



A.C. Camargo Cancer Center

Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

Análise de expressão imunohistoquímica de PD-1, PD-L1 e CTLA-4 no tecido metastático e avaliação de seu papel prognóstico em carcinoma renal de células claras metastático

Giovanni César Coelho Bomfim

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Walter Henriques da Costa

Co-orientador: Dr. José Augusto Rinck Jr.

São Paulo

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente

Bomfim, Giovanni.

Título: Análise de expressão imunohistoquímica de PD-1, PD-L1 e CTLA-4 no tecido metastático e avaliação de seu papel prognóstico em carcinoma renal de células claras metastático. / Giovanni Bomfim. São Paulo, 2023.

87f.

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

Orientador: Walter Henriques da Costa.

1. Câncer renal metastático, 2. Biomarcadores, 3. PD-1, PD-L1, CTLA-4

CDU 616

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2779

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do

Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Giovanni César Coelho Bomfim

Título: Análise de expressão imunohistoquímica de PD-1, PD-L1 e CTLA-4 no tecido metastático e avaliação de seu papel prognóstico em carcinoma renal de células claras metastático.

Aprovado em: 07/02/2023

Banca Examinadora

Orientador: Dr. Walter Henriques da Costa
Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Dra. Maria Nirvana da Cruz Formiga
Instituição: A. C. Camargo Cancer Center

Membro da banca: Dr. Leonardo Oliveira Reis
Instituição: Universidade de Campinas - Unicamp

Membro da banca: Dra. Mariana Petaccia de Macedo
Instituição: Rede D'Or São Luiz

*Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.*

James R. Scherman

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meus pais, Terezinha e Paulo, que tanto me incentivaram a sempre buscar o caminho do conhecimento. Dedico a minha amada esposa, Paula, pela energia sem fim em me apoiar incansavelmente. Dedico as minhas filhas, Julia e Carolina, mal sabem elas o quanto de força me deram para conseguir me envolver com tanta dedicação a este trabalho. Dedico aos meus irmãos, Gustavo e Galvão, pela eterna amizade e descontração. Sem vocês nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Walter Henriques da Costa, meu orientador e grande motivador deste trabalho, pela paciência e por sempre acreditar que tudo isso seria possível.

Ao Dr. José Augusto Rinck, pelas inúmeras sugestões, sua experiência como médico e pesquisador foram muito importantes desde a concepção do projeto até a entrega deste trabalho final.

Ao Dr. Roberto Soler, por desde a concepção deste projeto permitir a sua viabilidade. Grande mentor que me ajudou muito em todas as situações desta jornada de aprendizado.

À Dra. Stephania Bezerra, pela cordialidade, condução e análise de todas as amostras deste projeto, com muito profissionalismo e rigor.

À Dra. Maria Nirvana, por todas as orientações e sugestões, que foram muito importantes para o meu aprendizado e para a conclusão deste trabalho.

À Cássia, por dedicar todo seu conhecimento e auxiliar na captura de informações para compor a base de dados.

A pós graduação e biblioteca do A.C.Camargo, pelo apoio e orientação técnica durante esta jornada como aluno da instituição.

Aos inúmeros amigos do trabalho, pelo apoio incessante e pelo interesse genuíno na minha formação técnico-científica.

RESUMO

Bomfim GCC. **Análise de expressão imunohistoquímica de PD-1, PD-L1 e CTLA-4 no tecido metastático e avaliação de seu papel prognóstico em carcinoma renal de células claras metastático.** [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2023.

Introdução: Apesar dos grandes avanços no tratamento sistêmico com as terapias anti-VGFR e os CPIs, os pacientes com CCRm ainda são tratados da mesma forma. Há apenas fatores clínicos e laboratoriais prognósticos, mas não preditivos de resposta, como já existem em outros tumores. A busca de biomarcadores falhou em todos os estudos de fase III que ditam as terapias atuais, representando uma área de grande desafio no tratamento dos CCRm. O entendimento da heterogeneidade, não somente intratumoral no tumor primário, como também nas metástases, torna este desafio ainda maior. Onde poucos estudos analisaram biomarcadores nas metástases.

Materiais e Métodos: Foram analisados dados de 60 pacientes com CCRccm tratados no A.C.Camargo Cancer Center. O propósito desta análise foi estudar a expressão imunohistoquímica de PD-1, PD-L1 e CTLA-4 em tecido de metástase de carcinoma de células claras renal e sua eventual associação com desfechos clínicos e prognóstico na doença.

Resultados: Para a análise de sobrevida global, a ausência de nefrectomia, existência de metástase óssea e metástase em tecido mole conferiram um prognóstico ruim aos pacientes analisados. Com relação a análise de sobrevida livre de progressão as variáveis grau ISUP e metástase em tecido mole conferiram um pior prognóstico aos pacientes analisados. Com relação as variáveis clínicas, para a análise de sobrevida global, os pacientes que apresentaram KPS < 80 apresentaram prognóstico pior. Com relação a análise de sobrevida livre de progressão, os pacientes que apresentaram as variáveis de KPS < 80 e hipercalcemia apresentaram um pior prognóstico. Foi observado significância estatística para o marcador molecular PD-1 para a análise de sobrevida global, as amostras sem a expressão a expressão de PD-1 apresentaram mediana de 73,9 meses, enquanto os pacientes que apresentaram expressão deste biomarcador não atingiram a mediana ($p=0,044$).

Conclusão: Quando avaliadas na metástase de carcinoma de células claras renal a expressão imuno-histoquímica de PD-1 tem papel prognóstico para sobrevida global, porém o marcador não se mostrou ser uma variável de importância prognóstica independente das outras variáveis.

A expressão de IHQ de PD-L1 e CLTA-4 em CCRccm não demonstrou ter um papel prognóstico.

Palavras-chave: biomarcadores, câncer renal metastático, PD-L1, PD-1 e CTLA-4.

ABSTRACT

Bomfim GCC. **Analysis of immunohistochemical expression of PD-1, PD-L1 and CTLA-4 in metastatic tissue and assessment of their prognostic role in metastatic clear cell renal carcinoma.** [Dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2023.

Introduction: Despite major advances in systemic treatment with anti-VGFR therapies and checkpoint inhibitors (CPIs), patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC) are still treated in the same way. There are only prognostic clinical and laboratory factors, but not predictive or selector of therapies, as they already exist in other tumors. The search for biomarkers has failed in all phase III studies that dictate current therapies, representing an area of great challenge in the treatment of mRCC. The understanding of heterogeneity, not only intratumoral in the primary tumor, but also in metastases, makes this challenge even greater. Few studies have analyzed biomarkers in metastasis.

Materials and Methods: Data from 60 patients with mCRC treated at the A.C.Camargo Cancer Center were analyzed. The purpose of this analysis was to study the IHQ expression of PD-1, PD-L1 and CTLA-4 in renal clear cell carcinoma metastasis tissue and their eventual association with clinical outcomes and prognosis in the disease.

Results: For the analysis of overall survival, the absence of nephrectomy, presence of bone metastasis and metastasis in soft tissue conferred a poor prognosis to the patients analyzed. Regarding the analysis of progression-free survival, the variables ISUP grade and soft tissue metastasis conferred a worse prognosis to the patients analyzed. Regarding clinical variables, for the analysis of overall survival, patients who had KPS < 80 had a worse prognosis. Regarding the analysis of progression-free survival, patients who presented the variables of KPS < 80 and hypercalcemia had a worse prognosis. Statistical significance was observed for the molecular marker PD-1 for the analysis of overall survival, patients who lost PD-1 expression had a median of 73.9 months, while patients who showed expression of this biomarker did not reach the median ($p = 0.044$).

Conclusion: When evaluated in renal clear cell carcinoma metastasis, the immunohistochemical expression of PD-1 has a prognostic role for overall survival, but the biomarker was not shown to be a variable of prognostic importance independent of the other variables. IHQ expression of PD-L1 and CLTA-4 in CCRccm has not been shown to have a prognostic role.

Keywords: biomarkers, metastatic kidney cancer, PD-L1, PD-1 and CTLA-4.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Exemplos de aplicações de TMA.....	26
Figura 2	TMA de tecidos congelados	27
Figura 3	Diagrama representando o número de total de pacientes elegíveis ao estudo diagnosticados com CCRccm entre janeiro de 2007 a abril de 2022.....	35
Figura 4	Lâminas de imunohistoquímica de PD-1	41
Figura 5	Lâminas de imunohistoquímica de PD-L1.....	44
Figura 6	Lâminas de imunohistoquímica de CTLA-4.....	47
Figura 7	Curvas de sobrevida livre de progressão analisando os pacientes de acordo com seu grau ISUP	53
Figura 8	Curvas de sobrevida livre de progressão analisando os pacientes de acordo com a presença de metástase em tecido mole.	54
Figura 9	Curvas de sobrevida livre de progressão analisando os pacientes com KPS < 80	55
Figura 10	Curvas de sobrevida livre de progressão analisando os pacientes com hipercalcemia	56
Figura 11	Curvas de sobrevida global analisando a variável de realização ou não de nefrectomia.....	57
Figura 12	Curvas de sobrevida global analisando a presença de metástase óssea	58

Figura 13	Curvas de sobrevida global analisando a presença de metástase em tecido mole.....	59
Figura 14	Curvas de sobrevida global analisando os pacientes com KPS < 80	60
Figura 15	Curvas de sobrevida global analisando os pacientes conforme a expressão do biomarcador PD-1	61
Figura 16	Curvas de sobrevida global analisando os pacientes conforme uso de CPI	62
Figura 17	Receptores de <i>immune checkpoint</i> , divididos pela sua capacidade de inibição e ativação das células de defesa	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Modelos prognósticos para CCRm	9
Tabela 2	Lista de anticorpos específicos para PD-L1 que já foram estudados em ensaios clínicos Fase III	18
Tabela 3	Anticorpos que foram utilizados neste projeto	31
Tabela 4	Variáveis epidemiológicas de 60 pacientes com CCRccm	35
Tabela 5	Variáveis clínicas e patológicas de 60 pacientes com CCRccm	37
Tabela 6	Variáveis terapêuticas de 60 pacientes com CCRccm	39
Tabela 7	Frequência e porcentagem do <i>status</i> de pacientes com CCRccm	40
Tabela 8	Variáveis epidemiológicas e patológicas correlacionadas com a expressão de PD-1 de 60 pacientes com CCRccm	42
Tabela 9	Variáveis clínicas correlacionadas com a expressão de PD-1 de 60 pacientes com CCRccm	43
Tabela 10	Variáveis epidemiológicas e patológicas correlacionadas com a expressão de PD-L1 de 60 pacientes com CCRccm	45
Tabela 11	Variáveis clínicas correlacionadas com a expressão de PD-L1 de 60 pacientes com CCRccm	46
Tabela 12	Variáveis epidemiológicas e patológicas correlacionadas com a expressão de CTLA-4 de 60 pacientes com CCRccm	48
Tabela 13	Variáveis clínicas correlacionadas com a expressão de PD-L1 de 60 pacientes com CCRccm	49

Tabela 14	Modelo de risco de Cox simples das variáveis epidemiológicas e patológicas com sobrevida global e sobrevida livre de progressão.....	51
Tabela 15	Modelo de risco de Cox simples das variáveis clínicas com sobrevida global e sobrevida livre de progressão	52
Tabela 16	Modelo de risco de univariado das variáveis moleculares com SG e SLP	61
Tabela 17	Modelo de risco de Cox múltiplo das variáveis com SLP	63
Tabela 18	Modelo de risco de Cox múltiplo das variáveis com SG	63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
CAP	Campo de alta potência
CCR	Carcinoma de células renais
CCRm	Carcinoma de células renais metastático
CCRcc	Carcinoma de células renais células claras
CCRccm	Carcinoma de células renais células claras metastático
CCRcr	Carcinoma de células renais cromóforo
CCRp	Carcinoma de células renais papilar
CI	Células do sistema imunológico
CMIT	Células mononucleares do infiltrado tumoral
CPI	<i>Checkpoint inhibitors</i>
CMT	Carga mutacional tumoral
CPS	<i>Combined positive score</i>
CT	Célula tumoral
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
ESMO	<i>European Society of Medical Oncology</i>
FIH	Fator indutor de hipóxia
FR9I	Fator regulador 9 de interferon
FNCTA	Fator nuclear de células T ativadas
GNF	Grau nuclear de Fuhrman
Hb	Hemoglobina
IC	Inibidores de <i>checkpoint</i>
IT	Imunoterapia
IHQ	Imuno-histoquímica
ITT	<i>Intention to treat</i>
IMDC	<i>International Metastatic Renal Cancer Database Consortium</i>
JMRC	<i>Japanese Metastatic Renal Cancer</i>
KPS	<i>Karnofsky Performance Score</i>
LIT	Linfócitos do infiltrado tumoral
MSKCC	Memorial Sloan Kettering Cancer Center

NA	Não aplicável
Neu	Neutrófilos
NT	Nefrectomia
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PIR	Pontuação imunológica reativa
Plt	Plaquetas
RR	Razão de Risco
RT	Radioterapia
SP	Status de performance
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth fator receptor</i>
VHL	<i>Von Hippel-Lindau</i>
SCE	Sobrevida câncer-específica
SG	Sobrevida global
SLP	Sobrevida livre de progressão
TKI	<i>Tirosine kinase inhibitor</i>
TMA	<i>Tissue microarray</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1.	EPIDEMIOLOGIA	1
1.2.	CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA E MOLECULAR	2
1.2.1.	Carcinoma de células claras	2
1.2.2.	Carcinoma papilífero.....	2
1.2.3.	Carcinoma cromóforo.....	3
1.3.	TRATAMENTO PARA CÂNCER DE CÉLULAS RENAIIS LOCALIZADO ...	3
1.4.	TRATAMENTO SISTÊMICO PARA O CÂNCER DE CÉLULAS RENAIIS METASTÁTICO	4
1.4.1.	Imunoterapia.....	4
1.4.2.	Inibidores de tirosina quinase.....	5
1.5.	FATORES PROGNÓSTICOS E BIOMARCADORES	8
1.6.	FATORES CLÍNICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS	8
1.7.	FATORES MOLECULARES	10
1.8.	BIOMARCADORES EM IMUNONCOLOGIA DO CCRCC.....	12
1.8.1.	PD1.....	12
1.8.2.	PD-L1	14
1.8.2.1.	Harmonização de testes PD-L1 em oncologia.....	16
1.8.3.	CTLA-4	19
1.8.4.	Carga Mutacional Tumoral	21
1.9.	HETEROGENEIDADE INTRATUMORAL E INTERTUMORAL	22
1.10.	TISSUE MICROARRAY (TMA)	24
1.11.	JUSTIFICATIVA DO PROJETO.....	27
2.	OBJETIVO	29
2.2.	OBJETIVO SECUNDÁRIO	29
3.	METODOLOGIA.....	30
3.1.	POPULAÇÃO DE ESTUDO	30
3.2.	MONTAGEM DO BLOCO DE <i>TISSUE MICRO ARRAY</i> (TMA) E ANÁLISE POR IMUNO-HISTOQUÍMICA	31
3.3.	ANÁLISE DE EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE PD-1, PD-L1 E CTLA-4	32
3.4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4.	RESULTADOS	35
4.1.	PACIENTES E TRATAMENTOS.....	35
4.2.	AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE PD-1	42
4.3.	AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE PD-L1	45
4.4.	AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE CTLA-4	48

