na admissão ou com margens cirúrgicas macroscópicas comprometidas foram excluídos da análise.

(#) Estádio IV por doença loco-regional avançada, mas não por metástase à distância.

(NA) Não avaliável em virtude do reduzido número de casos (2).

## 5 DISCUSSÃO

- **O Modelo Multivariado Hierárquico (MMH), o escore simplificado do MMH e as análises de sobrevida**

A associação de múltiplos fatores prognósticos através de nomogramas ou de escores prognósticos é uma tendência no estudo das neoplasias urológicas, uma vez permitem maior acurácia em comparação ao emprego isolado de um único fator (KATTAN et al. 2001; PANTUCK et al. 2001; FRANK et al. 2002; ZISMAN et al. 2002a, b)

Nos sistemas mais empregados em CCR atualmente, os fatores prognósticos mais significativos para morte ou recidiva continuam sendo elementos clinico-patológicos habituais como o estágio, o grau, a sintomatologia e as classificações de performance-status (MOTZER et al. 1999; TSUI et al. 2000; KATTAN et al. 2001; PANTUCK et al. 2001; ZISMAN et al. 2002a, b; FRANK et al. 2002; HAN et al. 2003; PATARD et al. 2004a, b; SORBELLINI et al. 2005; SHUCH et al. 2006).

No mesmo sentido de associar fatores para aumentar o poder prognóstico, recentemente um grupo nacional detectou uma tríade de fácil acesso ao clínico, composta por tamanho tumoral (> 7,0 cm), associada à invasão venosa microscópica e alto grau como os fatores de maior risco para morte por CCR. Quando ausentes os três fatores, as chances e sobrevida foram significativamente melhores, quando presentes, a sobrevida

câncer específica foi de 32% e a sobrevida livre de doença foi de 13% (DALL'OGGIO et al. 2007b).

Inúmeros fatores de biologia molecular têm sido alvo de estudo como prognóstico (LAM et al. 2005; SHUCH et al. 2006). Muitas vezes, apresentam impacto nas análises univariadas para recorrência ou morte por CCR, ou mesmo apresentam correlação com variáveis clínicas e anatomopatológicas. Porém raramente, após análises multivariadas, permanecem como fatores independentes para predição de desfechos clínicos de interesse.

Neste estudo, os fatores que tiveram impacto na análise univariada para SG foram os mesmos registrados em vários estudos como Classificações de ECOG e KPS (TSUI et al. 2000; MOTZER et al. 1999; KATTAN et al. 2001; PANTUCK et al. 2001; ZISMAN et al. 2002a, b) presença de sintomas (ZISMAN et al. 2002b; PATARD et al. 2004b, KARAKIEWICZ et al. 2007), anemia e transfusão, grau histológico, invasão venosa microscópica (MIRSTICKISCH et al. 1992, 2002; van POPPEL et al. 1997; KINOCHI et al. 1999; SEVINÇ et al. 2000; ZEQUI 2000, GRIFFITHS et al. 2002; LANG et al. 2002; GONÇALVES et al. 2004; DALL'OGGIO et al. 2007a, b), densidade de microvasos (YOSHINO et al. 1995; KHOELER et al. 1996; YOSHINO et al. 1998; DEKEL et al. 2000; PARADIS et al. 2000; SLATON et al. 2001; SUZUKI et al. 2001; IMAO et al. 2004; MERTZ et al. 2007; KAVANTZAS et al. 2007; RAICA et al. 2007; YILDIZ et al. 2007), necrose tumoral (FRANK et al. 2002), invasão linfática microscópica, metástases linfonodais, tamanho tumoral, invasão venosa macroscópica,

invasão de vias excretoras e de gordura perirrenal, estadiamento e falha terapêutica (THRASHER e PAULSON 1993; TSUI et al. 2000; KATTAN et al. 2001; SHUCH et al. 2006), e alguns fatores inéditos como a Classificação de ASA (ZEQUI et al. 2007a, b) e NOS-3.

Na análise univariada para SLD, encontramos como fatores significativos os mesmo fatores previamente descritos na literatura: Anemia, transfusão, invasão capilar e linfática microscópicas, tamanho tumoral, invasão de veia renal e da gordura perirrenal e estadiamento (THRASHER e PAULSON 1993; TSUI et al. 2000; KATTAN et al. 2001; FRANK et al. 2002; SHUCH et al. 2006; CAMPBELL et al. 2007).

O grau histológico, o acometimento linfonodal e a invasão de vias excretoras que são fatores habitualmente associados à recorrência, não foram significativos neste estudo para SLD, mesmo na univariada. Uma explicação talvez seja o fato de que nesta análise de SLD (N=94 casos) havia apenas 6 pacientes com linfonodos acometidos e 4 pacientes com invasão das vias excretoras.

Nas últimas décadas, o número de pacientes com linfonodos positivos à nefrectomia tem se reduzido, chegando a 3,3% num estudo randomizado controlado da EORTC (BLOM et al. 1999). Embora o sistema TNM preconize como oito o número de linfonodos para um adequado estadiamento patológico (SOBIN e WITTEKIND 2002), não há consenso na literatura se a realização da linfadenectomia possa trazer benefício, principalmente para pacientes com doença localizada (PHILIPS e TANEJA 2004).

Pesam contra sua realização a complexidade e morbidade desta dissecação e também dúvidas sobre a correta extensão e os limites anatômicos desta linfadenectomia. Estudos da Universidade da Califórnia Los Angeles com 1087 casos demonstraram que a linfadenectomia não beneficiou pacientes com CCR localizado. Apenas pacientes com metástases submetidos à nefrectomia citorrredutiva e em seguida à imunoterapia tiveram benefício com a linfadenectomia (PANTUCK et al. 2003).

Outros fatores que colaboram para a redução da realização de linfadenectomias são o diagnóstico de lesões cada vez mais precoces ou incidentais, com mínimo risco de metástases linfonodais e as crescentes indicações de nefrectomias parciais, cirurgias nas quais, por princípio a linfadenectomia não é realizada

Em nossa série, o acometimento linfonodal só teve impacto na análise univariada para SG e não para as análises de SLD. Tampouco a realização de linfadenectomia versus a sua não realização, ou a realização de linfadenectomia considerada “adequada” (mais que 8 linfonodos) versus “inadequada” (menos que 8 linfonodos) influenciaram as probabilidades de SG e SLD.

Dentre as possíveis explicações, verificamos que em 50 pacientes de nossa série, a linfadenectomia não foi realizada. E dentre os casos em que foi realizada, em apenas 26 casos esta foi considerada “adequada”. Estes números limitados reduzem o poder estatístico da linfadenectomia, principalmente na análise de SLD, aonde apenas 06 pacientes com

linfonodos positivos foram avaliados. Na análise de SG permaneceram 12 pacientes com linfonodos metastáticos, porém em muitos deles, havia concomitantemente a presença de múltiplos outros fatores de mau prognóstico como alto grau, invasão de estruturas adjacentes, presença de metástases entre outros, o que pode ter reduzido o poder estatístico do acometimento linfonodal como variável isolada.

Estes números reforçam a idéia de que neste novo milênio, frente aos poucos números de linfadenectomias realizadas e de linfonodos metastáticos, poucas instituições isoladas terão casuística suficiente para analisar o impacto das metástases linfonodais. Estudos multicêntricos serão fundamentais para elucidar a importância das metástases linfonodais, bem como o impacto, a necessidade e a extensão das linfadenectomias no CCR.

Os resultados da análise multivariada desta série realizada através de nosso Modelo Multivariado Hierárquico (MMH) para a SG corroboram o que temos encontrado na literatura nas últimas quatro décadas. Permaneceram o estágio e grau anatomopatológico como os fatores prognósticos mais significantes ao lado de fatores clínicos, como a Classificação de Karnofsky e a ocorrência de falha de doença (progressão ou recidiva), como determinantes de morte.

A elaboração de nosso escore e do MMH, para prognose de sobrevida global, resultou num instrumento de fácil determinação e que não aumenta os custos para sua obtenção. Pois todas as variáveis integrantes deste escore já são obtidas da abordagem clínica rotineira destes pacientes.

Nosso MMH foi confeccionado a partir dos princípios de VICTORA et al. (1996) que propôs um modelo hierárquico para a ocorrência de doenças infecciosas e como consequência, por exemplo, o óbito por diarreia numa população infantil de um país em desenvolvimento (Brasil).

Em sua proposição, fatores sócio-econômicos e ambientais (determinantes distais) foram considerados de fundamental importância para o desfecho de interesse, que era a morte por diarreia nessas crianças, em comparação a outros fatores de maior proximidade causal do evento de interesse, como as más condições de higiene e a desnutrição (determinantes proximais). Deste modo, autor e seus colaboradores propuseram uma escala hierárquica, aonde as condições distais deveriam ter um peso maior do que fatores diretamente ligados ao paciente, aos patógenos, ao seu quadro clínico ou à sua moléstia. Na verdade, as situações sócio econômicas desfavoráveis, seriam determinantes de um meio ambiente altamente propício para a ocorrência da diarreia e de toda a situação associada inclusive com os determinantes proximais como as más condições de higiene e nutricionais (VICTORA et al. 1996).

Ainda assim, além dessa ordem hierárquica, os eventos poderiam influenciar paralelamente ou diretamente o desfecho, sem a necessidade absoluta das influencias distais ou proximais, numa rígida ordem (VICTORA et al. 1996).

Como câncer e sua evolução clínica resultam de efeitos genéticos e epigenéticos concomitantes, extrapolamos o modelo para este grupo de pacientes com CCR (Figura 5 - casuística e métodos). Nestes MMH

proposto, as variáveis demográficas e ambientais seriam os determinantes primordiais (distais no modelo de Victora), que afetariam as variáveis biomoleculares, que por sua vez influenciariam variáveis anatomopatológicas micro e por conseguinte, macroscópicas e em seguida, o estadiamento, o tratamento e as complicações, a recidiva e o óbito.

Neste primeiro bloco das variáveis demográficas e ambientais, ficaram os fatores envolvidos na gênese da doença, como o envelhecimento, os fatores riscos para CCR (história familiar, índice de massa corpórea elevado, síndromes de CCR familiar e síndromes que aumentam o risco para CCR, mutações adquiridas, hipertensão arterial, uso ou não de medicamentos como diuréticos, tabagismo, e fatores ambientais ainda desconhecidos entre outros entre outros).

Em seguida, inserimos as variáveis biomoleculares que compõem o genótipo de cada caso. De acordo com as alterações nestes fatores biomoleculares, resultariam os fenótipos de cada neoplasia e daí sua agressividade biológica e seu comportamento clínico, avaliados nos blocos a seguir (variáveis patológicas macro e microscópicas, variáveis de estadiamento, variáveis clínicas, variáveis de tratamento e complicações, recorrência ou progressão e o óbito) (Figura 5).