4.5	ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA	51
5.	DISCUSSÃO	65
6.	CONCLUSÃO	73
7.	REFERÊNCIAS	74

ANEXOS

ANEXO 1 Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa - CEP

ANEXO 2 Classificação TNM AJCC

ANEXO 3 Grau de ISUP

ANEXO 4 Escala de performance de Karnofski

ANEXO 5 Critérios do IMDC e MSKCC

APÊNDICES

APÊNDICE 1 Ficha de coleta de dados

1 INTRODUÇÃO

1.1. EPIDEMIOLOGIA DOS TUMORES RENAI

Em todo o mundo, o carcinoma de células renais (CCR) representa o sexto câncer diagnosticado com mais frequência em homens e o décimo em mulheres, representando 5% e 3% de todos os diagnósticos oncológicos, respectivamente ¹. As taxas de incidência de CCR têm aumentado e, em contextos de populações com alta renda, isso pode ser parcialmente devido a um aumento na detecção incidental de massas renais quando a imagem abdominal é realizada para queixas musculoesqueléticas ou gastrointestinais inespecíficas. Embora a maioria das lesões detectadas sejam tumores pequenos, a doença localmente avançada continua a ser diagnosticada em uma proporção notável de pacientes. Dezesete por cento dos pacientes se apresentam metastático no momento do diagnóstico e 20 a 40% dos pacientes com doença localizada irão eventualmente desenvolver doença metastática depois da cirurgia ².

No Brasil, segundo dados de 2020, 4.753 pacientes morreram de câncer renal, enquanto 11.971 brasileiros foram diagnosticados com a doença ³. Considerando dados mundiais, no total, o número de novos casos de câncer renal foi 337.860 (213.924 eram homens e 123.936 mulheres) e 143.406 mortes (90.802 casos em homens e 52.604 em mulheres) registrados, em 2022 ⁴.

Os principais fatores de risco associados ao câncer renal são: tabagismo, obesidade e hipertensão. Algumas condições clínicas que estão associadas ao CCR são doença renal crônica e diabetes mellitus. Indivíduos negros possuem um risco maior de desenvolvimento da doença que indivíduos brancos. Homens possuem um risco duas vezes maior que mulheres ⁵. Com relação a fatores protetores, o consumo moderado de álcool levou a um decréscimo de 20% no risco associado ao câncer renal ⁶. Além disso, a realização de atividade física esteve relacionada a um risco de câncer renal 13% menor quando comparada ao sedentarismo ⁷. A maioria dos casos de câncer de rim é esporádica, com apenas 3% a 5% ocorrendo em um contexto familiar. A síndrome de *Von Hippel-Lindau* (VHL) é a síndrome genética mais comum associada a um aumento do risco de câncer renal e corresponde a aproximadamente 1% dos carcinomas de células renais ^{8,9}. Além da síndrome de VHL, os tumores renais hereditários são encontrados nas seguintes entidades: carcinoma de células renais papilar (CCRp) hereditário, síndrome de Birt-Hogg-Dubé, leiomiomatose hereditária, síndrome de câncer colorretal sem polipose, síndromes de hamartomas homóloga de fosfatase e tensina, translocação constitucional do cromossomo 3 e CCRcc familiar não síndrômico ¹⁰.

1.2. CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA E MOLECULAR DOS TUMORES EPITELIAIS RENAI

1.2.1. Carcinoma de células claras

O carcinoma renal de células claras corresponde de 75% a 85% dos carcinomas renais ¹¹. Histologicamente o CCR de células claras (CCRcc) é bem delimitado e geralmente não há cápsula. A superfície de corte é amarelada devido à grande quantidade de lipídios nas células, com possível presença de áreas de necrose e hemorragia. Associa-se a deleção do cromossomo 3p e a mutação do gene *von Hippel-Lindau (VHL)* no cromossomo 3p25, incluindo genes supressores de tumores adicionais, como por exemplo *SETD2*, *BAP1* e *PBRM1*; todos os genes são identificados próximos ao gene *VHL* dentro de uma região que é frequentemente excluída nos pacientes com CCRcc ¹².

A proteína VHL, produto deste gene supressor de tumor, indiretamente desempenha um papel na capacidade das células de sair do ciclo celular. Assim, a proteína VHL é supressora de tumor que regula a angiogênese, a formação de matriz extracelular e o ciclo celular. Porém este mecanismo, que causa esta transformação neoplásica nestas células, não está completamente compreendido ¹³.

Um dos domínios da proteína VHL interage com o fator indutor de hipóxia 1 (HIF), que por sua vez faz a mediação da resposta celular à hipóxia. Na perda de VHL, ocorre acúmulo de HIF, que ativa a transcrição de genes indutores de hipóxia, por exemplo o fator de crescimento endotelial (VEGF), além de aumentar o transporte de glicose para o meio intracelular e interagir com o ciclo celular com consequente aumento da capacidade proliferativa ^{14,15}.

Cerca de 50% dos CCRcc se apresentam em estágios I e II e menos de 5% em estágio IV (AJCC-TNM) ¹⁶. Os CCRcc geralmente geram metástases via veia cava principalmente para o pulmão, embora também ocorram metástases linfáticas. O CCRcc é bem conhecido por sua propensão a metástases para locais incomuns, e metástases tardias, mesmo após dez anos ou mais, não são incomuns. Embora não faça parte formal do sistema de classificação, o componente sarcomatoide tem um efeito fortemente negativo, muitos desses pacientes morrem em menos de 12 meses ¹¹.

1.2.2. Carcinoma papilífero

O CCRp é o segundo tipo histológico mais comum de CCR, correspondendo aproximadamente a 10% das neoplasias renais. A apresentação deste tipo de tumor é geralmente

multifocal e bilateral. O CCRp é tradicionalmente subdividido em dois tipos ^{17,18}. Macroscopicamente, o CCRp é bem circunscrito com uma pseudocápsula, de cor amarela ou marrom e estrutura macia. Comparado ao CCRcc, o CCRp tem uma taxa significativamente mais alta de tumor confinado a órgãos (pT1-2N0M0) e uma taxa mais alta de sobrevida câncer específica (SCE) em cinco anos ¹⁹.

1.2.3. Carcinoma cromóforo

No geral, o carcinoma de células renais cromóforo (CCRcr) é caracterizado como uma massa bronzeada pálida, homogênea e firme, bem demarcada e sem cápsula. O CCR cromóforo não pode ser classificado pelo sistema de classificação de Fuhrman, devido à sua atipia nuclear inata. A perda dos cromossomos Y, 1, 2, 6, 10, 13, 17 e 21 são alterações genéticas típicas. O prognóstico é relativamente bom, com altas taxas de sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida câncer específica (SCE) em dez anos ¹⁷.

1.3. TRATAMENTO PARA CÂNCER DE CÉLULAS RENAIIS LOCALIZADO

O tratamento cirúrgico é a principal intervenção para o tratamento do CCR. Uma revisão sistemática evidenciou que nefrectomia parcial para doença localizada foi associada a um tempo reduzido para morte de qualquer causa em comparação com a nefrectomia radical, enquanto as taxas de eventos adversos graves, sobrevida câncer específica e tempo de recorrência foram semelhantes entre os dois grupos ²⁰.

Um estudo comparou os resultados de sobrevida em pacientes com CCRcc (≥ 7 cm) tratados com nefrectomia parcial vs. nefrectomia radical com acompanhamento de longo prazo (mediana > 8 anos). O grupo foi submetido à nefrectomia parcial teve uma sobrevida global (SG) mediana ($p = 0,014$) e uma sobrevida câncer específica mediana ($p = 0,04$) mais longas, significativamente ²¹. Em uma metanálise que comparou nefrectomia parcial vs. nefrectomia radical, em pacientes com CCR (cT1b e T2), foi observado que o grupo que foi submetido à nefrectomia parcial teve uma probabilidade menor de recidiva do tumor e mortalidade câncer específica ²².

O estudo CARMENA, que analisou o tratamento local associado ao tratamento sistêmico, randomizou pacientes para a nefrectomia citoredutora seguida de tratamento com sunitinibe vs. sunitinibe como monoterapia. Foi utilizado o grupo de risco MSKCC (*Memorial*

Sloan Kettering Cancer Center). Os dados de 450 pacientes com CCRccm foram analisados. Considerando sobrevida global como desfecho primário, o benefício clínico foi significativamente maior no braço de sunitinibe monoterapia, a razão de risco (RR) para morte, 0,89; intervalo de confiança de 95%, 0,71 a 1,10. A SG mediana foi 18,4 meses no grupo de sunitinibe monoterapia e 13,9 meses no grupo de nefrectomia associado ao sunitinibe. Portanto, os autores concluíram que a nefrectomia citorrredutora não deve mais ser considerada o padrão de tratamento em pacientes com CCRccm. No entanto, permanecem dúvidas sobre quais pacientes ainda podem se beneficiar do tratamento local, especialmente no grupo de risco intermediário, com apenas um fator de risco. Enquanto na nova era de uso da imunoterapia, o papel da cirurgia citorrredutora ainda não foi completamente estabelecido em estudos randomizados ²³.

1.4. TRATAMENTO SISTÊMICO PARA O CÂNCER DE CÉLULAS RENAIAS METASTÁTICO

1.4.1. Imunoterapia

O bloqueio do ponto de verificação imunológico com anticorpos monoclonais inibe o receptor de células T *programmed cell death protein 1* (PD-1) ou *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4), sinalizando para restaurar a imunidade de células T específicas do tumor, ou seja, diminuindo as sinalizações inibitórias do sistema imunológico. Um ensaio clínico de fase III com uso de nivolumabe (um anti PD-1) vs. everolimo após uma ou duas linhas de terapia direcionada a *vascular endothelial growth factor* (VEGF) reportou SG maior, melhor qualidade de vida e menos eventos adversos de grau 3 ou 4 com uso de nivolumabe do que com o de everolimo. O nivolumabe proporcionou SG superior ao everolimo (RR: 0,73, IC 95%: 0,57-0,93, $p < 0,002$) em CCR refratário a terapia direcionada a VEGF com SG mediana de 25 meses para o nivolumabe e 19,6 meses para o everolimo. O estudo incluiu 15% de pacientes de baixo risco, conforme os critérios do MSKCC. Não houve benefício em SLP com nivolumabe. ²⁴.

O estudo de fase III CheckMate 214 investigou a combinação de nivolumabe e ipilimumabe (um anti CTLA-4) em comparação com sunitinibe no tratamento de primeira linha do CCRm. Pacientes inelegíveis para *check point inhibitor* (CPI) ou terapia direcionada para VEGFR não foram incluídos. O ensaio teve desfechos triplos co-primários de taxa de resposta, SG e SLP em grupos de risco intermediário e pobre, conforme definido pelo *International Metastatic RCC Database Consortium* (IMDC). Mil e noventa e seis pacientes foram

randomizados, 847 dos quais tinham doença de risco intermediário ou pobre. Na população do estudo, 23%, 61% e 17% dos pacientes tinham doença de risco favorável, intermediário e pobre, respectivamente. Dois por cento da população *intention to treat* (ITT) e 28% da população de risco intermediário / pobre com expressão quantificável de PD-L1 foram classificados como positivo para a expressão por imuno-histoquímica do biomarcador PD-L1 (> 1% da coloração de células tumorais com anticorpo 28.8). O estudo atingiu os desfechos primários de taxa de resposta e sobrevida global. Porém não atingiu o desfecho de SLP ²⁵. Os tumores com alta expressão do biomarcador PD-L1, no início do estudo, foram associados a uma melhor SLP com nivolumabe mais ipilimumabe do que com sunitinibe (SLP HR: 0,48 95% IC: 0,28-0,82). Enquanto os pacientes da coorte PD-L1-negativa, nos dois grupos de tratamento, apresentaram SLP quase idêntica (HR: 1,0 95% IC: 0,74-1,36). Portanto, o biomarcador PD-L1 parece preditivo para SLP ²⁵.

O estudo de fase III, KEYNOTE-426, avaliou a combinação pembrolizumabe + axitinibe vs sunitinibe. O estudo randomizou pacientes com CCRcc, com pelo menos uma lesão metastática mensurável, não tratados previamente para receber pembrolizumabe (200 mg) por via intravenosa uma vez a cada 3 semanas mais axitinibe (5 mg) por via oral duas vezes ao dia, ou sunitinibe por via oral uma vez ao dia durante as primeiras quatro semanas de cada ciclo de seis semanas. Os desfechos primários foram SG e SLP. Após um acompanhamento mediano de 12,8 meses, a porcentagem estimada de pacientes vivos aos 12 meses foi de 89,9% no grupo de pembrolizumabe + axitinibe e 78,3% no grupo de sunitinibe (RR para morte: 0,53; intervalo de confiança de 95% [IC], 0,38 a 0,74; P <0,0001). A SLP mediana foi 15,1 meses no grupo pembrolizumabe + axitinibe e 11,1 meses no grupo sunitinibe (RR para progressão da doença ou morte, 0,69; IC 95%, 0,57 a 0,84; P <0,001). Entre os pacientes com CCRcc, não tratados previamente, o tratamento com pembrolizumabe mais axitinibe resultou em SG e SLP significativamente maiores, além de maior taxa de resposta, do que o tratamento com sunitinibe ²⁶.

1.4.2. Inibidores de tirosina quinase

Sorafenibe é um inibidor multi-quinase oral, que foi comparado ao placebo após falha de imunoterapia sistêmica ou em pacientes não candidatos para imunoterapia. A medicação apresentou melhores taxas de SLP (RR: 0,44; IC 95%: 0,35-0,55, p <0,01). Em pacientes com CCRm não tratados previamente, o sorafenibe não foi superior ao interferon alfa (IFN- α) (estudo de fase II) ²⁷.

Sunitinibe é um outro inibidor de tirosina quinase oral e possui atividade antitumoral e antiangiogênica. O sunitinibe como monoterapia de segunda linha (após citocinas) em pacientes com CCRm demonstrou uma resposta parcial em 34-40% e doença estável, por mais de 3 meses, em 27-29% dos pacientes. A monoterapia de primeira linha com sunitinibe demonstrou SLP significativamente mais longa em comparação com IFN- α . A sobrevida global foi maior em pacientes tratados com sunitinibe (26,4 meses) vs. IFN- α (21,8 meses), mesmo com o cruzamento de pacientes do braço IFN- α para o braço sunitinibe ²⁸.

Cabozantinibe é um inibidor oral da tirosina quinase, incluindo *tyrosine-protein kinase Met* (MET), *vascular endothelial growth fator receptor* (VEGFR) e *tyrosine-protein kinase receptor UFO* (AXL). Um estudo clínico de fase III, randomizado, investigou cabozantinibe vs. everolimo em pacientes com CCRccm que falharam em uma ou mais terapias direcionadas a VEGFR. Cabozantinibe proporcionou melhores taxas de SLP em comparação com everolimo na doença refratária à terapia direcionada a VEGFR (HR: 0,58 IC 95%: 0,45-0,75). A mediana de SLP para cabozantinibe foi 7,4 meses (IC 95%: 5,6-9,1) vs. 3,8 meses (IC 95%: 3,7-5,4) para everolimo. A SG mediana foi 21,4 meses (IC 95%: 18,7 a não estimável) com cabozantinibe e 16,5 meses (IC 95%: 14,7-18,8) com everolimo em CCR resistente a VEGFR. A RR para óbito foi de 0,66 (IC 95%: 0,53-0,83, p = 0,0003) ²⁹.

O estudo CHECKMATE 9ER avaliou a combinação de nivolumabe + cabozantinibe em comparação com sunitinibe, em primeira linha, para pacientes com CCRccm. A SLP mediana foi 16,6 meses (intervalo de confiança de 95% [IC], 12,5 a 24,9) com nivolumabe mais cabozantinibe e 8,3 meses (IC de 95%, 7,0 a 9,7) com sunitinibe (RR, 0,51; 95% CI, 0,41 a 0,64; p <0,001). A probabilidade de sobrevida global em 12 meses foi 85,7% (IC 95%, 81,3 a 89,1) com nivolumabe mais cabozantinibe e 75,6% (IC 95%, 70,5 a 80,0) com sunitinibe (RR, 0,60; IC 98,89%, 0,40 a 0,89; p=0,001). A porcentagem que pacientes que atingiu resposta objetiva foi 55,7% dos pacientes que receberam nivolumabe mais cabozantinibe e em 27,1% daqueles que receberam sunitinibe (p<0,001). Os benefícios de eficácia com nivolumabe mais cabozantinibe foram consistentes em todos os subgrupos ³⁰.

O axitinibe é um inibidor oral seletivo de segunda geração de VEGFR 1, 2 e 3. O axitinibe foi avaliado primeiro como tratamento de segunda linha. No estudo AXIS, o axitinibe foi comparado ao sorafenibe em pacientes que haviam anteriormente falhado no tratamento com citocinas ou agentes direcionados (principalmente sunitinibe). A mediana de SLP foi maior para axitinibe do que sorafenibe, a diferença na SLP foi maior em pacientes nos quais o tratamento com citocinas falhou. Para aqueles nos quais o sunitinibe falhou, o axitinibe foi associado a melhores taxas de SLP do que o sorafenibe (mediana de 4,8 contra 3,4 meses). A

sobrevida global foi um desfecho secundário do estudo, a análise final do sobrevida global não mostrou diferenças significativas entre axitinibe ou sorafenibe ³¹.

O estudo CLEAR randomizou pacientes com CCRccm, em primeira linha, para três diferentes tratamentos: lenvatinibe (20 mg por via oral uma vez ao dia) mais pembrolizumabe (200 mg por via intravenosa uma vez a cada 3 semanas), lenvatinibe (18 mg por via oral uma vez ao dia) mais everolimo (5 mg por via oral uma vez ao dia) ou sunitinibe (50 mg por via oral uma vez ao dia, alternando 4 semanas recebendo tratamento e 2 semanas sem tratamento). As taxas de SLP foram maiores com lenvatinibe mais pembrolizumabe do que com sunitinibe (mediana, 23,9 vs. 9,2 meses; RR, 0,39; intervalo de confiança de 95% [IC], 0,32 a 0,49; $P < 0,001$). As taxas de SLP foram maiores com lenvatinibe mais everolimo do que com sunitinibe (mediana, 14,7 vs. 9,2 meses; taxa de risco, 0,65; IC 95%, 0,53 a 0,80; $P < 0,001$). A SG foi maior com lenvatinibe mais pembrolizumabe do que com sunitinibe (taxa de risco para morte, 0,66; IC 95%, 0,49 a 0,88; $P = 0,005$), mas não foi maior com lenvatinibe mais everolimo do que com sunitinibe (RR, 1,15; 95% CI, 0,88 a 1,50; $P = 0,30$) ³².

Conforme a última atualização das diretrizes da *European Society of Medical Oncology* (ESMO), as opções terapêuticas em primeira linha do CCRccm permanecem orientadas pelo IMDC. A combinação de pembrolizumabe mais axitinibe é recomendada independentemente dos subgrupos prognósticos IMDC e status do biomarcador PD-L1, enquanto a combinação de nivolumabe mais ipilimumabe é restrita a pacientes com doença de risco intermediário e pobre. Os inibidores de tirosina quinase VEGFR agora só são recomendados em caso de contraindicação para as combinações acima mencionadas ³³. Enquanto o *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) indica para o tratamento em primeira linha, independentemente de subgrupos prognósticos: axitinibe mais pembrolizumabe, cabozantinibe mais nivolumabe, ou lenvatinibe mais pembrolizumabe. Para os pacientes de risco pobre, ou intermediário: ipilimumabe mais nivolumabe, ou cabozantinibe ³⁴.

O estudo CARMENA, que analisou o tratamento local associado ao tratamento sistêmico, randomizou pacientes para a nefrectomia citoredutora seguida de tratamento com sunitinibe vs. sunitinibe como monoterapia. Foi utilizado o grupo de risco MSKCC (*Memorial Sloan Kettering Cancer Center*). Os dados de 450 pacientes com CCRccm foram analisados. Considerando sobrevida global como desfecho primário, o benefício clínico foi significativamente maior no braço de sunitinibe monoterapia, a razão de risco (RR) para morte, 0,89; intervalo de confiança de 95%, 0,71 a 1,10. A SG mediana foi 18,4 meses no grupo de sunitinibe monoterapia e 13,9 meses no grupo de nefrectomia associado ao sunitinibe. Portanto, os autores concluíram que a nefrectomia citoredutora não deve mais ser considerada o padrão

de tratamento em pacientes com CCRccm. No entanto, permanecem dúvidas sobre quais pacientes ainda podem se beneficiar do tratamento local, especialmente no grupo de risco intermediário, com apenas um fator de risco. Enquanto na nova era de uso da imunoterapia, o papel da cirurgia citorrredutora ainda não foi completamente estabelecido em estudos randomizados ²³.

1.5. FATORES PROGNÓSTICOS E BIOMARCADORES

Um biomarcador é uma medida objetiva de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas à intervenção terapêutica. O objetivo principal de se determinar um biomarcador é refinar a previsão da progressão do tumor, a capacidade de resposta de determinada terapia e as taxas de sobrevida ³⁵. Para tratamento do CCRcc metastático com nefrectomia, vários fatores são preditivos, como idade, sexo, tempo entre a nefrectomia a o aparecimento de metástases, localização, trombo tumoral, histologia, estadiamento TNM, grau nuclear entre outros fatores. Para pacientes tratados com sunitinibe, o modelo prognóstico do MSKCC incorpora cálcio sérico corrigido, número de sítios metastáticos, nível de hemoglobina (Hb), nefrectomia anterior, presença de metástase em pulmão e fígado, status de performance do *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG-PS), trombocitose, tempo desde o diagnóstico até o tratamento, nível de fosfatase alcalina e lactato desidrogenase (LDH) ³⁶. Por outro lado, o sistema de pontuação de sobrevida livre de metástases da Mayo Clinic combina o estágio do tumor, o status do linfonodo regional, o tamanho do tumor, o grau nuclear de Fuhrman ³⁷. Tais marcadores identificam pacientes com câncer que estão em alto risco de recidiva metastática, potenciais candidatos para tratamento adjuvante e estratificam diferentes riscos de desfechos (por exemplo, recidiva da doença e SLP). A presença ou ausência destes marcadores pode ser útil para a seleção do tratamento, mas não prediz a resposta a este tratamento até o momento ³⁸.

1.6. FATORES CLÍNICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS

Vários modelos para a determinação de prognóstico em pacientes com CCRm já foram relatados (Tabela 1).

Tabela 1 - Modelos prognósticos para CCRm

	KPS	Tempo entre diagnóstico e tratamento	Hb	Plt	Neu	Cálcio corrigido	LDH	Fosfatase alcalina	Inflamação	Metástase		Terapia prévia			Ref
										n	Fígado	NTx	RTx	ITx	
IMDC	X	X	X	X	X	X									39
MSKCC															
1999	X		X			X	X					X			40
2002	X	X	X			X	X								36
Cleveland Clinic		X	X			X	X			X 1	X		X		41
Foundation Model															
French Model		X	X						X	X	X				42
International Kidney Cancer Working Group Model	X	X	X		X	X	X	X		X				X	43
JMRC model		X	X				X			X 2	X				44

Fonte: Autoria própria.

Legenda: 1. número de locais metastáticos com base na presença do fígado, pulmão e nódulo linfático; 2. número de locais metastáticos com base em metástases somente de fígado, somente osso ou metástases em múltiplos órgãos.

IMDC: *International Metastatic Renal Cancer Database Consortium*; MSKCC: *Memorial Sloan Kettering Cancer Center*; JMRC: *Japanese Metastatic Renal Cancer*; KPS: *karnofsky performance status*; Hb: hemoglobina; ITx: imunoterapia; Neu: neutrófilos; NTx: nefrectomia; Plt: plaquetas; RTx: radioterapia;

A classificação MSKCC é um dos modelos de prognóstico mais difundidos para o CCRm, estabelecido com base nos dados de 670 pacientes com CCRm tratados com terapia com citocinas ou quimioterapia. A classificação do MSKCC consiste em cinco parâmetros:

1. Status de performance determinado pelo escore de Karnofsky < 80%;
2. Lactato desidrogenase (LDH) alta ($LDH > 1,5 \times$ limite superior do normal);
3. Anemia (hemoglobina baixa, menor que o limite inferior do normal);
4. Hipercalcemia (cálcio corrigido > 10 mg/dL);
5. Pacientes não nefrectomizados.

Com base nesses parâmetros, os pacientes foram estratificados em três grupos com prognóstico diferente:

- (i) Grupo de risco favorável;
- (ii) Grupo de risco intermediário;
- (iii) Grupo de risco pobre.

Esse modelo foi revisado com base nos dados de pacientes tratados com imunoterapia, incluindo o INF- α ; e um dos parâmetros, “não nefrectomizado”, foi substituído por “o tempo desde o diagnóstico inicial do CCR até o início da terapia com IFN-alpha menor que 1 ano”⁴⁰.

Outro modelo prognóstico, o modelo IMDC, baseado na análise de 645 pacientes com CCRm que foram tratados em primeira linha com sunitinibe, sorafenibe e IFN-a + bevacizumabe. Uma pontuação de Karnofsky PS < 80, anemia, hipercalcemia, trombocitopenia, neutrofilia, e o período entre o diagnóstico e o início do tratamento menor que um ano foram identificados como parâmetros prognósticos através de análise multivariada. Pacientes com zero, um a dois e três a seis fatores de mau prognóstico foram classificados em um grupo de prognóstico favorável, grupo de prognóstico intermediário e grupo de prognóstico pobre, respectivamente. Esses modelos foram testados em outras coortes que realizaram terapia direcionada de segunda e terceira linha e foram confirmados para prever com precisão o prognóstico dos pacientes^{39,45,46}.

1.7. FATORES MOLECULARES

Nenhum dos marcadores moleculares estudados até agora melhorou claramente o valor preditivo dos sistemas prognósticos atuais e, até agora, nenhum deles foi validado. Seu uso rotineiro na prática clínica não é, no momento, recomendado. Numerosos marcadores já foram estudados, como anidrase carbônica IX (CaIX), VEGF, fator indutor por hipóxia (FIH), *Ki67*

(proliferação), p53, p21, *PTEN* (homólogo de fosfatase e tensina), ciclo celular, E-caderina, osteopontina CD44 (adesão celular), CXCR4^{47,48,49,50}.

Vários estudos retrospectivos e grandes programas de triagem molecular identificaram genes mutados no CCRcc com resultados clínicos distintos. A expressão dos genes *BAP1* e *PBRM1*, situados no cromossomo 3p em uma região deletada em mais de 90% dos CCRcc, tem se mostrado como fator prognóstico independente para recidiva tumoral. Relatórios publicados sugerem que pacientes com tumores com mutação no gene *BAP1* têm resultados piores em comparação com pacientes com tumores mutantes no gene *PBRM1*. Dados validados de séries cirúrgicas podem prever recidiva usando uma assinatura de dezesseis genes. É provável que essa assinatura seja adotada em ensaios clínicos e possa ser útil no ambiente clínico em alguns anos^{51,52,53,54}.