Trata-se de um modelo teórico proposto e testado inicialmente nesta população e, portanto, imperfeito por princípio. Um dos problemas que visualizamos com seu emprego é este papel relevante atribuído às variáveis biomoleculares neste nosso Modelo Multivariado Hierárquico

Devemos ressaltar que a avaliação de marcadores biomoleculares através de imunistoquímica não é exata e nem sempre reproduzível, pois a IIQ sofre influências de múltiplos fatores, a saber:

- **Viés de Seleção de Marcadores:** As variáveis biomoleculares são escolhidas de modo arbitrário após pesquisa embasada em bibliografia, de acordo com resultados de outros grupos, nem sempre de valor confirmado pela comunidade científica ou validados em outras instituições. Além disso, o próprio objetivo de se testar fatores biomoleculares inéditos, ainda não testados em CCR, não assegura que estes fatores tenham papel relevante no comportamento da doença.
- Apesar do esmero e precisão técnica empregadas neste estudo, a metodologia imunistoquímica pode apresentar vários potenciais pontos de falha Conforme descrito por THOR e EDGERTON (1995): perda de antigenicidade tecidual e viabilidade tissular devido ao tempo de arquivamento do material, tipo de conservação do material, artefatos durante os processos de desparafinização, recuperação de antígenos, além de reações ineficientes de anticorpos primários e secundários, fixação inadequada de corantes, variações entre kits e clones de anticorpos, diluições, solventes, quantidades de adesivos, enxágües, Ph e temperaturas da amostra, além de expressões de marcadores em sítios celulares menos comuns (por exemplo, marcadores de membrana expressos no citoplasma ou núcleo e vice versa) entre outros.

- Calibração e variabilidade da escala de cores do programa de leitura digital.
- Durante a leitura: Celularidade, motivação, experiência e subjetividade do leitor das lâminas e as seleções dos métodos de contagem (quantitativo ou qualitativo) e dos métodos de escolha dos campos (randômicos ou selecionados) podem influenciar.
- Controvérsias relacionadas aos cut-offs empregados para cada marcador. Os cut-offs são determinados arbitrariamente, não existindo valores consensuais entre os diversos grupos.
- Nesta série, empregamos materiais de alta qualidade e precisão técnica e maioria destes potenciais problemas foram evitados ou minimizados:
- Os cut-offs foram arbitrariamente empregados a partir dos valores medianos das expressões dos marcadores, tentando com isso dois grupos equilibrados entre alta e baixa expressão
- Pelo emprego do TMA, houve maior homogeneidade das técnicas de IIQ para todos os casos, pois neste método, todas as amostras estão numa única lâmina e, portanto, sujeitas às mesmas situações de preparo, e aos mesmos kits, ao contrário do que ocorre com secções teciduais habituais.
- Quanto à motivação ou experiência de quem lê, acreditamos estarmos menos sujeitos a critérios subjetivos devido ao emprego de programa de leitura digital dos marcadores (ACIS III). Além disso, a celularidade das amostras foi adequada pela seleção prévia das

áreas a serem lidas e a seleção não foi randômica, mas através de escolha individualizada. Ainda assim foi necessário o examinador e sua subjetividade, para e demarcar as áreas de maior expressão dos marcadores para que o programa procedesse a leitura. Na tentativa de reduzir o erro, tivemos apoio de patologistas experimentados.

- Por fim não encontramos expressão dos marcadores teciduais em sítios celulares incomuns neste grupo.

Deste modo, acreditamos que a expressão imunohistoquímica dos marcadores foi representada adequadamente, exceto por não podermos influenciar o tempo e o modo de armazenamento do material em arquivos parafinados.

Pelo tamanho limitado da casuística e pelos múltiplos fatores estudados, procedemos o agrupamento das variáveis com múltiplas graduações sempre em dois grupos, por exemplo: alto grau (I e II) versus baixo grau (III e IV); KPS 90-100 versus  $KPS \leq 80$  e estádios localizados (I e II) versus estádios avançados (III e IV). Isto aumentou a acurácia das variáveis e permitiu maior facilidade para transposição deste MMH na prática diária.

O resultado final de nosso escore do MMH nos forneceu uma distribuição dos pacientes em 4 grupos de acordo com a pontuação obtida (0;1-2;3-4;5-7). Com isto, passamos a ter um instrumento para categorizar em três níveis os pacientes quanto ao prognóstico frente ao CCR e para informá-los adequadamente sobre seu prognóstico, para estabelecer a

necessidade de tratamentos adjuvantes (quando disponíveis, no futuro) e também para planejar distintas formas de seguimentos clínicos:

- *Pacientes de bom prognóstico:* Num extremo, teríamos pacientes com zero pontos no escore, para os quais a possibilidade de SG em 5 anos foi de 100%, o que os isentaria de adjuvância e permitiria um seguimento pós operatório com menos visitas, menos exames de imagem e a intervalos de tempo maiores.
- *Pacientes de prognóstico intermediário:* Num patamar intermediário, colocaríamos os pacientes com 1 a 2 pontos no escore (probabilidade de SG em 5 anos de 83,3%). Situação na qual, deveríamos manter um seguimento clínico mais intenso do que para os pacientes com zero pontos, além de discutir de modo individualizado os riscos e benefícios de futuras terapêuticas adjuvantes.
- *Pacientes de mau prognóstico:* Num outro extremo, teríamos os pacientes de escores 3-4 e 5-7 (probabilidade de SG em 5 anos respectivamente de 53,3% e de 13,5%). Neste grupo, obviamente os pacientes com falha seriam encaminhados para tratamento. Porém os pacientes com 3 ou 4 pontos mas sem falhas (pontuação atingida apenas pelo estadiamento, KPS e grau) seriam candidatos ideais para protocolos de pesquisa com terapêuticas adjuvantes e para um seguimento clínico muito mais rigoroso, com mais visitas clínicas, mais exames subsidiários e em menores intervalos de tempo. Atualmente, mesmo não dispondo de adjuvância, este seguimento mais intenso permitiria a detecção precoce das recorrências.

Ressaltamos que nas duas primeiras situações (zero e 1 a 2 pontos no escore) não houve pacientes com falha terapêutica.

Os resultados do escore acima foram úteis, mas a variável falha (recidiva ou progressão) foi uma das variáveis mais significativas neste modelo, com risco relativo bastante alto para o óbito. Contudo, ocorrência de falha terapêutica após a nefrectomia, por si só é uma situação de péssimo prognóstico e de altíssimo risco de morte pelo CCR, na qual praticamente não se faz necessário o emprego de um escore.

Como um de nossos objetivos era identificar pacientes de alto risco para progressão ou morte por CCR logo após a nefrectomia, antes de detectada a falha clínica, excluímos a variável falha do MMH. Com isso obtivemos um escore do MMH mais simples, que denominamos de MMH Simplificado. Neste escore modificado permaneceram as variáveis, KPS, estágio e grau.

Neste escore simplificado do MMH, também separamos os pacientes em grupos, de acordo com as pontuações obtidas: 0-1, 2-3, 3-4 pontos. Essa divisão proporcionou de modo bastante claro, três grupos com probabilidades de sobrevida bastante diferentes. Respectivamente, a possibilidade de SG em 5 anos destes grupos foi de 95,5%, 73,1% e 29,3%.

De acordo e com as pontuações acima, dividimos com base neste Modelo Multivariado Hierárquico Simplificado novamente os pacientes em grupos *Bom prognóstico (0 pontos)*, *Prognóstico intermediário (1-2 pontos)* e *Mau prognóstico (3-4 pontos)*, de acordo com o risco para o óbito por CCR.

A estratégia para estes três grupos seria a mesma proposta para os três grupos do escore não simplificado, nos mesmos moldes descritos acima.

Com esse modelo simplificado do escore do MMH, obtivemos um escore com poder preditivo similar ao escore completo e que deverá ser testado futuramente de modo prospectivo, imediatamente após a nefrectomia, de acordo com os dados do exame anatomopatológico e de estadiamento.

Por terem se mostrado úteis para tomada de decisão clínica em nossa instituição, seria interessante validar estes escores do MMH e MMH Simplificado em populações de outras instituições.

Quando avaliamos a origem das variáveis integrantes do escore do MMH e do MMH simplificado, verificamos que as avaliações clínicas e patológicas habituais do paciente permaneceram fundamentais para se estabelecer o prognóstico. O estadiamento resulta da análise integrada de informações clínicas e patológicas associadas aos dados de exame físico e de imagem. A classificação de P/S decorre de observação do impacto da moléstia no desempenho individual dos pacientes e o grau, é um dado prontamente obtido do exame anatomopatológico.

Esses achados vão de encontro aos demonstrados por HAN et al (2003) e PATARD et al. (2004a), que também demonstraram que o estágio, o grau e o performance status compõem uma tríade de fatores fundamentais para estabelecer o prognóstico de portadores CCR localizado ou metastático. Porém em ambos os estudos, o PS foi aferido pela classificação

de ECOG, (utilizaram o sistema UISS, preconizado pela UCLA) e não pelo KPS, como em nosso estudo.

Ainda assim, pudemos identificar em nosso estudo pacientes em três grupos de acordo com o prognóstico: prognóstico ruim, intermediário e bom, do mesmo modo que a validação promovida em 4202 pacientes em 8 centros acadêmicos (PATARD et al. 2004b) e dos grupos do Memorial Sloan Kettering para tumores localizados (EGGENER et al. 2007) e para tumores metastáticos com ou sem tratamento prévio (MOTZER et al. 1999; MOTZER et al. 2004).

Frente a isto, depreendemos que no momento atual, a invés de novos marcadores, o aperfeiçoamento das informações clínico patológicas já disponíveis, incrementa o poder prognóstico das mesmas e passa a ser decisivo na estratégia pós nefrectomia.

Vários sistemas integrando fatores clínicos e patológicos foram criadas e validados na Europa e nos Estados Unidos, associando classificações de performance status e incorporando de modo importante o valor da sintomatologia (MOTZER et al. 1999; TSUI et al. 2000; KATTAN et al. 2001; PANTUCK et al. 2001; FRANK et al. 2002; HAN et al. 2003; PATARD et al. 2004a; SHUCH et al. 2006). Pacientes com neoplasias sintomáticas tendem a pior evolução, com menores intervalos livres de doença e maior mortalidade específica (KATTAN et al. 2001; HAN et al. 2003, PATARD et al. 2004b; KARAKIEWICZ et al. 2007). Em nossa dissertação de mestrado, verificamos que pacientes sintomáticos têm tumores significativamente maiores que os assintomáticos (ZEQUI 2000).

No estudo atual, na análise univariada a probabilidade de SG dos pacientes assintomáticos foi superior (84,1%) à dos pacientes sintomáticos (60%,  $p=0,004$ ). A presença de sintomas decorre de lesões mais avançadas, ou representa fenômenos paraneoplásicos que em geral se associam a neoplasias de piores prognósticos, devido às ações sistêmicas de fatores de crescimento moleculares e substâncias deletérias.

Do mesmo modo, pacientes com piores níveis de P/S na Classificação de ECOG e KPS também tiveram menores taxas de SG na análise univariada. Isto vai de acordo com o que muitas outras séries já demonstraram (MOTZER et al. 1999; TSUI et al. 2000; KATTAN et al. 2001; PANTUCK et al. 2001; PATARD et al. 2004a, b; SHUCH et al. 2006). Obviamente pacientes com maior impacto pela doença de base tem menor chance de sucesso terapêutico, tanto em doença localizada, como na doença metastática.

Neste estudo, avaliamos uma série retrospectiva histórica, em que 60% dos pacientes apresentavam tumores sintomáticos, e 47,3% tinham tumores maiores que 5,0 cm, 38,1% eram de estádios III ou IV e 24,6% tinham  $KPS \leq 80$ , o que representa uma parcela significativa de casos avançados. Essa talvez seja uma das explicações para o fato de um escore baseado em estágio, grau e P/S ter se mostrado tão representativo nas análises multivariadas para SG.

Os baixos níveis de hemoglobina e a necessidade de transfusão tiveram impacto negativo na SG (univariada) e a necessidade de transfusão influenciou tanto as probabilidades de SLD como de SG (análises

univariadas para SG e SLD). De modo indireto, a anemia e a necessidade de transfusão são indicativos de doença mais avançada e logicamente, com piores prognósticos. Poucos autores demonstraram que a realização de transfusão teve impacto negativo na SG de pacientes com CCR. Numa análise retrospectiva de 1707 casos entre 1970 e 2002, MAGERA et al. (2008), demonstraram que a anemia e hipercalcemia pré-operatórias aumentam os riscos de mortes específicas em portadores de CCR localizados.

Um exemplo disso foi a análise de sobrevida livre de doença em que todos os pacientes com metástases ao diagnóstico ou com margens positivas macroscópica foram excluídos. Neste grupo tivemos menos pacientes com baixos níveis de KPS e com tumores de alto grau ou com estádios avançados. O resultado foi que na análise multivariada para a SLD, apenas o estágio permaneceu como fator independente para a recorrência, não sendo possível produzir um escore, à semelhança do que se realizou para SG.

Estes achados reforçam o poder do estágio como prognóstico para recorrência de CCR, uma vez que os pacientes de estágio III tiveram 9,5 vezes mais chances de progressão de doença e os pacientes de estágio II tiveram 3,5 mais chances de progressão quando comparados com pacientes de estágio I.

Como nas análises uni e multivariadas para SLD nenhuma das classificações de P/S ou mesmo a sintomatologia ou a classificação de ASA tiveram impacto, permanecemos no mesmo ponto de partida que motivou o

estudo: quando eliminados os pacientes com doença mais avançada à apresentação, para predizer de modo independente a progressão de doença, não dispusemos de nada além do que já dispúnhamos: o estágio clínico. Necessitamos, portanto de fatores preditivos além dos fornecidos pela clínica e pela anatomia patológica para ampliar o prognóstico para recidiva.

Deste modo, frente a neoplasias iniciais, mais homogêneas à apresentação do que nesta série, com predominância de pacientes assintomáticos, marcadores biomoleculares poderão ser fundamentais na diferenciação prognóstica, devendo ser investigados.

A presença de co-morbidades poucas vezes foi investigada como um fator prognóstico em CCR. Recentemente apresentamos em dois Congressos internacionais (ZEQUI et al. 2007a, b) uma análise de 145 pacientes com CCR de nosso hospital na qual a classificação de ASA teve impacto tanto nas análises uni e multivariadas para SG e para SLD. Além disso, a Classificação de ASA se correlacionou com o diagnóstico de tumores incidentais. Pacientes ASA 3 tiveram menos tumores incidentais ( $p < 0,05$ ) e tiveram 10 vezes mais metástases que os pacientes ASA 1 e duas vezes mais metástases que os ASA 2.

Neste estudo, embora a classificação de ASA tenha tido impacto na análise univariada para SG (os pacientes ASA 1, 2 e 3 tiveram respectivamente 94,1, 71,4 e 39% de probabilidade de SG em 5 anos;  $p = 0,004$ ), este fator não permaneceu como variável independente na multivariada e tampouco, influenciou a SLD em nenhuma das análises.

Novos estudos devem ser realizados neste sentido, pois o CCR é mais freqüente a partir das 6<sup>a.</sup> e 7<sup>a.</sup> décadas de vida, situação em que as comorbidades são usuais. Fato relevante se considerarmos o aumento progressivo da expectativa de vida da população mundial.

Embora o estado geral e as classificações de P/S sejam fundamentais como prognósticos em CCR (SHVARTS et al. 2004), verificamos em estudos populacionais recentes (LIPWORTH et al. 2006; WOLDRICH et al. 2008; STAFFORD et al. 2008) e mesmo em nosso hospital (ZEQUI 2000), um crescente diagnóstico de neoplasias de menores dimensões e conseqüentemente de menores estádios (migração de estádios). Isso tem implicações, pois neste ano um estudo revelou que tumores <4,0 cm, não se acompanham de sintomas em 98% das vezes ou de hematúria em 100% dos casos. O tamanho médio para que haja sinal ou sintomas do CCR é 8,9 ±3,2 cm (DAHLMAN et al. 2007).

Portanto, futuramente deverão existir menos casos de CCR com repercussão no estado geral dos pacientes. Isto poderá limitar o poder de um escore como utilizado neste estudo ou similares. Principalmente para portadores de carcinomas renais em estádios iniciais, aonde o estágio terá menor impacto, necessitaremos de fatores que elucidem e diferenciem comportamento biológico dos pacientes com CCR.

Neste sentido, a pesquisa com novos elementos de biologia molecular deve ser buscada e motivou nossos experimentos com a Caderina-E, VEGF, NOS-1, NOS-2, NOS-3, MMP-2, MMP-9 e a as análises de DMV, DVL

realizadas neste grupo. As interpretações de seus resultados são discutidas a seguir.

- **Variáveis biomoleculares**

As variáveis biomoleculares estudadas determinaram discreto impacto sobre a evolução clínica nesta casuística. Mantiveram algumas correlações com as diversas variáveis estudadas. Seus resultados serão discutidas a seguir.

- **Caderina E**

Neste estudo, a expressão da Caderina E não influenciou significativamente as com as taxas SG e SLD e não se correlacionou com as demais variáveis anatomopatológicas estudadas.

Pelo fato de não verificarmos impacto nas taxas de sobrevida ao analisarmos isoladamente os casos de expressão negativa, de perda parcial e de expressão positiva, passamos então a confrontar os casos de expressão positiva (que teoricamente mantinham íntegros os mecanismos de adesão celular) contra os casos de perda parcial de expressão e de expressão negativa agrupados. Mesmo assim que também não houve diferença entre as taxas de SG aos 5 anos (70,8% versus 69,2% respectivamente).

Já nas análises de SLD, quando comparamos do mesmo modo os casos positivos versus os demais agrupados, verificamos uma maior taxa de SLD em 5 anos (92,9%) para os pacientes com expressão positiva versus os

demais (69,7%), respectivamente, mas ainda sem significância estatística( $p=0,269$ ). Se esta tendência se confirmar, provavelmente com uma maior casuística a expressão da caderina E possa ter algum papel prognóstico quanto a SLD no CCR.

A expressão da Caderina E teve importância prognóstica em várias neoplasias sólidas (próstata, pulmão, esôfago, laringe e outras), porém poucos estudos confirmam um papel relevante das caderinas como fatores prognósticos em CCR (PAUL et al. 2004). Na literatura, a caderina E é expressa em até 30% dos casos de CCR (SHIMAZUI et al. 1996). Em nosso estudo, a expressão ocorreu em 51,9% (soma de casos positivos, 22,7%, com os de expressão parcial, 28,2%). Um dos fatores que podem colaborar para a baixa representatividade deste marcador é que a caderina E tem expressão preferencial nos túbulos distais (NOUWEN et al. 1993) e o CCR, principalmente, o CCR convencional de células claras tem origem nos túbulos proximais. Outro motivo para a expressão da Caderina E em apenas metade de nossos casos pode ser o longo tempo de armazenamento do material parafinado desta série histórica (1980 a 2005), que pode propiciar perda das características antigênicas teciduais e menor expressão dos marcadores às técnicas habituais de IHC.

Com respeito à expressão diferencial da Caderina E nos diversos tipos histológicos, alguns autores demonstraram maior expressão do marcador nas formas não células claras (JIN et al. 1995). Um dos motivos para isto é que estes tumores têm origem em porções mais distais do glomérulo do que o CCR de células claras. Recentemente foi descrita uma

nova caderina a Ksp-Cad (Kidney specific cadherin) uma caderina expressa preferencialmente nos túbulos renais distais e com alta expressão nos CCR cromófobos e nos oncocitomas, o que os diferencia dos CCR de células claras convencionais, exceto nos com citoplasma granular (KUEHN et al. 2007). Esse achado reforça a impressão que a família das caderinas tem baixa expressão em CCR convencionais.

Na nossa casuística, não encontramos diferença na expressão da Caderina E entre os CCR de células claras e os CCR não células claras. Dois fatores poderiam explicar essa ausência de diferença de expressão: A baixa expressão do marcador verificada na casuística como um todo, e o pequeno número de casos de CCR não células claras (17 casos). Porém na literatura, sempre os tipos não células claras correspondem a cerca de 15 a 20% dos casos de CCR.

Algumas revisões (LAM et al. 2005) propuseram a Caderina E como um fator prognóstico a ser estudado em CCR e recentes pesquisas demonstram correlação de mutações ou hipofunção do gene VHL, com a ocorrência de hipoexpressão da Caderina e (ESTEBAN et al. 2006; RUSSELL et al. 2007). Ainda in vitro, alguns estudos revelam que quando revertida a alteração do gene e restaurada a expressão da proteína VHL, os níveis de caderina E retornam ao normal (ESTEBAN et al. 2006).

Entretanto, nesta série, por não ter influenciado as taxas de SG e de SLD e por não ter demonstrado correlação com nenhuma das variáveis clínicas e patológicas, mesmo aquelas mais associadas a pior prognóstico, como estágio, grau e invasão de estruturas adjacentes, a Caderina E não

nos parece um marcador prognóstico promissor, não se recomendando continuidade de seu estudo no futuro, principalmente com material arquivado em parafina.

Outras pesquisas encontraram expressão aberrante da caderina no núcleo celular (GERVAIS et al. 2007). São dados isolados que aguardam confirmação e também não ocorreram nesta população.

- **O VEGF**

A expressão citoplasmática do VEGF neste grupo de pacientes não teve impacto sobre as taxas de sobrevida estudadas. As probabilidades de SG e SLD aos 5 anos dos pacientes com alta ou baixa expressão do marcador, foram praticamente superponíveis.