Relacionado ao impacto prognóstico da expressão proteica de *PBRM1* e *BAP1* no tecido metastático de pacientes com CCRcc metastático. Pacientes com CCRcc metastático que apresentam perda da expressão de *BAP1* no tecido metastático demonstraram taxas de sobrevida baixas e representam um grupo de risco relevante para recidiva do tumor e morte⁵⁵. O mesmo grupo avaliou ainda o valor prognóstico da expressão de PD-L1 para carcinoma de células renais localmente tratado cirurgicamente e suas implicações para estratificação de risco. A positividade para PD-L1 foi significativamente associada a piores resultados para pacientes com CCR localizado no seguimento intermediário. Esse marcador pode ajudar a estratificar os pacientes para uma vigilância mais rigorosa após o tratamento cirúrgico e fornece uma base para a terapia com CPI no cenário adjuvante⁵⁶.

Em outro estudo, do mesmo grupo de pesquisadores, foi demonstrado que pacientes com tumores em estágio inicial que apresentam perda concomitante de *PBRM1* e *BAP1* demonstraram piores taxas de sobrevida e representam um grupo de risco relevante para recidiva tumoral e óbito. O grupo avaliou o impacto prognóstico da expressão imuno-histoquímica de *BAP1* e *PBRM1* em pacientes com CCRcc em estágio inicial (pT1 – pT2N0M0). Um total de 441 pacientes tratados cirurgicamente para CCRcc em estágios I e II (TNM-AJCC 2010), entre 1990 e 2016, foram selecionados. Todos os casos foram revisados para reclassificação uniforme e as áreas tumorais mais representativas foram selecionadas para a construção de um *tissue microarray* (TMA). Das 441 amostras de CCRcc imunocoradas, 91 (20,6%) e 107 (24,3%) não apresentaram expressão de *PBRM1* e *BAP1*, respectivamente. Cinquenta e oito pacientes (13,2%) apresentaram expressão negativa de ambos os marcadores (*PBRM1*- / *BAP*-). Houve uma associação entre o padrão de expressão de ambos os marcadores e parâmetros clássicos, como estágio Tp ($P < 0,001$), tamanho do tumor ($p < 0,001$) e grau do

tumor ($p < 0,001$). A ausência de expressão de PBRM1 e BAP1 foi associada a taxas mais baixas de SCE e sobrevida livre de recidiva. Quando os pacientes foram agrupados na presença de expressão positiva de um ou ambos os marcadores vs. pacientes PBRM1- / BAP1-, a SCE e as taxas foram 95,3% vs. 77,6%, respectivamente ($p < 0,001$). O grupo de pacientes sem a expressão de PBRM1/BAP1 apresentou maior risco de morte específica por câncer (razão de risco = 2,722, $p = 0,007$) e recidiva da doença (RR = 2,467, $P = 0,004$) na análise multivariada⁵⁷.

A ausência de expressão de PBRM1 é um fator prognóstico ruim no CCRcc. Foi realizada análise imuno-histoquímica e de RNAm da subunidade polibromo-1 do complexo SWI / SNF (SWItch / Sacarose não fermentável) (PBRM1) no CCRcc e seu impacto nos desfechos clínicos. Duzentos e treze pacientes, que foram submetidos à nefrectomia, foram selecionados para esta análise. Além disso, a expressão de RNAm foi analisada pela técnica de *polymerase chain reaction* (PCR). Cento e doze amostras de CCRcc imunomarcadas, 34 (30,4%) eram PBRM1-negativas e 78 (69,6%) eram PBRM1-positivas. A expressão de PBRM1 foi associada ao estágio do tumor, estágio clínico, estágio N e tamanho do tumor. PBRM1 influenciou significativamente a recidiva do tumor e morte relacionada ao tumor. As taxas de SCE para pacientes cujas amostras apresentaram expressão positiva e negativa de PBRM1 foram 89,7% e 70,6%, respectivamente ($p = 0,017$). Taxas de sobrevida livre de recidiva em pacientes com expressão positiva e negativa de PBRM1 foram 87,3% e 66,7%, respectivamente ($p = 0,048$)⁵⁸.

1.8. BIOMARCADORES EM IMUNONCOLOGIA DO CCRCC

1.8.1. PD1

PD-1, também referido como CD279, foi descoberto em 1992 pela primeira vez em linhas celulares LyD9 (progenitor hematopoiético murino) e 2B4-11 (hibridoma de células T murino) privados de interleucina-3 (IL-3). PD-1 é 15% semelhante à sequência de aminoácidos de CD28, 20% semelhante a CTLA4 e 13% semelhante ao co-estimulador de células T induzido. PD-1 é uma proteína transmembrana de 55 kDa contendo 288 aminoácidos com um domínio N-terminal extracelular (semelhante a IgV), um domínio que permeia a membrana e uma cauda citoplasmática localizada nas extremidades N e C, respectivamente, com duas bases de tirosina^{59,60,61}.

PD-1 é um inibidor das respostas imunes adaptativas e inatas, e é expresso em linfócitos T ativados, natural killer (NK) e B, macrófagos, células dendríticas (DCs) e monócitos. PD-1 é

altamente expresso em células T tumor-específicas. Fatores de transcrição como fator nuclear de células T ativadas (FNCTA), NOTCH, proteína Forkhead box (FOX) O1 e fator regulador 9 de interferon (IFN-FR9I) podem desencadear a transcrição de PD-1. As regiões reguladoras B e C (CR-B e COR-C) são importantes para a expressão do gene PD-1^{62,63}. Há um sítio de ligação na região CR-C que está conectado ao NFATc1 (NFAT2) nas unidades TCD4 e TCD8. O c-FOS se conecta a locais na região CR-B e aumenta a expressão de PD-1 quando estimula os receptores de células T após a detecção de antígeno em células T naive. O NFATc é ativado e se liga à região do promotor do gene *pdcd1*. Além disso, IFN- α combinado com IRF9 pode resultar na expressão de PD-1 via ligação ao promotor do gene *pdcd1* em células T exauridas. Durante infecções crônicas, PD-1 é expresso em células T CD8 exauridas devido ao seu promotor desmetilado, e o fator de transcrição FOXO1 se liga ao promotor PD-1 para aumentar sua expressão^{64,65,66}.

PD-1 desempenha duas funções opostas, pois pode ser benéfico e prejudicial. No que diz respeito aos seus efeitos benéficos, desempenha um papel fundamental na redução da regulação de respostas imunes ineficazes e na manutenção da tolerância imunológica. Por outro lado, do ponto de vista prejudicial, o PD-1 contribui para a expansão das células malignas, interferindo nas respostas imunes⁶⁷.

Com a finalidade de estudar a expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA-4 por IHQ, 342 amostras de tumor CCR consecutivas foram analisadas. Os valores prognósticos de SCE e SG foram analisados para aqueles não expostos à terapia com CPI. A expressão de PD-1 em linfócitos do infiltrado tumoral (LIT) e PD-L1 em células tumorais foi detectada em 9,4% e 12,3%, respectivamente (pontuação imunológica reativa (PIR) > 0). Além disso, a expressão de PD-L1 em LIT e a expressão de CTLA-4 em LIT (> 1% de células positivas) foi detectada em 4,8% e 6,3%. A expressão de PD-1 e expressão de CTLA-4 foram significativamente associadas a uma pior SG SCE. Pacientes com expressão de CTLA-4 e expressão de PD-1 combinadas estão em maior risco de piores desfechos: SG e SCE. Em pacientes com CCR, a expressão de PD-1 em LIT e a expressão de CTLA-4 em LIT estão associadas a piores SG e SCE. A combinação da expressão de PD-1 e CTLA-4 em LIT pode identificar pacientes de alto risco⁶⁸.

O microambiente tumoral do CCR é diferente daquele de outros tipos de tumor. Uma diferença notável é a influência das células T CD8 que se infiltram no tumor. Na maioria dos cânceres, o aumento da densidade de CD8 está associado a um melhor prognóstico, enquanto dados mostram que no CCR, o aumento da densidade de células T CD8 está associado a um pior prognóstico. Essa relação é válida para lesões metastáticas e tumores primários. Os

mecanismos subjacentes a esse achado aparentemente paradoxal são atualmente desconhecidos. Um estudo recente identificou um subgrupo de pacientes com infiltração elevada de células T CD8; expressão aumentada de moléculas como PD-1 e gene de ativação de linfócitos-3 e uma escassez de células apresentadoras de antígenos funcionais, esses pacientes têm desfechos particularmente ruins. Assim, enquanto os mecanismos precisos envolvidos permanecem indefinidos, a relação da densidade de CD8 com prognóstico clínico indica, que CCRcc é imunologicamente distinto de outros tipos de tumor ⁶⁹.

1.8.2. PD-L1

O ligante PD-1 (PD-L1; também referido como CD279 e B7-H1), pertence à série B7 e é uma glicoproteína transmembrana tipo 1 de 33 kDa que contém 290 aminoácidos com domínios Ig- e IgC em sua região extracelular.⁷⁰ A associação da expressão de PD-L1 com maior grau e pior prognóstico de tumores malignos foi relatada em alguns estudos ⁷¹⁷².

Muitos fatores têm alguma influência na expressão de PD-L1. Não existe um protocolo padronizado para avaliar a expressão de PD-L1, incluindo procedimento de IHQ, o ponto de corte da amostra corada e a escolha do anticorpo. Os ensaios clínicos que investigaram a expressão de PD-L1 usaram diferentes ensaios de diagnóstico, por isso é difícil comparar os casos definidos como “PD-L1-positivo” em um estudo com aqueles em outros ⁷³.

PD-L1 é geralmente expresso por macrófagos, algumas células T ativadas e células B, células dendríticas e algumas células epiteliais, particularmente em condições inflamatórias ⁷⁴. Além disso, PD-L1 é expresso pelas células tumorais como um "mecanismo imune adaptativo" para escapar das respostas antitumorais ⁷⁵. O PD-L1 está associado a um ambiente imunológico rico em células T CD8, produção de citocinas Th1 e fatores químicos, além de interferons e características específicas de expressão gênica ⁷⁶.

IFN- γ induz a proteína quinase D isoforma 2 (PKD2), que é importante para a regulação de PD-L1. A inibição da atividade de PKD2 inibe a expressão de PD-L1 e promove uma forte resposta imune antitumoral. As células NK secretam IFN- γ através das vias Janus quinase (JAK) 1, JAK2 e transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) 1, aumentando a expressão de PD-L1 na superfície das células tumorais ⁷⁷. Estudos em células de melanoma mostraram que IFN- γ secretado por células T através da via JAK1 / JAK2-STAT1 / STAT2 / STAT3-IRF1 pode regular a expressão de PD-L1. As células T e NK parecem secretar IFN- γ , que induz a expressão de PD-L1 na superfície das células alvo, incluindo células tumorais ⁷⁸.

PD-L1 atua como um fator pró-tumorigênico em células cancerosas por meio da ligação aos seus receptores e ativação de vias de sinalização proliferativas e de sobrevivência. Este achado indicou ainda que PD-L1 está implicado na progressão tumoral subsequente. Além disso, PD-L1 demonstrou exercer efeitos proliferativos não imunes em uma variedade de tipos de células tumorais. Por exemplo, a transição epitelial-mesenquimal induzida por PD-L1 e indução de fenótipos semelhantes a células-tronco em células de câncer renal, indicando que a presença da via intrínseca de PD-L1 promove a progressão do câncer renal ⁷⁹.

Um dos primeiros estudos publicados sobre a relação prognóstica da expressão de PD-L1 em pacientes com CCRcc, analisou, entre 2000 e 2004, 196 pacientes que foram submetidos a nefrectomia e 26 pacientes tiveram ressecção de metástases de CCRcc. A análise de IHQ foi realizada em cortes congelados tumorais usando um anticorpo monoclonal B7-H1 (PD-L1). Um patologista, especialista em patologias urológicas, quantificou a porcentagem de células tumorais e linfócitos positivos para B7-H1. Níveis variáveis de expressão de B7-H1 foram expressos em células tumorais CCR primárias (n=130 [66,3%]) e linfócitos infiltrantes de tumor primário (n=115 [58,7%]). Pacientes com alta expressão de B7-H1 em células tumorais primárias e/ou linfócitos foram significativamente mais propensos a morrer de CCR em comparação com pacientes com baixa expressão de B7-H1 (RR: 4,17; intervalo de confiança de 95% [IC 95%], 1,97–8,84; P 0,001). Das 26 amostras metastáticas, a expressão de B7-H1 em células tumorais e linfócitos B7-H1 foi demonstrada em 17 (65,4%) e 18 (69,2%) amostras, respectivamente. No total, 14 (54,3%) amostras metastáticas tinham altos níveis agregados de B7-H1 em comparação com 44,4% nas amostras primárias de CCRcc. Pacientes com CCRcc com alta expressão de B7-H1 foram significativamente mais propensos a morrer, determinado por análise multivariada. Os autores também demonstraram que uma alta porcentagem de metástases de CCRcc de forma semelhante abrigava B7-H1 ⁸⁰.