Encontramos correlação direta entre a alta expressão do VEGF e ocorrência de invasão linfática microscópica. Pacientes com alta expressão deste fator de crescimento tiveram o triplo de invasão linfática microscópica que os demais. Embora isso possa sugerir um maior risco de acometimento linfonodal não encontramos correlação do VEGF com a presença de linfonodos metastáticos. Deste modo o valor desse achado parece isolado. Talvez o VEGF embora diretamente ligado a angiogênese, possa não estar associado com a linfangiogênese. Numa casuística similar (107 casos), um estudo japonês demonstrou que a linfangiogênese tem papel pouco relevante na evolução clínica do CCR e não se associou a variáveis patológicas de importância e contrariamente ao nosso achado, também não se correlacionou com VEGF (IWATA et al. 2008).

O que reduz a importância dessa associação é sabida dificuldade da pesquisa de invasão linfática microscópica exames anatomopatológicos rotineiros.

Os pacientes com alta expressão de VEGF também tiveram mais neoplasias de alto grau e um maior contingente de graduações 1 e 2 da Classificação de ECOG. Esses dados revelam alguma associação do marcador com dois fatores usuais de mal prognóstico no CCR.

Embora não se tenha demonstrado um poder independente do VEGF como prognóstico para SG ou SLD. Quando hiperexpresso, deve ser interpretado como um dado auxiliar, tendo-se em mente maiores chances de associação com alguns fatores desfavoráveis como alto grau, piores índices de ECOG P/S e maior probabilidade de invasão linfática microscópica. No entanto, quando hipoexpresso não deve ser interpretado como sinal de bom prognóstico.

Existem vários estudos investigando a expressão sérica do VEGF ou de seu RNAm em CCR (JACOBSEN et al. 2000; LJUNBERG et al. 2003). Existem poucos estudos empregando apenas a imunistoquímica (JACOBSEN et al. 2004; JACOBSEN et al. 2006; BENSALAH et al. 2007).

Com técnicas de biologia molecular, alguns autores demonstraram menor expressão deste marcador em tumores papilíferos e cromóforos em relação aos CCR de células claras convencionais (LJUNBERG et al. 2003, 2006). Em outros estudos, a expressão do VEGF não diferiu de com os tipos histológicos, mas influenciou as taxas de sobrevida (PARADIS et al. 2000).

Nos últimos meses, dois estudos italianos avaliaram a importância prognóstica da expressão imunohistoquímica do VEGF. No estudo de MINARDI et al. (2008) a expressão do VEGF não teve valor prognóstico em 46 casos de CCR do tipo papilífero. Enquanto que no estudo de GONTERO et al. (2008), a alta expressão do VEGF foi o fator prognóstico independente mais importante para morte específica em pacientes com estádios avançados do CCR de células claras. Porém em sua série retrospectiva, foram incluídos apenas casos de nefrectomia radical, o que impede uma comparação com nosso grupo, que contém pacientes de vários tipos histológicos, de vários estádios e submetidos tanto a nefrectomias radicais como parciais.

Não verificamos diferença de expressão do VEGF frente aos diversos tipos histológicos. Do mesmo modo, em 2004, analisando 71 amostras de seções teciduais convencionais e 229 amostras procedentes de TMA, JACOBSEN et al. (2004), também não encontraram correlação entre a expressão imunohistoquímica do VEGF e os diferentes tipos histológicos e com as taxas de sobrevida em análises uni e multivariadas.

No estudo de BENSALAH et al. (2007) a expressão Imunohistoquímica do VEGF teve valor prognóstico em pacientes do com trombos venosos (estádio T3a/b), em nosso estudo, não encontramos correlação entre o VEGF e o estadiamento ou com a ocorrência de trombos de veia renal e de veia cava, o que impede de estabelecer esta correspondência.

São raros os estudos em que este marcador de forma isolada demonstra poder prognóstico independente. O mais comum é seu valor

demonstrado em situações particulares, como em estádios avançados ou em casos de trombos venosos. Nestas situações, muitas vezes há outros fatores de mau prognóstico associados, o que nos deixa a impressão que o VEGF não seja um marcador prognóstico ideal para o CCR.

- **As Sintases do Óxido Nítrico (NOS-1, NOS-2 e NOS-3)**

As sintases do óxido nítrico desempenham papéis antagônicos em diversas neoplasias sólidas. Com nossa casuística verificamos que enquanto a NOS-1 e a NOS-2 não influenciaram as taxas de SG e de SLD aos 5 anos, a NOS-3 foi o único marcador biomolecular neste estudo a influenciar as taxas de SG na análise univariada.

A NOS-3 é uma NOS constitucional endotelial, portanto presente em maior quantidade nos endoteliócitos. Como o CCR é moléstia altamente vascularizada, talvez seus níveis de expressão tenham tido estrita correlação com os processos de progressão tumoral baseados em neoangiogênese, ao contrário das demais NOS (NOS neuronal e NOS induzida)

A NOS-2, que é a NOS induzida em resposta a estímulos externos foi a NOS mais expressa dentre as estudadas, com média de 121,8 UDO, versus 19,45 UDO para a NOS-1 e 75,5 para a NOS-3. Nos mecanismos imunes de resposta ao CCR, há infiltração linfocitária e importante papel desempenhado pelas citocinas. Além disso, a imunoterapia é um tratamento estabelecido para doença avançada. Isto configura algumas relações entre

CCR e resposta imune, o que poderia justificar a maior produção de NOS-2 (macrofágica) em comparação a NOS-1 (neuronal) e NOS-3 (endotelial).

A expressão da NOS-1 se correlacionou diretamente com a invasão venosa microscópica (IVM) e com metástases linfonodais. Os pacientes com alta expressão de NOS-1 tiveram 5 vezes mais metástases linfonodais e o dobro de IVM que os pacientes com baixa expressão.

Do mesmo modo, pacientes com alta expressão de NOS-2 tiveram maiores índices de IVM. Os pacientes com alta expressão de NOS-2 foram os mais submetidos à nefrectomia radical, o que de modo indireto reflete associação com neoplasias mais agressivas.

Ainda assim, notou-se associação entre a alta expressão da NOS-2 com o sexo masculino. Essa associação, que pode ser fortuita, deve ser valorizada à medida que dois estudos epidemiológicos norte americanos confirmaram menor sobrevida e maior incidência do CCR nos pacientes masculinos quando comparados às mulheres (STAFFORD et al. 2008; WOLDRICH et al. 2008).

A expressão da NOS-3 esteve correlacionada diretamente com a probabilidade de sobrevida global aos 5 anos, sendo que pacientes com baixa expressão tiveram 79,% versus 58,1% para os pacientes com alta expressão. Também na análise de SLD, os pacientes com alta expressão deste marcador tiveram piores taxas de sobrevida, porém de modo não significativo ( $p=0,198$ ).

Esta NOS é uma NOS endotelial e provavelmente encontra-se hiperexpressa em piores casos pelo fato do CCR ser moléstia altamente

vascularizada. Curiosamente, ao invés de verificarmos correlação da NOS-3 com a ocorrência de IVM, como com a NOS-1 e a NOS-2, encontramos correlação com a ocorrência de invasão linfática microscópica (18% versus 5%,  $p=0,029$ ). Talvez essa associação com invasão linfática microscópica tenha sido determinante para que, e diferentemente que das outras NOS, a alta expressão de NOS-3 se correlacionasse com um elevado índice de metástases linfonodais (31% versus 9,7%,  $p=0,029$ ) e com invasão de pêlviz renal e ureter (16% versus 3,3%,  $p=0,0041$ ) em comparação aos pacientes com baixa expressão.

Corroborando a correlação entre NOS-3 e pior prognóstico, os pacientes com alta expressão desta NOS foram mais submetidos à nefrectomia radical (88% dos casos, versus 63,3%,  $p=0,003$ )

Um achado interessante foi que para as três NOS estudadas, encontramos correlação significativa com o tamanho tumoral. Os resultados foram bastante similares para as três sintases. Os pacientes com baixa expressão das NOS-1, NOS-2 e NOS-2, tiveram tumores pouco superiores a 6,0 cm (6,5 cm, 6,2 cm e 6,0 cm, respectivamente). Os pacientes com alta expressão das NOS tiveram neoplasias entre 8,0 e 9,0 cm. (8,2 cm, 8,6 cm e 9,0cm, respectivamente para NOS -1,NOS-2 eNOS03).

A maior diferença em termos de tamanho e com maior significância estatística foi com relação a NOS-3, com diferença de 3,0 cm entre pacientes com alta e baixa expressão (9,0 cm versus 6,0 cm,  $p<0,001$ ).

Como nesta série o cut-off de 7,0 cm influenciou as análises univariadas de SG ( $p=0,003$ ) e de SLD ( $p=0,011$ ) e as NOS -3 teve impacto

na SG em univariada, devemos nos atentar para esses achados. Todas as NOS estudadas e especialmente a NOS-3, foram capazes de dividir dois grupos com tamanhos acima e abaixo deste cut-off significativo.

Esta associação entre NOS e tamanho tumoral tem implicância principalmente no estadiamento dos tumores confinados ao órgão. Pois pacientes com baixa expressão, que têm em média tumores entre 6,0 e 6,5 corresponderão ao estágio T1 (T1b). Em contrapartida, os pacientes com alta expressão, cujo tamanho médio variou entre 8,0 e 9,0 cm, serão estadiados com T2. Essa diferença de estadiamento tem implicações com um pior prognóstico e a necessidade de um seguimento mais intenso nos estádios T2 em comparação ao T1.

Nossos resultados concordam com estudo BEDKE et al. (2008), no qual o tamanho de 7,0 cm foi o fator prognóstico de sobrevida específica mais significativo em u multivariada e acurado e para separar T1 de T2 ( $p=0,002$ ) em 398 casos de CCR localizados, submetidos a nefrectomia radical.

Embora essa correlação entre as NOS e tamanho tumoral tenha sido importante nesta série. Quando o tamanho tumoral é analisado isoladamente em comparação a vários outros estudos, esta separação entre tumores com cerca de 6,0 versus tumores com mais de 8,0 cm talvez não seja tão importante. Na maior parte da literatura, encontramos que os tamanhos tumorais que melhor separam os pacientes em grupos de diferentes prognósticos, oscilam entre 4,0 e 5,0 cm (KINOUCI et al. 1999; ZISMAN et al. 2001; FRANK et al. 2002) e que o cut-off que subdivide o estágio T1 é de 4,0 cm (SOBIN e WITTEKIND 2002), e não acima de 6,0cm.

Não encontramos na literatura estudos sobre o papel prognóstico ou mesmo a expressão das NOS em carcinoma de células renais e suas correlações com o tamanho dessa neoplasia. Portanto, os resultados deste estudo são inéditos. Pelos fatos da NOS-3 ter influenciado em análise univariada a SG e se correlacionado com o tamanho (e talvez influenciar estadiamento) e com alguns fatores usuais de mau prognóstico, e pelo fato das NOS-2 e NO-1 se associarem a invasão venosa microscópica, acreditamos que os papéis destas NOS no CCR devam ser mais bem investigados.

E, a partir daí, se correlações entre as NOS e o CCR forem confirmadas, estudos com drogas inibidoras específicas das NOS poderão ser desenhadas para CCR, como já se reportou em modelo animal de carcinoma colônico, tratado experimentalmente com uma droga inibidora das iNOS (ONO-1714), que promoveu redução da carcinogênese (KOHNO et al. 2007).