Uma análise retrospectiva de 33 pacientes com CCRccm, que foram submetidos a cirurgia e receberam terapias de alvo molecular, entre março de 2008 a abril de 2016. As amostras de tumor primário dos pacientes foram analisadas quanto à expressão de PD-1 e PD-L1 por IHQ. A mediana da idade dos pacientes foi 64 anos e a maioria dos pacientes era do sexo masculino (81,8%). Todos os grupos de risco do Memorial Sloan Kettering Cancer Center foram representados entre os pacientes com 39,4% com risco favorável, 51,5% com risco intermediário e 9,1% com risco pobre. A expressão de PD-1 e PD-L1 foi observada em 16 (48,5%) e 9 (27,3%) pacientes, respectivamente. A expressão de PD-1 e PD-L1 foi associada a um tumor renal primário maior, maior grau nuclear e característica sarcomatoide. A análise de Kaplan-Meier revelou que nenhuma diferença significativa na SLP com o uso de terapia

direcionada molecular de primeira linha foi encontrada em pacientes com a expressão de positiva ou negativa de PD-1 ($P = 0,2396$) e PD-L1 ($P = 0,5919$). No entanto, a expressão de PD-1 teve um impacto significativamente pior na SG ($P = 0,0385$), enquanto para a expressão de PD-L1 apenas uma tendência foi observada para SG ($P = 0,1542$). Os pacientes com expressão de PD-1 e PD-L1 apresentaram maior infiltração de CD4 no tumor primário ($P < 0,0001$ para os dois grupos), CD8 ($P = 0,0328$ e $P = 0,0044$, respectivamente) e FOXP3 ($P < 0,0001$ e $P = 0,0033$, respectivamente). A expressão de PD-1 e PD-L1 está significativamente associada a características clínico-patológicas adversas no CCRcc. Conforme sugerido pelos autores, a expressão de PD-1 pode ser um dos biomarcadores sugerindo piores desfechos em pacientes com CCRccm recebendo terapias direcionadas moleculares ⁸¹.

Em uma análise prospectiva 30 pacientes que foram submetidos à nefrectomia radical ou parcial, com achados histopatológicos de CCR. A expressão de PD-L1 foi estudada em tecido tumoral com IHQ. Os pacientes foram acompanhados por um período de dois anos para recidiva da doença e mortalidade específica por câncer. A expressão de PD-L1 foi vista como associada a um grau e estágio mais elevados ao diagnóstico. A expressão de PD-L1 foi associada ao aumento estatisticamente significativo da incidência de recidiva da doença. Embora a mortalidade específica por câncer tenha sido maior em pacientes com expressão positiva de PD-L1, esta não foi considerada com significado estatístico ⁸².

PD-L1 pode ser expresso por células tumorais, mas também por células imunes, incluindo células mieloides e linfócitos. Embora o status de PD-L1 seja reconhecido como um marcador preditivo de resposta à CPI em alguns tipos de tumor (por exemplo, carcinoma de pulmão de não pequenas células)⁸³, ele não parece ser um biomarcador preditivo relevante no CCRccm. Nos estudos KEYNOTE 426 ²⁶ e Checkmate 214 ⁸⁴, os pacientes tratados com CPI (pembrolizumabe + axitinibe e nivolumabe + ipilimumabe, respectivamente) tiveram melhor sobrevida global em comparação com pacientes do grupo sunitinibe, independentemente do status de PD-L1 (o CPS de PD-L1 foi descrito como superior ou inferior a 1 no KEYNOTE 426 e expressão de PD-L1 superior ou inferior a 1% no Checkmate 214). Além disso, no estudo JAVELIN RENAL 101 ⁸⁵, nenhuma diferença em termos de SLP foi demonstrada de acordo com o status de PD-L1 em relação aos pacientes tratados com avelumabe + axitinibe.

1.8.2.1. Harmonização de testes PD-L1 em oncologia

O ensaio de PD-L1 é um procedimento de IHQ no qual o anticorpo primário reconhece e se liga a uma parte proteína chamada epítipo. Vários ensaios de PD-L1 foram desenvolvidos, cada um com um anticorpo específico que é projetado para se ligar a um epítipo diferente de PD-L1 e que foi criado para ser usado com um inibidor de checkpoint específico (Tabela 2). Os métodos diferem na escolha do clone de anticorpo, protocolo de coloração, plataforma e ponto de corte para o que é considerado expressão PD-L1 – positiva ou negativa em câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC), carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC) e carcinoma urotelial (UC) ⁸⁶.

Tabela 2 - Lista de anticorpos específicos para PD-L1 que já foram estudados em ensaios clínicos Fase III

Anticorpo PD-L1	Plataforma	Sistema de detecção	Agente	Linha de corte		
				NSCLC	HNSCC	UC
SP263	Ventana BenchMark Ultra	OptiView DAB IHQ Detection Kit	Durvalumabe	CT: $\geq 25\%$	CT: $\geq 25\%$	CT ou CI: $\geq 25\%$
22C3	Dako Autostainer Link 48	<i>EnVision FLEX visualization system</i>	Pembrolizumabe	CT: $\geq 1\%$, $\geq 50\%$ TPS	CT ou CI: $> 1\%$, $> 50\%$	CT e CI: $\geq 10\%$ TPS
28–8	Dako Autostainer Link 48	<i>EnVision FLEX visualization system</i>	Nivolumabe	CT: $> 1\%$, $> 5\%$	$> 1\%$, $> 5\%$	CT: $> 1\%$, $> 5\%$
SP142	Ventana BenchMark Ultra	<i>OptiView DAB IHQ Detection Kit and OptiView Amplification Kit</i>	Atezolizumabe	CT: $\geq 10\%$, CI: $\geq 50\%$	CT: $\geq 5\%$, CI: $\geq 5\%$	CT: $\geq 5\%$
73–10	Dako Autostainer Link 48	<i>EnVision FLEX visualization system</i>	Avelumabe	CT: $\geq 1\%$, 50% , 80%	NA	CT: $\geq 5\%$

Fonte: Adaptado de Ionescu DN, et al. 2018.

Legenda: CT: células tumorais; CI: células do sistema imunológico; NA: não aplicável; NSCLC: *non-small cell lung cancer*; TPS: *tumor proportion score*; HNSC: *head and neck squamous cell carcinoma*

Dadas as variações entre os métodos de teste, os ensaios PD-L1 provavelmente diferem em sua classificação de pacientes como PD-L1 - positivo ou negativo. Quando diferentes ensaios são usados, os pacientes podem ser classificados incorretamente com base no método

e na técnica de pontuação validada para um inibidor de checkpoint específico. Como consequência, os pacientes podem ser inadequadamente selecionados ou excluídos de um tratamento específico, potencialmente levando a toxicidades desnecessárias ou exclusão de tratamentos que poderiam melhorar os resultados.

Foi realizado um projeto de comparabilidade de imuno-histoquímica para PD-L1, chamado Blue Print, com o objetivo de avaliar a viabilidade de harmonizar o uso clínico de cinco ensaios de IHC PD-L1 comerciais desenvolvidos de forma independente.

O estudo foi conduzido usando 81 amostras de câncer de pulmão de vários tipos histológicos, corados com todos os cinco ensaios PD-L1 validados (22C3, 28-8, SP142, SP263 e 73-10). As lâminas foram avaliadas por um painel internacional de patologistas. O estudo também avaliou a confiabilidade da pontuação de PD-L1 usando imagens digitais e amostras preparadas para exame citológico. A expressão de PD-L1 foi avaliada quanto à porcentagem de células tumorais (CT) e áreas de células imunes que mostraram expressão de PD-L1. O estudo consolidou a evidência analítica para intercambialidade dos ensaios 22C3, 28-8 e SP263 foram altamente comparáveis, enquanto que a sensibilidade do ensaio SP142 foi menor para determinar a pontuação da proporção do tumor em CTs ⁸⁷.

1.8.3. CTLA-4

O antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4, CD152) é uma glicoproteína de membrana expressa por células T efectoras ativadas (Teffs) e participa na repressão da proliferação de células T, progressão do ciclo celular e produção de citocinas (IL-2, IFN- γ) ^{88,89}. CTLA-4 inibe a acumulação de mRNA de IL-2 estimulada por anti-CD3 / CD28 por células T CD41. Além disso, esta inibição é devida a um bloqueio na transcrição do gene responsável pela produção de IL-2 e pode ser uma consequência da inibição da ativação e translocação nuclear do fator de transcrição NF-AT. Uma consequência importante da co-estimulação mediada por CD28 é a estabilização do mRNA de IL-2 e várias outras citocinas. Os resultados sugerem que a ligação de CTLA-4 não leva à desestabilização do mRNA de IL-2. Este achado é consistente com a observação de que CTLA-4 não reverte a indução mediada por CD28 de Bcl-xL. Estes resultados sugerem fortemente que CTLA-4 não apenas neutraliza os efeitos co-estimuladores de CD28, mas pode agir em pontos diferentes ou adicionais na ativação de células T. A noção de que a co-estimulação de CTLA-4 e CD28 pode ter efeitos independentes é ainda apoiada por estudos recentes que demonstram que CTLA-4 pode funcionar na ausência de CD28 ⁸⁸.

CTLA-4 exerce sua função inibitória por meio de múltiplos mecanismos, incluindo competição com co-estimulação positiva para CD28 para ligação aos seus ligantes B7 compartilhados (CD80 / CD86) nas células apresentadoras de antígeno, bem como efeitos inibitórios diretos através da cauda citoplasmática que se associa com moléculas de sinalização⁹⁰.

O CTLA-4 parece estar relativamente super expressa na população de células T CD4 FOXP3-positivas que regulam negativamente as respostas imunes, das células T reguladoras (Tregs). Assim, o bloqueio de CTLA-4 provavelmente atenua a função Treg, o que leva a uma resposta antitumoral mais robusta. A expressão diferencial de PD-1 e CTLA-4 destaca um mecanismo potencial para sinergia terapêutica. Ao reverter a exaustão e inibir a função Treg, o bloqueio combinado de PD-1 / CTLA-4 foi a primeira combinação de CPI a demonstrar efeitos aditivos em animais, um resultado de um estudo pré-clínico recentemente traduzido em eficácia terapêutica no cenário de primeira linha em CCR metastático⁹¹.

Estudos mostraram que a expressão persistente de CTLA-4 em células neoplásicas de pacientes com câncer contribui para a progressão de tumores hematológicos e sólidos. Diferentes níveis de expressão de CTLA-4 em diferentes tipos de tumores podem influenciar o prognóstico. Por exemplo, a alta expressão de CTLA-4 foi detectada em câncer de pulmão de não pequenas células de tipo não escamoso e foi relacionada à idade do paciente e à diferenciação histológica, mas não ao prognóstico para desfechos clínicos⁹². Níveis elevados de RNAm de CTLA-4 foram associados a um bom desfecho clínico e maior período de tempo para o início do tratamento na leucemia linfocítica crônica de células B (LLC)⁹³. Em contrapartida, um estudo demonstrou que pacientes com câncer de mama com níveis mais altos de RNAm de CTLA-4 tinham metástases nos linfonodos axilares e um estágio clínico superior⁹⁴.

Liu e colaboradores, analisaram de forma abrangente o valor prognóstico de CTLA-4 no CCRcc e seu impacto nos LIT, que pode ser benéfico para a resposta terapêutica dos inibidores de CTLA-4 em pacientes com CCRcc. Dadas as preocupações atuais causadas pela imunoterapia combinada, também foi investigada a relação entre CTLA-4 e outros pontos de verificação do sistema imunológico. Experimentos in vitro mostraram que o aumento de expressão de CTLA-4 em tecidos de CCRcc está intimamente relacionado à progressão da doença, bem como um mau prognóstico. Outro estudo demonstrou que CTLA-4 regula a ativação de células T e foi significativamente associado ao microambiente tumoral abundante em LIT, mas foi acompanhado por um fenótipo imunossuprimido. Em uma análise molecular mostrou-se que CTLA-4 foi associado a maior frequência da mutação da proteína 1 associada

a BRCA (BAP1). Além disso, foi evidenciado que CTLA-4 foi marcadamente correlacionado com vários pontos de verificação imunológicos, o que sugere que os pacientes com CCRcc e com expressão elevada de CTLA-4 podem se beneficiar da terapia combinada com CPI. Os autores concluíram que CTLA-4 tem um impacto profundo na microambiente tumoral de LIT e pode ser usado como um biomarcador com alto valor de prognóstico em CCRcc ⁹⁵.

1.8.4. Carga Mutacional Tumoral

A carga mutacional tumoral (CMT) é um biomarcador emergente recentemente definido como preditivo para uma melhor resposta à imunoterapia. A definição de CMT é o número total de mutações por área de codificação do genoma do tumor, medido como mutações por megabase (mutações / Mb). As alterações genômicas que ocorrem nas células tumorais apresentam a capacidade de gerar neoantígenos (antígenos tumorais específicos), potencialmente processados e apresentados na superfície das células cancerígenas e, portanto, reconhecidos pelas células T, desencadeando a resposta antitumoral. A potencial associação de CMT com sensibilidade à imunoterapia é baseada na hipótese de que em tumores com CMT alta ocorre um aumento na produção de neoantígenos de superfície, estimulando assim a resposta do sistema imunológico antitumoral ⁹⁶.

No cenário de CCRm, evidências iniciais foram coletadas sobre este tópico em estudos recentes. Os escores de CMT exibem uma grande variabilidade através dos diferentes subtipos histológicos de CCR, variando de um nível muito baixo no tipo cromóforo a um valor comparável de CMT em células claras e tumores papilares e, além disso, CMT não está associado aos grupos de prognóstico clinicamente definidos de acordo com o IMDC e o MSKCC ⁹⁷. Apesar de sua alta taxa de resposta à imunoterapia, CCR é dotado de um CMT baixo / médio, apenas 1,1 mutações / Mb, em comparação com melanoma e câncer de pulmão de não pequenas células que apresentam valores que variam de 10 a 400 mutações / Mb. No entanto, o CCR representa o tumor dotado de maior proporção de alterações de inserção / deleção, que representam uma classe mutacional altamente imunogênica, podendo levar à produção de neoantígenos ⁹⁸.

Os resultados sobre o valor prognóstico do CMT e sua correlação potencial com a resposta à imunoterapia no cenário de CCRm são conflitantes. Quanto à associação com o prognóstico, as evidências da literatura são controversas, pois alguns estudos relatam uma tendência de melhora da sobrevida com o aumento da CMT, enquanto outros observaram valor prognóstico negativo da CMT ⁹⁹.