- **MMP-2 e MMP-9**

Em nossa casuística, houve uma coloração mais intensa da MMP-9 em comparação á MMP-2 (média de 94,3 UDO versus 69,06, respectivamente).

A MMP-2 e a MMP-9 nesta série não foram estatisticamente significativas quando testadas para SG e para SLD aos 5 anos. Embora as taxas de SLD para as MMP-2 e MMP-9 e a SG para a MMP-9 tenham sido

sempre superiores para os pacientes com baixa expressão das MMP, em nenhuma das vezes atingimos significância estatística.

Tanto para a MMP-2 quanto para a MMP-9, verificamos que hiperexpressão imunoistoquímica se correlacionou com a presença de neoplasias de alto grau. Essa associação entre alta expressão das MMP e alto grau de Fuhrman, já foi demonstrada anteriormente (KUGLER et al. 1998; KALLAKURY et al. 2001; ZHANG et al. 2004; KAWATA et al. 2007). Teoricamente, uma maior expressão dessa família de proteases estaria associada a um maior poder de digestão de membranas celulares e à disseminação metastática.

Nesse sentido, outros estudos revelaram algum poder prognóstico para as MMP e uma relação positiva com seus inibidores tissulares (TIMPS), principalmente em neoplasias de estádios avançados (KUGLER et al. 1998, TAKAHASHI et al. 2002). Os piores prognósticos, em análises univariadas e multivariadas, são verificados quando a expressão tissular das MMP é elevada e quando suas TIMPS estão reduzidas (TAKAHASHI et al. 2002; CHO et al. 2003).

Não encontramos correlação entre nenhuma das duas MMP estudadas (MMP-2 e MMP-9) e sintomatologia neste grupo de pacientes, ressaltando-se o grande percentual de pacientes sintomáticos ao diagnóstico neste grupo. Esse achado está em desacordo com estudos japoneses que demonstraram que a hiperexpressão das MMP em neoplasias confinadas ao órgão incrementa o risco para sintomatologia sistêmica em quase 3000% (HARADA et al. 2006; KAWATA et al. 2006).

Embora a alta expressão das MMP 2 e 9 se associou a tumores de alto grau, e, portanto de pior prognóstico, no tocante aos tipos histológicos, o comportamento deste grupo foi oposto: Pacientes com hiperexpressão da MMP-2 e da MMP-9, tiveram menos CCR de células claras, que geralmente são os tumores renais mais agressivos, em comparação aos demais tipos não células claras.

Essa associação negativa entre hiperexpressão de MMP e CCR de células claras foi demonstrada por praticamente todos os estudos pesquisados. CHO et al. (2003) encontraram maior expressão das MMP nos tipos papilíferos e cromófobos. KALLAKURY et al. (2001) demonstraram hiperexpressão para CCR papilíferos e de padrão sarcomatóide.

A correlação entre as altas expressões de MMP e os CCR de tipos não células claras não tem justificativa conhecida. Uma especulação para essa correlação com os CCR cromófobos é o fato destes tumores apresentarem fenótipos nucleolares que as vezes são interpretados falsamente como alto grau pelos patologistas, mesmo com comportamento clínico favorável. Mas não conhecemos uma justificativa dessa associação nos CCR papilíferos.

A expressão diferencial das MMP nos diferentes tipos histológicos pode ser considerada como auxiliar para esclarecer os tipos histológicos em situações aonde o tecido é exíguo e há dificuldade nas colorações habituais de hematoxilina e eosina, como nas biópsias de agulha fina.

Notamos uma correlação na qual os pacientes com alta expressão da MMP-2 foram menos submetidos a menos nefrectomias radicais (54,9%) do

que os pacientes com baixa expressão (91,5%). Talvez essa associação decorra do fato dos pacientes com alta expressão de MMP-2 terem tido menos CCR de células claras, que geralmente são mais agressivos.

Notou-se ainda uma correlação inversa entre expressão da MMP-2 e o tamanho tumoral. Os pacientes com baixa expressão tiveram tumores de 8,6 cm versus 6,0 cm para os pacientes com alta expressão ( $p=0,001$ ). Essa tendência a menores tumores entre os pacientes com maior expressão de MMP-2 pode ter contribuído para a menor realização de nefrectomias radicais neste grupo.

Paradoxalmente essa associação entre hiperexpressão de MMP-2 e menor tamanho e menos cirurgias radicais é literalmente oposta à associação da sua hiperexpressão da MMP-2 e alto grau, permanecendo uma controvérsia sobre seu valor prognóstico.

Em contrapartida, a expressão da MMP-9 não se correlacionou com tipo de nefrectomia ou com o tamanho tumoral.

Sendo assim podemos concluir que neste grupo, o papel da MMP-9 foi pouco importante nos pacientes com CCR o da MMP-2 permaneceu controverso.

- **Densidade de Microvasos (DMV)**

A DMV teve um impacto limítrofe na SG aos 5 anos. Sua influência foi inversa ao que empiricamente se espera: os pacientes com elevada DMV tiveram maior probabilidade de SG (79,9%) em comparação com os pacientes com baixa DMV (58%,  $p=0,0502$ ). A tendência ao mesmo

comportamento foi verificada na análise da SLD, quando os pacientes com DMV elevada tiveram maior probabilidade de SLD aos 5 anos versus os pacientes com baixa DMV, porém sem significância estatística ( $p=0,059$ ).

Também na análise de fatores clínicos e patológicos, a correlação da DMV com alguns fatores se manteve. Os pacientes com baixa DMV tiveram maior índice de neoplasias de estádios III e IV e de invasão da adrenal ipsilateral ( $p=0,050$  e  $p=0,0407$ , respectivamente). Similarmente, pacientes com baixa DMV tiveram maior porcentagem de KPS  $<90$ .

Ressaltamos que estes achados se revestem de importância prognóstica, pois revelam correlação da DMV com dois dos principais fatores prognósticos independentes identificados pelo nosso escore do Modelo Multivariado Hierárquico para SG, que foram os estágio e KPS. Essa correlação inversa ao inicialmente esperado vai de encontro ao achado da maioria das séries.

Como em nosso estudo, YLDIZ et al. (2007) também demonstraram correlação inversa da DMV com estágio tumoral. Além disso, em sua série, baixos níveis de DMV estavam correlacionados com tumores de maior tamanho e de alto grau. Não conseguimos encontrar correlações com outras variáveis, principalmente com a IVM e o grau, ou com tipo histológico, como encontrado por outros autores (MERTZ et al. 2007; RAICA et al. 2007).

Dentre todas variáveis biomoleculares estudadas neste estudo, a aferição da DMV pelo CD 31, foi o método que demonstrou, ao lado da NOS-3, o maior poder prognóstico.

Estudos iniciais sugeriam que taxas elevadas de DMV se correlacionavam com pior prognóstico em várias neoplasias sólidas (WEIDNER et al. 1991), e também no CCR, (NATIV et al. 1998; YOSHINO et al. 2000). Elevados níveis de DMV se correlacionaram com menor sobrevida (PARADIS et al. 2000) e com presença de IVM e risco aumentado para desenvolver metástases à distância (DEKEL et al. 2002). Nestes estudos a principal argumentação era que o CCR, por ser neoplasia extremamente vascularizada, teria pior prognóstico quando apresentasse maior número de microvasos. O grupo de YOSHINO et al. (1995, 1998, 2000) demonstrou que DMV elevada em tumores de pequeno tamanho se associavam com pior sobrevida.

Mas os resultados são controversos. Outros estudos não encontraram valor prognóstico, ou correlação da DMV com surgimento de metástases ou com outros fatores anatomopatológicos em CCR (MACLENNAN e BOSTWICK 1995; SLATON et al. 2001)

Em nossa série, pacientes com elevada taxa de DMV tiveram melhor prognóstico que pacientes com baixa DMV. Esses achados estão em sintonia com os estudos mais recentes, nos quais através de diversas técnicas de contagem da DMV, verificou-se sempre correlação da DMV com prognóstico (KHOELER et al. 1996; IMAO et al. 2004; MERTZ et al. 2007; YLDIZ et al. 2007). Várias justificativas são postuladas, como o fato de tumores mais indiferenciados, de grande volume ou de alto grau apresentarem menos semelhança com CCR convencional e terem um turnover celular maior e mais caótico, o que levaria a um desbalanço entre a

neovascularização e o suprimento sanguíneo e proliferação celular acentuada, evoluindo com necrose celular e hemorragia, que comprometeriam por sua vez, a adequada formação de neovasos, o que resultaria em baixa DMV. Outra justificativa seria que as neoplasias mais diferenciadas se assemelham ao tecido renal cortical normal, hipervascularizado e, portanto com maiores taxas de DMV. Talvez, a DMV elevada seja reflexo de um crescimento tumoral mais organizado e menos hipoxêmico.

Em nosso estudo, empregamos leitura digitalizada da DMV em programa de computador específico, com marcador CD 31, altamente seletivo para microvasos, os quais foram individualmente contados.

Na literatura encontramos variados métodos para o estudo da DMV: os marcadores mais utilizados são o CD 34 e o fator VIII, as contagens podem ser manuais e através programas computadorizados específicos. Os vasos podem ser contados individualmente ou através da área de microvasculatura (MVA) (MERTZ et al. 2007).

A homogeneização dos marcadores e das técnicas de leitura permitiria a comparação mais adequada entre os estudos, a despeito disto, registra-se crescentemente a tendência de correlação de inversa do número de microvasos e taxas de sobrevida, independente do marcador ou do método de leitura empregado.

O esclarecimento dessas correlações entre DMV prognóstico é importante, pois atualmente o tratamento mais utilizado para CCR metastático se dá com drogas inibidoras da angiogênese (terapia com alvos

moleculares). Avaliar a repostas de pacientes com DMV baixa e DMV elevada frente a esses fármacos poderá ser necessário.

- **DVL**

A densidade de vasos linfáticos aferida através do D2-40 não influenciou as probabilidades de SG e SLD aos 5 anos de acordo com a significância estatística estabelecida. Apesar disso, em ambas as situações, os pacientes com maiores taxas de DVL tiveram maiores taxas de sobrevida, com diferenças de mais de 10% em comparação aqueles com baixa DMVL. Respectivamente, para pacientes de alta e de baixa DMV, as probabilidades de SG foram 74,9% versus 63,2% e as probabilidades de SLD foram de 83,9% versus 63,7.%

Observando estes resultados notamos a tendência a correlação inversa ao que seria empiricamente esperado entre a DVL e estas taxas de sobrevida, do mesmo modo como no estudo da DMV.

Neste grupo de pacientes também não encontramos qualquer correlação entre este marcador e demais variáveis clínicas e patológicas estudadas. Quando avaliamos em particular a ocorrência de metástases linfonodais, que teoricamente poderia estar relacionada com a linfangiogênese, praticamente não verificamos nenhuma influência das taxas de DVL. Dos pacientes com linfonodos comprometidos houve 6 com alta e 6 com baixa DVL e dos 48 pacientes com linfonodos negativos, houve 23 com baixa DVL e 25 com alta DMVL, revelando um equilíbrio entre os portadores

de metástases linfonodais e os demais pacientes. Também não verificamos correlação entre a DMV e o VEGF.

Praticamente não existem estudos investigando o papel da DVL e a evolução clínica de pacientes com CCR. Apenas neste ano, no Japão um grupo analisou a densidade de linfáticos também utilizando o D2-40, numa casuística similar a nossa (107 casos), com resultados superponíveis aos nossos (IWATA et al. 2008).

Em nosso estudo, como empregamos o método de Tissue Microarray, avaliamos apenas a DVL intratumoral. O Grupo de IWATA et al. (2008), analisou a DVL tanto em áreas intratumorais como peritumorais. A DVL intratumoral foi positiva em apenas 6 casos. A positividade foi maior nas áreas peritumorais que nas áreas intratumorais, porém sem diferença estatística com a DVL dos tecidos renais normais. Tanto a DVL intratumoral quanto a DVL peritumoral não se correlacionaram com os fatores clinicopatológicos estudados ou com os níveis de VEGF ou com a IVM, do mesmo modo que verificamos em nosso estudo.

Aqueles autores concluem que a DVL tem pouca influência na progressão do CCR (IWATA et al. 2008), porém a avaliação de taxas de sobrevida não fez parte dos objetivos do grupo japonês, como fez no nosso estudo. Como em nossa série, também não verificamos correlação da DVL com as variáveis investigadas ou mesmo impacto nas análises de sobrevida é provável que DVL não seja um fator importante na evolução desta doença e devemos dar preferência ao estudo da DMV e de outros marcadores biomoleculares como fatores prognósticos em CCR.

Todavia, mantemos uma ressalva: como verificamos uma tendência de correlação inversa ao esperado da DVL e as taxas de sobrevida e uma tendência a diferenças expressivas entre as taxas de SG e SLD de pacientes com alta e baixa DVL, maiores casuísticas poderão, talvez, investigar melhor se existe alguma influência da DVL sobre a SG ou sobre a SLD em CCR.

## 6 CONCLUSÕES

- Os escore do Modelo Multivariado Hierárquico se mostrou um instrumento de fácil elaboração, sem aumento de custos e eficaz para estabelecer grupos de risco de morte pelo CCR durante o segmento de 5 anos neste grupo.
- O escore Simplificado do Modelo Multivariado Hierárquico se revelou um instrumento útil para predizer a sobrevida global e para estabelecer a estratégia de seguimento após a nefrectomia nesta série. Deve, portanto ser testado em outros grupos de pacientes.
- O estadiamento clínico foi fundamental para predizer as probabilidades de sobrevida livre de doença aos 5 anos para pacientes com CCR sem metástases a distância.
- Em comparação com as variáveis biomoleculares, as variáveis clínicas e patológicas usuais permanecem ainda como principais fatores prognósticos para portadores de CCR. Com destaque para o estadiamento, o grau histológico e classificação de performance status de Karnofsky.
- A Caderina E, o VEGF e a Densidade de vasos linfáticos, não demonstraram valor prognóstico ou correlações clínicas e patológicas nesta doença.

- Embora as metaloproteases tenham se correlacionado com alguns fatores de mau prognóstico em CCR, seu valor prognóstico, especialmente da MMP-2 permaneceu controverso neste estudo.
- O estudo da densidade de microvasos deve ser continuado e principalmente as pesquisas a respeito de sua correlação com fatores prognósticos favoráveis em CCR.
- Pelo valor prognóstico em SG e pela correlação com o tamanho tumoral e com demais variáveis clínicas e patológicas, pela possibilidade de influenciar o estadiamento e pelo ineditismo, os estudos com as Sintases do Óxido Nítrico, e em especial a NOS-3, devem ser estimulados e continuados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ACS] American Cancer Society. **Cancer Facts & Figures 2007**. Available from: <URL:<http://www.cancer.org/downloads/STT/caff2007PWSecured.pdf>> [2008 maio 12]

Argani P, Ladanyi M. Renal carcinomas associated with Xp11.2 translocations/TFE3 gene fusions. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. **Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs**. Lyon: IARC Press; 2004. p.37-8. (World Health Organization Classification of tumours, 6).

Bedke J, Pritsch M, Buse S, et al. Prognostic stratification of localized renal cell carcinoma by tumor size. **J Urol** 2008; 180:62-7.

Begnami MDFS, da Cunha IW, Montagnini A, Nonogaki S, Soares FA. Análise imuno-histoquímica das sintases do óxido nítrico em adenocarcinomas gástricos. **J Bras Patol Med Lab** 2004; 40:351-7.

Bensalah K, Rioux-Leclercq N, Vincendeau S, Guille F, Patard JJ. Is tumour expression of VEGF associated with venous invasion and survival in pT3 renal cell carcinoma? **Prog Urol** 2007; 17:189-93.

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

Blancher C, Moore Jr, Robertson N, Harris AL. Effects of ras and von-Hippel-Lindau (VHL) gene mutations on hypoxia-inducible factor (HIF)1-alpha, HIF 2-alpha, vascular endothelial growth factor expression and their regulation by

the phosphatidylinositol 3' kinase/Akt signaling pathway. **Cancer Res** 2001; 61:7249-55.

Blom JH, van Poppel H, Marechal JM, et al. Radical nephrectomy with and without lymph node dissection: preliminary results of the EORTC randomized phase III protocol 30881: EORTC Genitourinary Group. **Eur Urol** 1999; 36:570-5

Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. **Lab Invest** 2000; 80:1943-9.

Campbell SC, Novick AC, Bukowski RM. Renal Tumors. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editors. **Campbell-Walsh urology**. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.p.1557-637.

Carvalho SMT. **Estudo da expressão das sintases do óxido nítrico no câncer de mama e sua correlação com estágio clínico, grau histológico, receptores hormonais e proteína p 53**. São Paulo; 2002 [Tese de Mestrado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. **J Clin Invest** 2002; 109:987-91.

Cho HN, Shim HS, Rha SY, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase 9 correlates with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. **Eur Urol** 2003; 44: 560-6.

Choi WW, Lewis MM, Lawson D, et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. **Mod Pathol** 2005; 18:143-52

Chow WH, Devesa SS, Warren JL, Fraumeni JF Jr. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. **JAMA** 1999; 281:1628-31

Dahlman P, Brekkan E, Magnusson A. CT of the kidneys: what size are renal cell carcinomas when they cause symptoms or signs? **Scand J Urol Nephrol** 2007; 41:490-5.

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

Dall'Oglio MF, Ribeiro-Filho LA, Antunes AA. Microvascular tumor invasion, tumor size and Fuhrman grade: a pathological triad for prognostic evaluation of renal cell carcinoma. **J Urol** 2007b; 178:425-8.

Davidson B, Goldeberg I, Gotlieb WH, et al. The prognostic value of metalloproteinases and angiogenic factors in ovarian carcinoma. **Mol Cell Endocrinol** 2002; 187:39-45.

Davis CJ. Renal medullary carcinoma. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. **Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs**. Lyon: IARC Press; 2004. p.35-6. (World Health Organization Classification of tumours, 6).

Dekel Y, Koren R, Kugel V, Livne MP, Gal R. Significance of angiogenesis and microvascular invasion in renal cell carcinoma. **Pathol Oncol Res** 2002; 8:129-32.

Delahunt B, Eble JN. Papillary renal cell carcinoma. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. **Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs**. Lyon: IARC Press; 2004. p.27-9. (World Health Organization Classification of tumours, 6).

Djordjevic G, Mozetic V, Mozetic DV, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in clear renal cell carcinoma. **Pathol Res Prat** 2007; 203:99-106.

Duff SE, Jeziorska M, Kumar S, et al. Lymphatic vessel density, microvessel density and lymphangiogenic growth factor expression in colorectal cancer. **Colorectal Dis** 2007; 9:793-800.

Eble JN. Multilocular cystic renal cell carcinoma. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. **Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs**. Lyon: IARC Press; 2004. p.26. (World Health Organization Classification of tumours, 6).

Eble JN, Togashi K, Pisani P. Renal cell carcinoma. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. **Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs**. Lyon: IARC Press; 2004. p.12-4. (World Health Organization Classification of tumours, 6).

Egger SE, Yossepowith O, Petrus JA, Snyder ME, Motzer RJ, Russo P. Renal cell carcinoma recurrence after nephrectomy for localized disease: predicting survival from time of recurrence. **J Clin Oncol** 2006; 24:3101-6.

Esteban MA, Tran MG, Harten SK, et al. Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor. **Cancer Res** 2006; 66:3567-75

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

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

Gervais ML, Henry PC, Saravanan A, et al. Nuclear E-cadherin and VHL immunoreactivity are prognostic indicators of clear-cell renal cell carcinoma **Lab Invest** 2007; 87:1252-64.

Giltneane JM, Rimm DL. Technology insight: Identification of biomarkers with tissue microarray technology. **Nat Clin Pract Oncol** 2004; 1:104-11.

Goetzi MA, Desai M, Mansukhani M, et al. Natural history and clinical outcome of sporadic renal cortical tumors diagnosed in the young adult. **Urology** 2004; 63:41-5.

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

Gontero P, Ceratti G, Guglielmetti S, et al. Prognostic factors in a prospective series of papillary renal cell carcinoma. **BJU Int** 2008; 16. [Epub ahead of print] PMID: 18489525.

Griffiths DF, Verghese A, Golash A, Kynaston HG, Matthews PN, Hart AJ. Contribution of grade, vascular invasion and age to outcome in clinically localized renal cell carcinoma. **BJU Int** 2002; 90:26-31.

Grignon DJ, Eble JN, Bonsib SM, Moch H. Clear cell renal cell carcinoma. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. **Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs**. Lyon: IARC Press; 2004. p.23-6. (World Health Organization Classification of tumours, 6).

Gudbjartson T, Hardason S, Peturdottir V, Thoroddsen A, Magnusson J, Einarsson GV. Histological subtyping and nuclear grading of renal cell carcinoma and their implications for survival: a retrospective Nation-Wide Study of 629 patients. **Eur Urol** 2005; 15:2-8.

Hajra KM, Fearon ER. Cadherin and catenin alterations in human cancer. **Genes, Chromosomes Cancer** 2002; 34:255-68.

Han HR, Bleumer I, Pantuck AJ, et al. Validation of an integrated staging system toward improved prognostication of patients with localized renal cell carcinoma in an international population. **J Urol** 2003; 170:2221-4.

Hanahan D, Weinberg RB. The hallmarks of cancer. **Cell** 2004; 100:57-70.

Hara N, Bilim V, Kassahara T, et al. Inducible nitric oxide synthase in renal cell carcinoma: Expression in tumor thrombi and induction under hypoxic conditions. **Anticancer Res** 2003; 23:4641-50.