1.9. HETEROGENEIDADE INTRATUMORAL E INTERTUMORAL

A expressão de PD-1 / PD-L1 em tumores sólidos, como melanoma, câncer de bexiga, malignidades hematológicas, câncer de pulmão de não pequenas células pode ser usada como marcadores de prognóstico para prever o efeito terapêutico dos CPIs ¹⁰⁰¹⁰¹. Embora a super expressão de PD-L1 no carcinoma de células renais tenha se mostrado associada a características patológicas e prognósticos ruins ¹⁰², sua expressão em tumores primários falhou em prever se os pacientes podem se beneficiar da inibição do eixo PD-1 / PD-L1. Na verdade, 18% dos pacientes com CCR com PD-L1 negativo também se beneficiaram com o tratamento com CPIs, e ainda havia uma grande proporção de pacientes com PD-L1 positivo que não responderam ao tratamento ¹⁰³. As explicações para a discrepância entre os resultados do ensaio e as expectativas envolvem muitas possibilidades. Dentre elas, a heterogeneidade do tumor pode desempenhar um papel importante, principalmente a heterogeneidade entre os tumores primários e metastáticos.

A heterogeneidade intratumoral (HIT) pode promover a evolução e adaptação do tumor e dificultar as estratégias de medicina personalizada que dependem dos resultados de amostras de biópsia de tumor único. As análises de sequenciamento em larga escala de cânceres sólidos identificaram extensa heterogeneidade entre os tumores individuais e pode contribuir para a falha do tratamento e resistência aos medicamentos ¹⁰⁴.

Com a finalidade de analisar a HIT, foi realizado um sequenciamento de exoma, análise de aberração cromossômica e perfil de ploidia em várias amostras separadas espacialmente obtidas de carcinomas renais primários e sítios metastáticos associados. Foi caracterizada as consequências da heterogeneidade molecular intratumoral usando análise IHQ, análise funcional de mutação e perfil de expressão de RNA mensageiro. Os resultados mostraram que a evolução das mutações no CCR não ocorre de um forma linear e sim por um tronco e várias ramificações¹⁰⁵. A reconstrução filogenética revelou crescimento tumoral evolutivo ramificado, com 63 a 69% de todas as mutações somáticas não detectáveis em todas as regiões tumorais ¹⁰⁵.

A heterogeneidade mutacional intratumoral foi observada para vários genes supressores de tumor convergindo para a perda de função; SETD2, PTEN e KDM5C sofreram múltiplas mutações inativadoras distintas e espacialmente separadas dentro de um único tumor, sugerindo evolução fenotípica convergente. Assinaturas de expressão gênica de bom e mau prognóstico foram detectadas em diferentes regiões do mesmo tumor. A composição alélica e a análise de perfil de ploidia revelaram extensa heterogeneidade intratumoral, com 26 de 30 amostras de

tumor de quatro tumores apresentando perfis de desequilíbrio alélico divergentes e com heterogeneidade de ploidia em dois de quatro tumores ¹⁰⁵.

Com o objetivo de comparar a expressão de PD-L1 em uma série de CCRm primários e suas metástases. Blocos de tecido de 53 CCRm primários e 76 metástases correspondentes foram analisadas. Foram selecionadas áreas com grau nuclear predominante e mais alto. As lâminas foram imunocoradas com um anticorpo anti-PD-L1 validado. A expressão de PD-L1 na membrana de células tumorais foi quantificada usando Hscore. A expressão em células LIT foi quantificada usando uma pontuação combinada. Foi observada em 11/53 casos (20,8%) uma coloração discordante de células tumorais com expressão de PD-L1 entre tumores primários e metástases. A positividade de células tumorais PD-L1 foi associada a um estágio T mais alto ($p = 0,03$) e a um grau nuclear de Fuhrman (GNF) mais alto ($p < 0,01$). Em lesões individuais, a positividade de PD-L1 foi heterogênea e quase exclusivamente detectada em áreas de alto grau nuclear ($p < 0,001$). Nenhuma diferença foi encontrada nos níveis de PD-L1 em LITs entre tumores primários e metástases ($p = 0,82$). A heterogeneidade da expressão de PD-L1 em CCRcc sugere que sua avaliação como biomarcador preditivo para o bloqueio de PD-L1 pode exigir a análise de lesões metastáticas. Notavelmente, uma vez que a expressão de PD-L1 foi detectada principalmente em áreas de alto grau nuclear, para evitar resultados falsos negativos, essas áreas devem ser selecionadas especificamente para avaliação ¹⁰⁶.

Em um estudo de casos de CCRm histologicamente diagnosticados por ressecção focal ou aspiração por agulha fina. Foram analisados pacientes com doença metastática no diagnóstico inicial com metástase ressecada ou biopsiada, com ou sem amostras do tumor primário. Foram excluídos pacientes com metástases suspeitas de serem decorrentes de câncer renal, sem rastreamento de evidência de tumor primário ou com resultado negativo no rastreamento. Parâmetros clínico-patológicos foram extraídos retrospectivamente, incluindo idade, sexo, sítios metastáticos, estágio T, status do *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG), classificação IMDC, grau ISUP, tipo histológico, tratamento, status de nefrectomia e necrose tumoral. Os desfechos foram SLP e SG. SLP foi definido como o tempo desde o diagnóstico até a progressão da doença ou morte. SG foi definido como o tempo desde o diagnóstico até a morte por qualquer causa. A IHQ foi aplicada para detectar as expressões PD-1, PD-L1 e PD-L2. Foi avaliada a intensidade de coloração e os resultados foram registrados nas seguintes categorias: intensidade de coloração de nula (0), fraca (1+), moderada (2+) e forte (3+). A positividade foi definida como expressão detectada em células T de infiltração tumoral $> 5\%$ (PD-1) ou células tumorais (PD-L1 e PD-L2) com intensidade de coloração $\geq 1+$. Cento e sessenta e três pacientes foram estudados, os resultados de IHC sugeriram uma maior taxa de

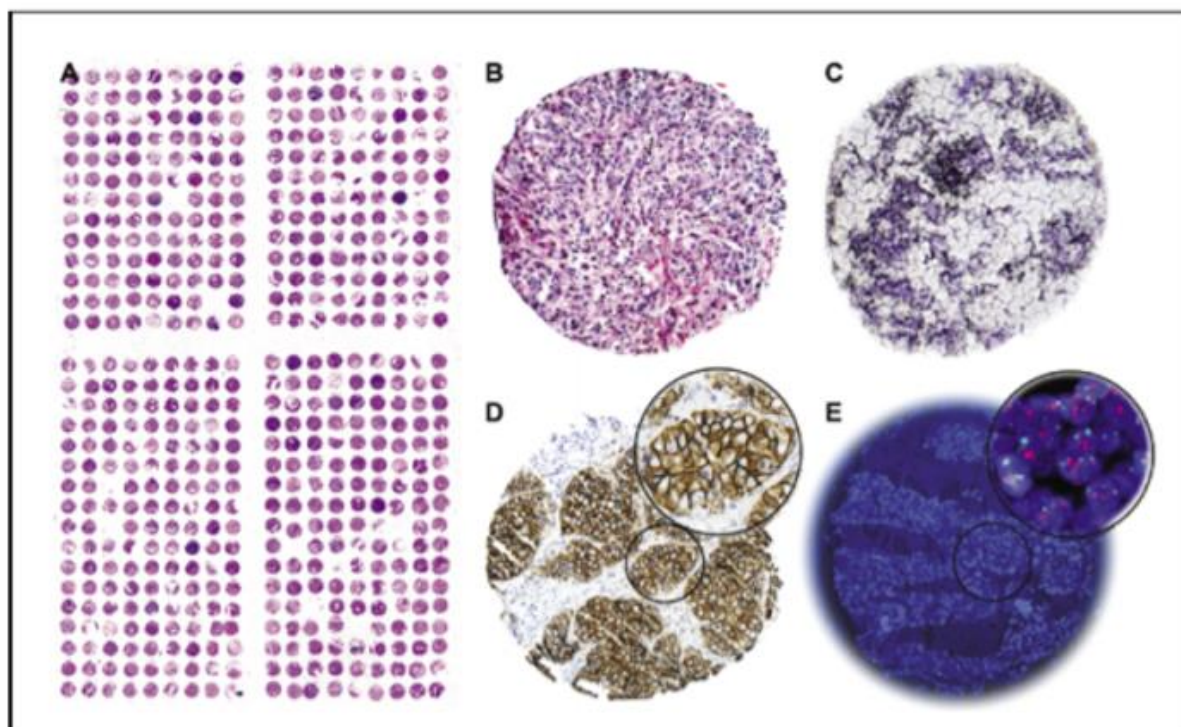
detecção de PD-L1 na metástase do que no sítio primário ($\chi^2 = 4,66$, $p = 0,03$). Entre os diferentes tumores metastáticos, PD-1 foi altamente expresso em linfonodos (65,3%) e pouco expresso no cérebro (10,5%) e metástases viscerais (12,5%). PD-L1 foi altamente expresso no pulmão / linfonodo (37,5%) e nas metástases ósseas (12,2%). Em termos de análise de sobrevida, os pacientes com expressão de PD-1 tanto no tumor primário quanto na metástase tiveram uma SG mais curta (HR: 1,59, IC 95% 1,08–2,36, $p = 0,02$). Além disso, a expressão de PD-L1 no tumor primário foi associada a uma SG mais curta (HR 2,55, IC 95% 1,06–6,15, $p = 0,04$). Os pesquisadores concluíram que PD-1, PD-L1 e PD-L2 foram expressos de maneira diferente entre tumores primários e metastáticos ¹⁰⁷.

A análise retrospectiva da expressão de PD-L1 em 34 pares combinados de nefrectomia e sítios metastáticos de pacientes com CCRm, foi encontrada uma fraca correlação entre a expressão entre sítios primários e metastáticos, sugerindo que a expressão de PD-L1 no tumor primário não pode selecionar pacientes para a utilização de inibidores de PD-1 e PD-L1. A terapia sistêmica foi administrada para tratar doença metastática, sendo assim, os autores avaliaram a diferença na expressão de PD-L1 entre os tecidos primários e metastáticos por testes t pareados. A expressão foi significativamente maior em amostras de tecido metastático versus primário ($P < 0,05$). A expressão de PD-L1 é dinâmica, sua expressão depende da história da doença e dos tratamentos recebidos. Além disso, a variabilidade intratumoral é uma expressão diferente no tumor primário e metástases, o que explicaria as altas taxas de resposta obtidas apesar da negatividade de PD-L1 na lesão primitiva, devem ser consideradas quando a expressão deste biomarcador é examinada ¹⁰⁸.

1.10. TISSUE MICROARRAY (TMA)

Avanços no campo da genética molecular humana revelaram mecanismos de doenças baseados em genes em muitas áreas da medicina. O estudo de novos marcadores de prognóstico e diagnóstico em diferentes amostras clínicas é um passo importante na tradução das novas descobertas da ciência básica para a prática clínica. Elucidar os mecanismos moleculares fundamentais que estão envolvidos na progressão gradual de tecidos normais para tumores malignos é essencial em nosso conhecimento em oncologia e deve levar a métodos aprimorados de detecção, tratamento e cura de cânceres. Estudos em tecidos identificaram vários novos marcadores, principalmente no nível genético. A validação desses marcadores usando as técnicas histopatológicas habituais é demorada, trabalhosa e cara, especialmente quando vários marcadores são testados em vários espécimes.

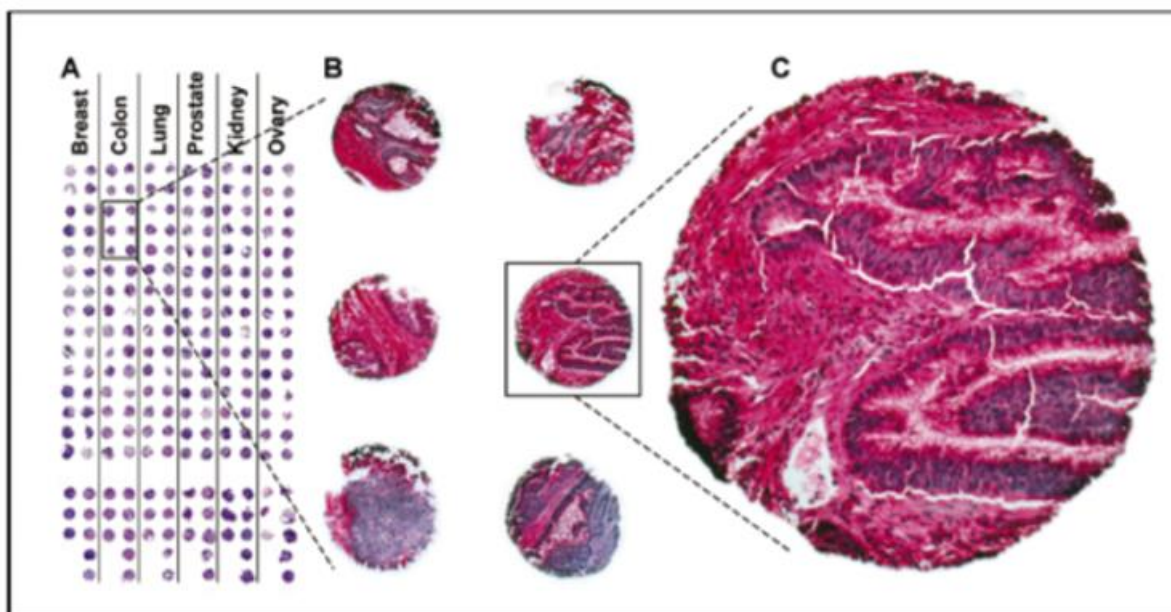
O TMA é uma técnica interessante para contornar essas dificuldades, já que a análise concomitante de diversos marcadores pode gerar um uso racional de reagentes, além de padronizar melhor as condições de reação e ainda permitir o uso mínimo de amostra. O TMA contém muitas pequenas amostras de tecido representativas de centenas de casos diferentes montados em uma única lâmina histológica e, portanto, permite a análise de alto rendimento de vários espécimes ao mesmo tempo. Os TMAs de tecido usam blocos de parafina produzidos pela extração de núcleos de tecido cilíndrico de diferentes blocos originais de parafina e reincorporando-os em um único bloco receptor (*microarray*) em coordenadas de matriz definidas. Usando esta técnica, até 1000 ou mais amostras de tecido podem ser agrupadas em um único bloco de parafina. Ele pode permitir a análise simultânea de alvos moleculares nos níveis de DNA, RNAm e proteína sob condições idênticas e padronizadas em uma única lâmina de vidro e fornecer preservação máxima e uso de amostras de tecido de arquivo, que muitas vezes são em número limitados. Esta técnica versátil, na qual a análise de dados é automatizada, facilita estudos retrospectivos e prospectivos de tecidos humanos. É uma ferramenta prática e eficaz para análise molecular de alto rendimento de tecidos que está ajudando a identificar novos marcadores de diagnóstico e prognóstico e alvos em cânceres humanos, e tem uma gama de aplicações potenciais em pesquisa básica, oncologia prognóstica e descoberta de medicamentos ¹⁰⁹.