Harada K, Sakai I, Ishimura T, Inoue TA, Hara I, Miyake H. Clinical symptoms in localized renal cell carcinoma reflect its invasive potential: comparative study between incidentally detected and symptomatic diseases. **Urol Oncol** 2006; 24:201-6.

Herbst C, Kosmehl H, Stiller KJ, et al. Evaluation of microvessel density by computerised image analysis in human renal cell carcinoma: correlation to pT category, nuclear grade, proliferative activity and occurrence of metastasis. **J Cancer Res Clin Oncol** 1998; 124:141-7.

Hyung LK, Seligson D, Liu X, Janzen N, Bui M, et al. Using tumor markers to predict the survival of patients with metastatic renal cell carcinoma. **J Urol** 2005; 173:1496-501.

Imao T, Egawa M, Takashima H, Koshida K, Namiki M. Inverse correlation of microvessel density with metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. **Int J Urol** 2004; 11:948-53.

Iwata T, Miyata Y, Kanda S, et al. Lymphangiogenesis and angiogenesis in conventional renal cell carcinoma: association with vascular endothelial growth factors A to D immunohistochemistry. **Urology** 2008; 71:749-54.

Jacobsen J, Rasmuson T, Grankvist K, Ljungberg B. Vascular endothelial growing factor as prognostic factor in renal cell carcinoma. **J Urol** 2000; 163:343-7.

Jacobsen J, Grankvist K, Rasmuson A, Berg A, Landberg G, Ljungberg B. Expression of vascular endothelial growth factor protein in human renal cell carcinoma. **BJU Int** 2004; 93:297-302.

Jacobsen J, Grankvist K, Rasmuson T, Ljungberg B. Different isoforms patterns of vascular endothelial growth factor between clear cell and papillary renal cell carcinoma. **BJU Int** 2006; 97:1102-8.

Jansson OT, Morcos E, Brundin L, Bergerheim US, Adolfsson J, Wiklund NP. Nitric oxide synthase activity in human renal cell carcinoma. **J Urol** 1998; 160:556-60.

Jin TX, Kakehi Y, Moroi S, Yoshida O. E-cadherin expression and histopathological features in renal cell carcinomas [abstract] **Hinyokika Kiyo** 1995; 41:653-7.

Kallakury BVS, Karikehalli S, Haholu A, Sheehan CE, Azumi N, Ross JS. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2001; 7:3113-9.

Kamia N, Kishimoto T, Suzuki H, et al. Increased *in situ* gelatinolytic activity in renal cell tumor tissues correlates with tumor size, grade and vessel invasion. **Int J Cancer** 2003; 106:480-5.

Karakiewicz PI, Trinh QD, de la Taille A, et al. ECOG performance status 0 or 1 and symptom classification do not improve the ability to predict renal cell carcinoma-specific survival. **Eur J Cancer** 2007; 43:1023-9.

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

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

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

Kavantzias N, Paraskevaki H, Tseleni-Balafouta S, et al. Association between microvessel density and histologic grade in renal cell carcinoma. **Pathol Oncol Res** 2007; 13:145-8.

Kawata N, Nagane Y, Igarashi T, et al. Strong significant correlation between MMP-9 and systemic symptoms in patients with localized renal cell carcinoma. **Urology** 2006; 68:523-7.

Kawata N, Nagane Y, Hirakata H, et al. Significant relationship of matrix metalloproteinase 9 with nuclear grade and prognostic impact of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 for incidental clear cell renal cell carcinoma. **Urology** 2007; 69:1049-53.

Khoeler HH, Barth PJ, Siebel A, Gerhaz EW, Bittinger A. Quantitative assessment of vascular surface density in renal cell carcinomas. **Br J Urol** 1996; 77:650-4.

Kim HL, Beldegrun AS, Freitas DG, et al. Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis. **J Urol** 2000; 170:1742-6.

Kim HL, Zisman A, Han KR, Figlin RA, Beldegrun AS. Prognostic significance of venous thrombus in renal cell carcinoma: are renal vein and inferior vena cava involvement different? **J Urol** 2004a; 171:588-91.

Kim HL, Seligson D, Liu X, et al. Using protein expressions survival in clear cell renal carcinoma. **Clin Cancer Res** 2004b, 10:5464-71.

Kinouchi T, Saiki S, Meguro N, Maeda O, Kuroda M, Usami M. Impact of tumor size on the clinical outcomes of patients with Robson stage I renal cell carcinoma. **Cancer** 1999; 85:689-95.

Kohno H, Takahashi M, Yasui Y, et al. A specific inducible nitric oxide synthase inhibitor, ONO-1714 attenuates inflammation-related large bowel carcinogenesis in male Apc(Min/+) mice. **Int J Cancer** 2007; 121:506-13.

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

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

Kuehn A, Paner GP, Skinnider BF, et al. Expression analysis of kidney-specific cadherin in a wide spectrum of traditional and newly recognized renal epithelial neoplasms: diagnostic and histogenetic implications. **Am J Surg Pathol** 2007; 31:1528-33.

Kugler A, Hemmerlein B, Thelen P, Kallerhoff M, Radzun H G, Ringert RH. Expression of metalloproteinase 2 e 9 and their inhibitors in renal cell carcinoma. **J Urol** 1998; 160:1914-8.

Kurizaki T, Toi M, Tominaga T. Relationship between matrix metalloproteinase and tumor angiogenesis in human breast carcinoma. **Oncol Rep** 1998; 5:673-7.

Lam JS, Beldegrm AS, Figlin RA. Tissue array-based predictions of pathobiology, prognosis, and response to treatment for renal cell carcinoma therapy. **Clin Cancer Res** 2004; 15:6304-9.

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

Lane BR, Samplaski MK, Herts BR, Zhou M, Novick AC, Campbell SC. Renal mass biopsy--a renaissance? **J Urol** 2008; 179:20-7.

Lang H, Linder V, Saussine C, Havel D, Faure F, Jacqmin D. Microscopic venous invasion: a prognostic factor in renal cell carcinoma. **Eur Urol** 2000; 38:600-5.

Leppert J, Beldegrun AS. Integrating target molecular therapy for renal cell carcinoma. **AUA News** 2007; 12:15-6.

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

Linehan WM, Walther MM, Zbar B. The genetic basis of cancer of the kidney. **J Urol** 2003; 170:2163-72.

Lidgren A, Heldberg Y, Grankvist K, Rasmuson T, Vasko J, Ljunberg B. The expression of Hypoxia-inducible factor 1 alpha is a favorable independent prognostic factor in renal cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2005; 1192:1129-35.

Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K, Rasmuson T, Bergh A, Ljungberg B. Hypoxia -inducible factor 1alpha expression in renal cell carcinoma analyzed by tissue microarray. **Eur Urol** 2006; 50:1272-7.

Liou S, Shi T, Duan ZH, Sadhukhan P, et al. Microarray gene expression profiling and analysis in renal cell carcinoma. **BMC Urol** 2004; 4:9.

Ljunberg B, Jacobsen J, Häggstron-Rudolfsson S, Rasmuson T, Lindh G, Grankvist K. Tumour vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in relation to serum VEGF protein levels and tumour progression in human renal cell carcinoma. **Urol Res** 2003; 31:335-40.

Ljunberg B, Jacobsen J, Häggstron-Rudolfsson S, Lindh G, Grankvist K, Rasmuson T. Different vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-receptor1 and -2 mRNA expression profiles between clear cell and papillary renal cell carcinoma. **BJU Int** 2006; 98:661-7.

MacLennan GT, Bostwick DG. Microvessel density in renal cell carcinoma: lack of prognostic significance. **Urology** 1995; 46:27-30.

Madeira Campos RS. **Avaliação do valor da expressão imuno-histoquímica da pâncreas e metaloproteases da matriz extracelular tipo 2 e tipo 9 como fatores preditivos do risco de metástases linfonodais em pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis.** São Paulo; 2003. [Dissertação de Mestrado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Magera JS Jr, Leibovich BC, Lohse CM, et al. Association of abnormal preoperative laboratory values with survival after radical nephrectomy for clinically confined clear cell renal cell carcinoma. **Urology** 2008; 71:278-82.

Mathew A, Devesa SS, Fraumeni JF Jr, Chow WH. Global increases in kidney cancer incidence, 1973-1992. **Eur J Cancer Prev** 2002; 11:171-8.

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

Merino MJ, Eccles DM, Linehan WN, et al. Familial renal cell carcinoma. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. **Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs.** Lyon: IARC Press; 2004. p.15-22 (World Health Organization Classification of tumours, 6).

Merseburger AS, Anastasiadis AG, Hennenlotter J, et al. Tissue microarrays: applications in urological cancer research. **World J Urol** 2006; 24:579-84.

Mertz KD, Demichelis F, Kim R, et al. Automated immunofluorescence analysis defines microvessel area as prognostic parameter in clear cell carcinoma. **Human Pathol** 2007; 38:1454-62.

Minardi D, Lucarini G, Filosa A, et al. Prognostic role of tumor necrosis, microvessel density, vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor-1alpha in patients with clear cell renal carcinoma after radical nephrectomy in a long term follow-up. **Int J Immunopathol Pharmacol** 2008; 21:447-55.

Ministério da Saúde. **Estimativa 2008: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2007.

Mirstickisch CH, Salamon J, Weber R, Stogermayer F. Microscopic venous infiltration as predictor of relapse in renal cell carcinoma. **J Urol** 1992; 148:271-4.

Miyata Y, Kanda S, Ohba K, et al. Lymphangiogenesis and angiogenesis in bladder cancer: prognostic implications and regulation by vascular endothelial growth factors-A,-C, and-D. **Clin Cancer Res** 2006; 12:800-6.

Miyata Y, Iwata T, Maruta S, et al. Expression of Matrix Metalloproteinase - 10 in renal cell carcinoma and its prognostic role. **Eur Urol** 2007; 52:791-7.

Moinzadeh A, Libertino A. prognostic significance of thrombus level in patients with renal cell carcinoma and venous thrombus extension. Is all T3b the same? **J Urol** 2004; 171: 598-601.

Moch H, Schraml P, Bubendorf L, et al. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by CDNA microarray screening in renal cell carcinoma. **Am J Pathol** 1999; 154:981-6.

Mohr S, Leikauf G D, Ketih G, Rihn B H. Microarrays as cancers keys: na array of possibilities. **J Clin Oncol** 2002; 15:3165-75.

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

Motzer RJ, Bacik J, Schwartz LH, et al. Prognostic factor for survival in previously treated patients with metastatic renal cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2004; 22:454-63.

Muci NR, Akdas G, Manely S, et al. Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: Evaluation of high throughput tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression. **Hum Pathol** 2000; 31:406-14.

Nativ O, Sabo E, Reiss A, et al. Clinical significance of tumor angiogenesis in patients with localized renal cell carcinoma. **Urology** 1998; 51:693-6.

[NCCN] **The National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines in Oncology™**. Available from: <URL:[http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/PDF/kidney.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/kidney.pdf)>. [2008 maio 12].

Nocito A, Kononen J, Kalioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. **Int J Cancer** 2001; 94:1-5.

Nouwen EJ, Dauwe S, van der Biest I, De Broe ME. Segment-specific expression of cell-adhesion molecules N-CAM, A-CAM and L-CAM in the kidney. **Kidney Int** 1993; 44:147-51.

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.

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

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

Paradis V, Lagha B N, Zeimoura L, et al. Expression of vascular endothelial growing factor in renal cell carcinoma. **Virchows Arch** 2000; 436: 351-6.

Patard JJ, Kim HL, LAM JS, et al. Use of the University of California Los Angeles integrated staging system to predict survival in renal cell carcinoma: a international multicenter study. **J Clin Oncol** 2004a; 22:3316-22.

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

Patard JJ, Rioux–Leclercq N, Fergelot O. Understanding the importance of smart drugs in renal cell carcinoma. **Eur Urol** 2006; 49:633-43.

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

Phillips CK, Taneja SS. The role of lymphadenectomy in the surgical management of renal cell carcinoma. **Urol Oncol** 2004; 22:214-23.

Raica M, Cimpean AM, Anghel A. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) does not correlate with microvessel density in renal cell carcinoma. **Neoplasma** 2007; 54:278-84.

Renaudin K, Karam G, Buzelin F, Laboisie CL, Jarry A. Loss of NOS1 expression in high grade renal cell carcinoma associated with a shift of NO signaling. **Br J Cancer** 2004; 90:2364-9.

Rimm DL, Camp CB, Charette L, et al. Amplification of tissue by construction of tissue microarrays. **Exp Mol Pathol** 2001; 703:255-64

Ross JS, Schenkein DP, Pietrusko R, et al. Targeted therapies for cancer 2004. **Am J Clin Pathol** 2004; 122:598-609.

Russell RC, Ohh M. The role of VHL in the regulation of E-cadherin: a new connection in an old pathway. **Cell Cycle** 2007; 6:56-9.

Saklad M. Grading of patients for surgical procedures. **Anesthesiology** 1941; 2:281-4.

Sevinç M, Kirkali Z, Yörükoglu K. Prognostic significance of microvascular invasions in localized renal cell carcinoma. **Eur Urol** 2000; 38:728-33.

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

Shergill IS, Rao AR, Anjum FH, Arya M, Patel HR, Mundy AR. Tissue microarrays and their relevance to the urologist. **J Urol** 2006; 175:19-26.

Shimazui T, Girolodi LA, Bringuier PP, Oosterwijk E, Schalken JA. Complex cadherin expression in renal cell carcinoma. **Cancer Res** 1996; 56:3234-7.

Shuch BM, Lam JS, Belldegrun AS, Figlin RA. Prognostic factors in renal cell carcinoma. **Semin Oncol** 2006; 33:563-75.

Slaton JW, Inoue K, Perrottte P, et al. Expression levels of genes that regulate metastasis and angiogenesis correlate with advanced pathological stage of renal cell carcinoma. **Am J Pathol** 2001; 158:735-43.

Sobin L H, Wittekind CH. **TNM classification of malignant tumours**. 6<sup>th</sup> ed. New York: Wiley-Liss; 2002. Urological tumours-kidney; p.193-5.

Soini Y, Kahlos K, Puhakka A, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in healthy pleura and malignant mesothelioma. **Br J Cancer** 2000; 83:880-6.

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

Srigley JR, Moch H. Carcinoma of the collecting ducts of Bellini. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. **Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs**. Lyon: IARC Press; 2004. p.33-4. (World Health Organization Classification of tumours, 6).

Stafford HS, Saltzstein SL, Shimasaki S, Sanders C, Downs TM, Robins Sadler G. Racial/ethnic and gender disparities in renal cell carcinoma incidence and survival. **J Urol** 2008; 179:1704-8.

Störkel S, Martignoni G, van den Berg E. Chromophobe renal cell carcinoma. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. **Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs**. Lyon: IARC Press; 2004. p.30-2. (World Health Organization Classification of tumours, 6).

Sudarshan S, Linehan WM. Genetic basis of cancer of the kidney. **Semin Oncol** 2006; 33:544-51.

Suzuki K, Morita T, Hashimoto S, Tokue A. Thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) associated with prognosis in renal cell carcinoma. **Urol Res** 2001; 29:7-12.

Sweeney p, Wood GG, Pisters LL, et al. Surgical management of renal cell carcinoma associated with complex inferior vena caval thrombi. **Urol Oncol** 2003; 21:37-3.

Takahashi A, Sasaki H, Kim SJ, et al. Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growing factor and placenta growing factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis. **Cancer Res** 1994; 54: 4233-7.

Takahashi M, Oka N, Naroda T, et al. Prognostic significance of matrix metaloproteinases-2 activation ratio in renal cell carcinoma. **Int J Urol** 2002; 9:31-8.

Thor AD, Edgerton SM. Celular markers of proliferation and oncogenes. In: Colvin RB, Bhan AK, McCluskey RT, editors. **Diagnostic immunopathology**. 2<sup>nd</sup>. New York: Raven Press; 1995.p.669-84.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:442–54.

Thrasher JB, Paulson DF. Prognostic factors in renal cancer. **Urol Clin North Am** 1993; 20:247-62

Tsui KH, Shvarts O, Smith RB, et al: Prognostic indicators for renal cell carcinoma: a multivariate analysis of 643 patients using the revised 1997 TNM staging criteria. **J Urol** 2000; 163:1090-5.

Van Poppel HP, Van Den Driessche H, Boell K, et al. Microscopic vascular invasion of the most relevant prognostic at or after radical nephrectomy for clinically non-metastatic renal cell carcinoma. **J Urol** 1997; 158: 45-9.

Victora CG, Huttly SR, Fuchs SC, Olinto MT. The role of conceptual frameworks in epidemiological analysis: a hierarchical approach. **Int J Epidemiol** 1997; 26:224-7.

Wang S, Saboorian MH, Frenke EP, et al. Assessment of HER-2/neu status in breast cancer automated cellular imaging system (ACIS)-assisted quantitation of immunohistochemical assay Achieves high accuracy in comparison with fluorescence in situ hybridization assay as the standard. **Am J Clin Pathol** 2001; 116:495-503.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. **N Eng J Med** 1991; 324:1-8.

Wiesener MS, Münchenhagen PM, Berger I, et al. Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal carcinomas. **Cancer Res** 2001; 61:5215-22.

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

Yagasaki H, Kawata N, Takimoto Y, Nemoto N. Histopathological analysis of angiogenic factors in renal cell carcinoma. **Int J Urol** 2003; 10:220-7.

Yildiz ET, Gokce G, KirliKarslan H, Ayan S, Goze OF, Gultekin EY. Prognostic value of the expression of Ki-67, CD44 and vascular endothelial growth factor, and microvessel invasion, in renal cell carcinoma. **BJU Int** 2004; 93:1087-93.

Yldiz E, Ayan S, Goze F, et al. Relation of microvessel density with microvascular invasion, metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. **BJU Int** 2008; 101:758-64.

Yoshino S, Kato M, Okada K. prognostic significance of microvessel count in low stage renal cell carcinoma. **Int J Urol** 1995; 2: 156-60.

Yoshino S, Kato M, Okada K. Evaluation of the prognostic significance of microvessel count and tumor size in renal cell carcinoma. **Int J Urol** 1998; 5:119-123.

Yoshino S, Kato M, Okada K. Clinical significance of angiogenesis, proliferation and apoptosis in renal cell carcinoma. **Anticancer Res** 2000; 20:591-4.

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

Zequi SC, Guimarães GC, Fonseca FP, et al. Can the ASA-American Society of Anesthesiology physical status classification predict the oncological outcomes in renal cell carcinoma ?. [abstract]. **J Urol** 2007a; 177:302. [Presented at AUA 2007 Annual Meeting; 2007, Anaheim-CA].

Zequi SC, Guimarães GC, Fonseca FP, et al. Can the ASA-American Society of Anesthesiology physical status classification predict the oncological outcomes in renal cell carcinoma?. [abstract]. **Urology** 2007b; 70:259. [Presented at 29th Congress of the Société Internationale d'Urologie; 2007, Paris-França].

Zhang X, Yamashita M, Uetsuki H, Kakehi Y. Angiogenesis in renal cell carcinoma: Evaluation of microvessel density, vascular endothelial growing factor and matrix metalloproteinases. **Int J Urol** 2002; 509-14.

Zhang Y, Wu XH, Cao GH, Li S. Relationship between expression of matrix metalloproteinase-9 and angiogenesis in renal cell carcinoma [abstract]. **Chin J Cancer** 2004; 30:326-9.

Zisman A, Pantuck AJ, Chao D, et al. Reevaluation of the 1997 TNM classification for renal cell carcinoma: T1 and T2 cutoff point at 4.5 rather than 7 cm better correlates with clinical outcome. **J Urol** 2001;166:54-8.

Zisman MA, Pantuck AJ, Dorey F, et al. Mathematical model to predict individual survival for patients with renal cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2002a; 20:1368-74.

Zisman MA, Pantuck AJ, Wieder J, et al. Risk group assessment and clinical outcome algorithm to predict the natural history of patients with surgically resected renal cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2002b; 20:4559-66.

## **Anexo 1 - Karnofsky Performance Status Classification**

100 Normal, nenhuma queixa, nenhuma evidência de doença.

90 Capaz para continuar atividade normal; pequenos Sintomas ou sinais da doença.

80 Atividade normal com esforço; alguns sinais e sintomas.

70 Cuidados para si; incapaz para continuar suas atividades normais.

60 Requer ajuda ocasional; cuidados para a maioria das necessidades.

50 Requer ajuda considerável e cuidados médicos freqüentes.

40 Incapacitado; requer cuidado especial e ajuda.

30 Severamente incapacitado; hospitalizado morte não iminente.

20 Muito doente; precisa de internação urgente e requer medidas de suporte ou tratamento

10 Moribundo; processo de fatalidade rapidamente progredindo

0 Morto

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

**Anexo 2** - Classificação de Performance Status da ECOG- Eastern Cooperative Oncologic Group Classification

- 0 - Assintomático
- 1 – Sintomático,mas completamente ambulatorial
- 2 – Sintomático, permanece no leito <50% do
- 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** - Classificação da ASA American Society of Anesthesiology

I Paciente saudável

II Doença sistêmica moderada, sem limitação das funções vitais

III Doença sistêmica severa, com funções vitais comprometidas

IV Doença sistêmica severa com ameaça constante à vida

V Paciente moribundo, morte esperada nas próximas 24h sem intervenção cirúrgica

VI\_ Morte cerebral, os órgãos serão removidos para transplante

E Em cirurgias de emergência acrescentar o **E** ao número

\*\*\*As cirurgias de emergência triplicam o risco anestésico

Fonte: Saklad M. Grading of patients for surgical procedures. **Anesthesiology** 1941; 2:281-4. Modificado em 1963 e em 2002 pela American Anesthesiology Association.