Fonte: Adaptado de Simon R, et al. 2004.

Legenda: (A) Seção corada com hematoxilina e eosina (H&E) de um TMA de câncer de bexiga contendo 540 sítios de tecido. (B) Ampliação de um sítio de tecido H & E medindo 0,6 mm de diâmetro. (C) Análise de hibridização in situ de RNA (RNA-ISH). A expressão de mRNA do alvo é detectada com uma sonda oligonucleotídica antisense marcada radioativamente. A coloração preta indica as células que expressam o gene alvo. (D) Análise de IHQ de um sítio de tecido que detecta a expressão da proteína Her2. A ampliação mostra um sítio de tecido TMA do câncer de mama com coloração membranosa fortemente positiva (3+). (E) Análise de hibridização in situ de fluorescência (FISH). O sítio de tecido é contrastado com um corante fluorescente azul para permitir a identificação dos núcleos das células. A ampliação mostra alguns núcleos celulares com sinais específicos para o gene HER2 (sinais vermelhos) e a região centromérica do cromossomo 17 (sinais verdes). A alta proporção entre os sinais vermelho e verde indica uma amplificação do gene HER2.

Figura 1 - Exemplos de aplicações de TMA.



Fonte: Simon R, et al. 2004.

Legenda: (A) Multitumor TMA feito de tecidos congelados de diferentes órgãos. A parte maior do TMA contém tecidos tumorais e a parte menor na parte inferior contém tecidos normais dos órgãos correspondentes. (B) TMAs congelados frequentemente se tornam mais irregulares do que TMAs de tecidos incluídos em parafina. Portanto, uma distância ponto a ponto maior foi escolhida para evitar confusão se pontos específicos mudassem durante o corte. (C) Ampliação de um sítio de tecido corado com hematoxilina e eosina (H&E) (0,6 mm) mostrando boa preservação da histologia.

Figura 2 - TMAs de tecidos congelados.

1.11. JUSTIFICATIVA DO PROJETO

Apesar dos grandes avanços no tratamento sistêmico com as terapias anti-VGFR e os CPIs, os pacientes com

CCRm ainda são tratados da mesma forma. Há apenas fatores clínicos e laboratoriais prognósticos, mas não preditivos ou selecionadores de terapias, como já existem em outros tumores. A busca de biomarcadores falhou em todos os estudos de fase III que ditam as terapias atuais, representando uma área de grande desafio no tratamento dos CCRm. O entendimento da heterogeneidade, não somente intratumoral no tumor primário, como também nas metástases, torna este desafio ainda maior. Poucos estudos analisaram biomarcadores nas metástases. Portanto, o presente estudo visa explorar e esclarecer melhor o papel prognóstico dos marcadores PD1, PD-L1 e CTLA-4 no CCRm.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar o padrão de expressão imunohistoquímica de PD-1, PD-L1 e CTLA-4 em tecido de metástase de carcinoma de células claras renal e seu papel como marcador prognóstico de sobrevida global.

2.2. OBJETIVO SECUNDÁRIO

Avaliar o padrão de expressão imunohistoquímica de PD-1, PD-L1 e CTLA-4 em tecido de metástase de carcinoma de células claras renal e seu papel como marcador prognóstico em sobrevida livre de progressão em 1ª linha de tratamento sistêmico.

3. METODOLOGIA

3.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foi realizada uma análise retrospectiva de todos os pacientes com CCRccm em tratamento ou em acompanhamento na instituição no período de Janeiro de 2007 a Abril de 2022, os dados destes pacientes foram coletados através do formulário que se encontra no Apêndice 1. A base de dados avaliada foi o banco de dados eletrônico de registro hospitalar do A.C.Camargo Câncer Center. Os registros foram feitos apenas para os pacientes que possuíam material patológico da metástase.

Critérios de inclusão:

- Pacientes com CCRm, maiores de 18 anos, com material patológico de metástase na anatomia patológica do A.C.Camargo Cancer Center;
- Histologia do subtipo CCR para células claras;
- Os pacientes poderiam ter realizado metastasectomia;
- Os pacientes poderiam ter recebido tratamento sistêmico como imunoterapia, inibidores de tirosina quinase, inibidores da via de mTOR, além de inibidores de *checkpoint*.

Critérios de exclusão:

- Material arquivado em más condições para a elaboração de amostras para análise de IHC;
- Prontuários com dados incompletos;
- Pacientes que não foram tratados no A.C.Camargo Cancer Center.

As seguintes variáveis foram analisadas: idade, gênero, realização de nefrectomia, classificação TNM AJCC 7ª edição (Anexo 2), estadiamento do CCRm, histologia, Grau de ISUP (Anexo 3), sítios metastáticos, realização de tratamento sistêmico, tempo entre o diagnóstico e início do tratamento sistêmico, tipo de terapia sistêmica utilizada em primeira linha, melhor resposta ao tratamento em primeira linha, tipo de terapia sistêmica utilizada em segunda linha, melhor resposta ao tratamento em segunda linha, tipo de terapia sistêmica utilizada em terceira linha, melhor resposta ao tratamento em terceira linha, concentração de hemoglobina, contagem de neutrófilos, contagem de plaquetas, concentração de lactato

desidrogenase, concentração de cálcio corrigido e escala de performance de Karnofski (Anexo 4). Estas informações foram coletadas na introdução do primeiro tratamento sistêmico, ou no diagnóstico da primeira vez do surgimento da metástase.

Os pacientes foram classificados de acordo com o critério de IMDC (Anexo 5), onde os pacientes sem fator de risco são considerados grupo favorável, pacientes com 1-2 fatores de risco são considerados grupo intermediário e pacientes com mais do que 3 fatores de risco são considerados grupo desfavorável ¹¹⁰.

As análises patológicas foram realizadas através das lâminas de metástases, construídas em duplicatas, que foram construídas em um bloco de TMA. Todo o material se encontra arquivado no departamento de patologia do A.C.Camargo Cancer Center.

3.2. MONTAGEM DO BLOCO DE *TISSUE MICRO ARRAY* (TMA) E ANÁLISE POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

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

O TMA foi seccionado no micrótomo (Leica, RM2255) na espessura de 4 µm. As lâminas foram posteriormente incubadas com os anticorpos anti-PD-1 (diluição 1:50, cat. 315M-9, Cell Marque), anti-PD-L1 (diluição 1:50, cat. ab205921, Abcam) e anti-CTLA-4 (diluição 1:100, cat. ab19792, Abcam), através do kit de detecção Ultraview (cat. 760-500, Ventana Medical Systems).

As reações foram realizadas no sistema automatizado Ventana BenchMark XT (Ventana Medical Systems) seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, as lâminas foram desparafinizadas utilizando a solução EZprep (cat. 950-102, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA). A recuperação antigênica foi feita com os reagentes Cell Conditioning 1

(cat. 950-224, Ventana Medical Systems, Inc.) a 95°C. A especificação do kit de detecção, recuperação e diluição de cada anticorpo está descrito na tabela abaixo. Após o ensaio de imuno-histoquímica, as lâminas foram montadas com meio de montagem Entellan (cat. 107961, Merck) e entregues para avaliação histopatológica.

Tabela 3. Anticorpos que foram utilizados neste projeto.

Anticorpo	Catálogo	Clone	Empresa	Diluição	KIT	Protocolo	Controle
PD-1	315M-9	EPR4877	Cell Marque	1:50	Ultraview	30CC1 + 32AB	Tonsila
PD-L1	ab205921	28-8	Abcam	1:50	Ultraview	30CC1 + 32AB	Rim normal
CTLA-4	ab19792	BNI3	Abcam	1:100	Ultraview	30CC1 + 32AB	Tonsila

O anticorpo para PD-L1 utilizado foi o 28-8, pois o foi clone utilizado em todos os estudos envolvendo nivolumabe e combinações, sendo o CPI mais utilizado no tratamento do CCRm.

Após os ensaios de imuno-histoquímica, as lâminas foram montadas com meio de montagem Entellan (cat. 107961, Merck) e enviadas para avaliação histopatológica.

3.3. ANÁLISE DE EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE PD-1, PD-L1 E CTLA-4

Uma patologista especialista em uro-oncologia e cega para o desfecho dos casos, Stephania Martins Bezerra (SMB) pontuou a expressão dos anticorpos PD-1, PD-L1 e CTLA-4 em todas as amostras. A leitura dos resultados da imuno-histoquímica foi feita no formato de uma tabela de Excel onde se identificou uma determinada amostra pela coluna e linha correspondente àquela que ocupa no bloco de parafina. Durante a leitura, a patologista responsável SMB analisou as lâminas enquanto Giovanni Bomfim (GB) registrou os dados na tabela do Excel, para minimizar erros. Utilizamos tecido de tonsila como forma de controle positivo da reação para todos os marcadores pesquisados.

A expressão de PD-L1 foi avaliada com base na intensidade e porcentagem de células tumorais apresentando coloração membranosa ou citoplasmática e foi pontuada da seguinte forma. Intensidade: 0: negativo; 1: fraco; 2: moderado e 3: forte. Porcentagem: 0 (menos de 5% das células positivas); 1, fraco (5% a menos de 25% das células); 2, moderado (entre 25 e 60% das células); e 3, forte (mais de 60% das células) ⁵⁶.

A expressão de PD-1 foi analisada na membrana das células inflamatórias infiltrantes na neoplasia, foi considerada positiva se $\geq 5\%$ estivessem marcadas para este biomarcador ⁷¹. A análise de CTLA-4 foi realizada na membrana das células inflamatórias infiltrantes na neoplasia. Como nenhum valor de corte para a expressão de CLTA-4, em IHQ em CCR é definido, e a expressão de CTLA-4 foi descrita em cerca de 1% de CMIT em CCR, definimos um corte em 2% de CTLA-4 células positivas no infiltrado do tecido tumoral para definir um tumor como positivo para CTLA-4 ⁶⁸.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos através de análise de prontuários e registrados em um formulário padronizado. Estas informações para transferidas para um banco de dados arquivado no programa *Excel for Windows*. A análise estatística foi realizada através do software IBM SPSS, versão 20.0.

Tabelas de contingência foram utilizadas para demonstrar as variáveis referentes ao tratamento, clínicas e anatomopatológicas, enquanto médias e desvios-padrão foram utilizadas para as variáveis quantitativas.

A possibilidade de correlação da expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA-4 às demais variáveis, foi avaliada através do teste Qui Quadrado de Pearson (MORETTIN e BUSSAB 2005). Para as variáveis que as frequências esperadas foram inferiores a 5 o teste exato de Fisher foi utilizado. A significância adotada foi o de 5%.

A identificação dos fatores independentes relacionados à SLP e SG foi realizada pela regressão logística múltipla. As variáveis selecionadas para o estudo múltiplo foram as que atingiram significância estatística na análise univariada, bem como aquelas que atingiram valores de p de até 0,20. O resultado para os modelos multivariados, regressão logística e de COX (1972), foi obtido pela estratégia *stepwise forward selection*, onde a partir da variável de maior significância na análise univariada foram acrescentadas às outras, uma a uma, em ordem crescente.

Para estudar as análises de SLP e SG utilizou-se o estimador de KAPLAN e MEIER (1958) como ferramenta para estimar a probabilidade de um paciente com CCR estar vivo, não apresentar recidiva, ou não apresentar progressão até o instante de tempo considerado. Através da representação gráfica desse estimador, conseguimos visualizar, para uma determinada variável, qual categoria de pacientes apresenta maior probabilidade de não morrer por CCR ou

não apresentar recidiva de CCR ao longo do tempo. Quanto mais superior for a curva referente a uma determinada categoria, maior será a probabilidade de os pacientes dessa categoria estarem vivos ou sem recidiva do CCR até o instante de tempo considerado. Para a comparação das curvas estimadas para cada categoria dentro de uma determinada variável utilizou-se o teste não-paramétrico de LogRank. Os valores p correspondentes aos testes estão apresentados no canto inferior direito de cada gráfico. O nível de significância adotado foi o de 5%.

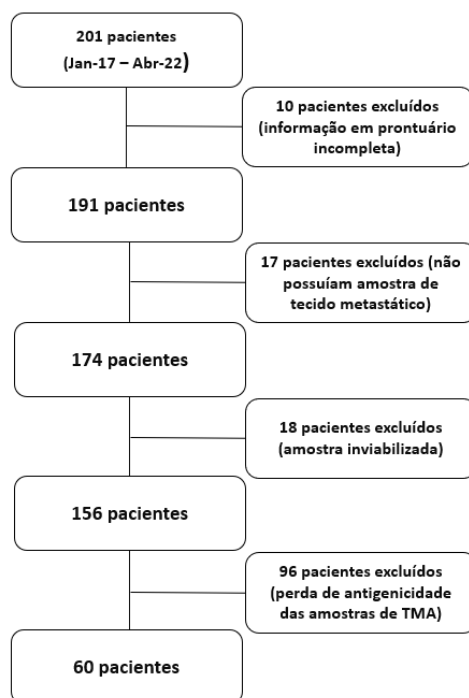
Para os pacientes que foram classificados como perda de seguimento, eles contribuíram para as curvas de sobrevida global até a última data de registro em sistema e posteriormente foram considerados censurados.

Dados estatisticamente significativos foram considerados aqueles com um valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. PACIENTES E TRATAMENTOS

Foram analisados os prontuários de 201 pacientes com o diagnóstico de CCRm tratados no hospital A.C.Camargo Cancer Center no período entre Janeiro de 2007 a Abril de 2022. 10 pacientes foram excluídos pois havia informações em prontuário incompletas, 17 pacientes foram excluídos pois não possuíam amostra de tecido metastático no departamento de anatomia patológica do hospital, 18 pacientes foram excluídos pois a amostra de tecido foi inviabilizada após o corte no micrótomo. 96 pacientes foram excluídos devido a perda de imunogenicidade. A Figura 3 mostra um diagrama que representa o número total de pacientes elegíveis. Sendo assim, 60 pacientes foram incluídos neste estudo, sendo que 46 (77%) eram do sexo masculino, enquanto 14 (23%) eram do sexo feminino. A mediana de idade ao diagnóstico de CCRcc encontrada para a população total foi de 56 anos. Com relação à terapia inicial com objetivo curativo, 56 (93%) dos pacientes passaram por nefrectomia. Dentre os pacientes que passaram pela nefrectomia, que possuem dados disponíveis, 19 (32%) foram estadiados inicialmente com doença local, estadiamento patológico I (pT1a ou pT1b e N0; 12 pacientes 20%), ou II (pT2a ou pT2b e N0, 7 pacientes 12%). 19 pacientes (32%) foram diagnosticados inicialmente como metastáticos, ou dentre de 6 meses após o diagnóstico inicial, enquanto 41 (68%) foram diagnosticados com doença metastática progressiva após o diagnóstico de CCRm. A mediana de idade ao diagnóstico da metástase foi de 60 anos. As variáveis epidemiológicas encontram-se na Tabela 4.



Fonte: Autoria própria.

Figura 3 - Diagrama representando o número de total de pacientes elegíveis ao estudo diagnosticados com CCRccm entre janeiro de 2007 a abril de 2022.

Tabela 4 - Variáveis epidemiológicas de 60 pacientes com CCRccm

Variável	Categoria	N	%	Mediana
Idade ao diagnóstico da doença	35 - 44 anos	8	13%	56
	45 - 59 anos	23	38%	
	60 - 77 anos	29	48%	
Idade ao diagnóstico da metástase	35 - 44 anos	6	10%	60
	45 - 59 anos	22	37%	
	60 - 79 anos	32	53%	
Gênero	Masculino	46	77%	-
	Feminino	14	23%	
Metástase diagnóstico	ao Sim	19	32%	-
	Não	41	68%	

Quanto a distribuição dos sítios metastáticos, os 3 sítios com maior incidência de metástase foram: 62% dos pacientes possuíam metástase pulmonar, 57% possuíam metástase

óssea e 33% possuíam metástase linfonodal. Toda a descrição da distribuição de sítios metastáticos encontra-se na Tabela 5.

Quanto aos fatores de risco conforme os critérios do IMDC, a seguinte distribuição foi encontrada entre os pacientes da base de dados do hospital: 38% dos pacientes apresentaram tempo entre diagnóstico e tratamento maior que 1 ano; 35% apresentaram anemia; 25% apresentaram neutrofilia; 22% apresentaram hipercalcemia; 12% apresentaram plaquetose e 10% apresentaram KPS < 80. Como resultado desta distribuição, conforme os critérios do IMDC tivemos 15% dos pacientes com definição de doença com bom prognóstico, 60% dos pacientes apresentaram prognóstico intermediário, enquanto 18% dos pacientes apresentaram prognóstico pobre. Não foi possível definir o critério prognóstico de acordo com o IMDC para 7% dos pacientes, devido a dados de prontuário incompletos.

Tabela 5 - Variáveis clínicas e patológicas de 60 pacientes com CCRccm

Variável	Categoria	N	%
Estadiamento patológico inicial	T1N0	12	20%
	T2N0	7	12%
	T3 ou N+	14	23%
	T4 ou M1	4	7%
	Ausente	23	38%
ISUP	1	1	2%
	2	9	15%
	3	11	18%
	4	7	12%
	Ausente	32	53%
KPS > 80	Sim	6	10%
Anemia	Sim	21	35%
Neutrofilia	Sim	15	25%
Plaquetose	Sim	7	12%
Hipercalcemia	Sim	13	22%
Tempo > 1 ano entre diagnóstico e tratamento	Sim	23	38%
Sítios metastáticos	Pulmonar	37	62%
	Óssea	34	57%
	Linfonodal	20	33%
	SNC	14	23%
	Intra-abdominal	12	20%
	Tecido Mole	12	20%
	Hepático	11	18%
Classificação IMDC	Bom	9	15%
	Intermediário	36	60%
	Pobre	11	18%
	Ausente	4	7%

Legenda: ISUP: *International Society of Urological Pathology*. KPS: *Karnofsky Performance Status*. IMDC: *International Metastatic RCC Database Consortium*

Com relação ao tipo de tratamento que os pacientes analisados receberam, dentre os 60 pacientes com dados disponíveis, 4 (6,6%) receberam apenas metastasectomia e não realizaram tratamento sistêmico. 56 (93,3%) receberam pelo menos uma linha de tratamento sistêmico. Trinta e oito (63,3%) receberam pelo menos 2 linhas de tratamento. Vinte e dois (36,6%) receberam pelo menos 3 linhas de tratamento. Oito pacientes (13,3%) receberam pelo menos 4 linhas de tratamento. Dois (3,3%) receberam 5 linhas de tratamento.

Dentre os pacientes que receberam tratamento sistêmico, para a primeira linha 49 (94%) utilizaram inibidores de tirosina quinase (sunitinibe, sorafenibe ou pazopanibe). A combinação nivolumabe com ipilimumabe foi utilizada por apenas 3 pacientes em primeira linha (5%). Enquanto a terapia mais utilizada em segunda linha foi nivolumabe monoterapia, 16 pacientes (42%). Os inibidores de tirosina quinase foram a classe mais utilizada pelos pacientes em terceira linha, 74% dos pacientes receberam esta classe terapêutica. A descrição das variáveis terapêuticas utilizadas se encontra na Tabela 6.

Tabela 6 - Variáveis terapêuticas de 60 pacientes com CCRccm

Variável	Categoria	N	%
Nefrectomia	Sim	56	93%
	Não	4	7%
Metastasectomia	Sim	6	10%
	Não	54	90%
Tratamento Sistêmico			
1ª linha	Sunitinibe	33	63%
	Pazopanibe	16	31%
	Nivolumabe + ipilimumabe	3	6%
2ª linha	Sunitinibe	3	8%
	Sorafenibe	4	11%
	Pazopanibe	3	8%
	Everolimo	8	21%
	Axitinibe	2	5%
	Nivolumabe + ipilimumabe	1	3%
	Nivolumabe	16	42%
	Cabozantinibe	1	3%
3ª linha	Sunitinibe	1	5%
	Sorafenibe	5	23%
	Pazopanibe	2	9%
	Everolimo	1	5%
	Axitinibe	5	23%
	Nivolumabe	3	14%
	Cabozantinibe	3	14%
	Everolimo + lenvantinibe	2	9%
4ª linha	Pazopanibe	3	38%
	Tensirolimo	1	13%
	Axitinibe	2	25%
	Everolimo + lenvantinibe	2	25%
5ª linha	Tensirolimo	2	100%

Considerando o status dos pacientes, 24 pacientes (40%) morreram, 26 estão vivos com doença (43,3%) e 2 pacientes (3,3%) estão vivos com doença. Houve perda de seguimento em 13,3% dos pacientes.

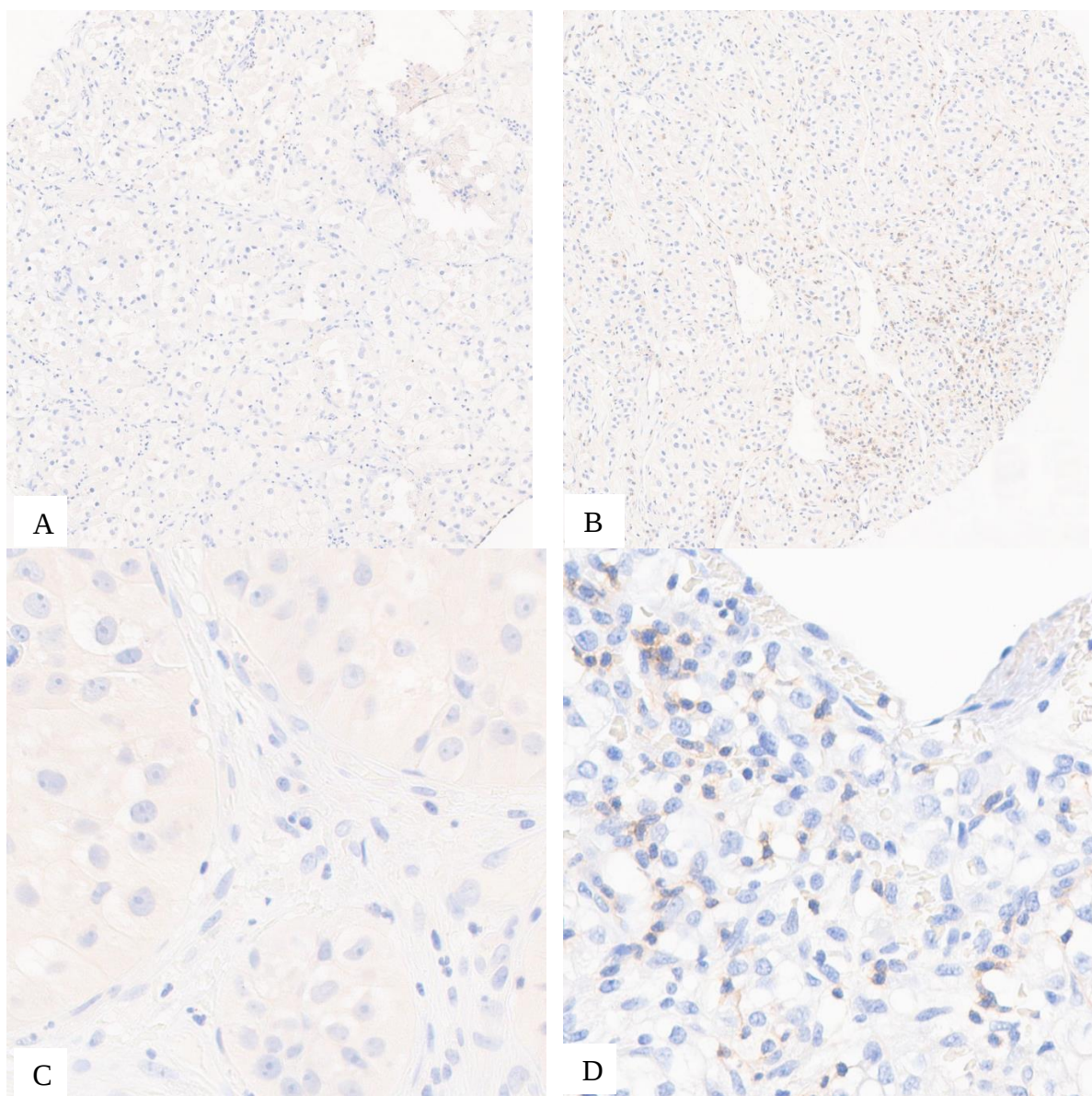
Tabela 7 - Frequência e porcentagem do status de pacientes com CCRccm

Status	n	%
Vivo sem doença	2	3,3%
Vivo com doença	26	43,3%
Óbitos	24	40,0%
Perda de seguimento	8	13,3

4.2 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE PD-1

Dos 60 pacientes, 100% possuíam disponível material histopatológico para a análise de imuno-histoquímica. O marcador PD-1 foi analisado na membrana da célula inflamatória tumoral, 11 pacientes (18,3%) apresentaram marcação positiva.

A correlação de PD-1 com as variáveis epidemiológicas e patológicas está descrita na Tabela 8. Não houve qualquer variável epidemiológica/patológica que apresentou associação estatisticamente significativa com a expressão de PD-1. (Figura 4)



Legenda: A: expressão negativa; B: expressão positiva; C: expressão negativa campo de grande aumento (CGA); D: expressão positiva CGA.

Figura 4 – Lâminas de IHQ de PD-1.

Tabela 8 - Variáveis epidemiológicas e patológicas correlacionadas com a expressão de PD-1 de 60 pacientes com CCRccm

Variável	Categoria	PD-1 negativo	PD-positivo	Valor p
Gênero	Feminino	12 (85,7%)	2 (14,3%)	0,498
	Masculino	37 (80,4%)	9 (19,6%)	
Nefrectomia	Sim	45 (85,4%)	11 (19,6%)	0,434
	Não	4 (100%)	0	
Estadiamento Patológico	T1N0	8 (72,7%)	3 (27,3%)	0,545
	T2N0	4 (80%)	1 (20%)	
	T3 ou N+	14 (82,4%)	2 (17,6%)	
	T4 ou M1	2 (50%)	2 (50%)	
Acometimento linfonodal	Negativo	21 (77,8%)	6 (22,2%)	0,182
	Positivo	8 (100)	0	
ISUP	1	0	1 (100%)	0,34
	2	8 (88,9%)	1 (11,1%)	
	3	8 (72,7%)	3 (27,3%)	
	4	5 (71,4%)	2 (28,6%)	
Sítios metastáticos Pulmonar	Sim	30 (81,1%)	7 (18,9%)	0,624
	Não	17 (81%)	4 (19%)	
Hepático	Sim	10 (90,9%)	1 (9,1%)	0,338
	Não	38 (79,2%)	10 (20,8%)	
Óssea	Sim	30 (88,2%)	4 (11,8%)	0,093
	Não	17 (70,8%)	7 (29,2%)	
SNC	Sim	13 (92,9%)	1 (7,1%)	0,196
	Não	35 (77,8%)	10 (22,2%)	
Intra-abdominal	Sim	8 (66,7%)	4 (33,3%)	0,147
	Não	40 (85,1%)	7 (14,9%)	
Tecido Mole	Sim	12 (100,0%)	0	0,062
	Não	36 (76,6%)	11 (23,4%)	
Linfonodal	Sim	18 (90,0%)	2 (10,0%)	0,208
	Não	31 (77,5%)	9 (22,5%)	

Legenda: ISUP: *International Society of Urological Pathology*

A correlação de PD-1 com as variáveis clínicas está descrita na Tabela 9. As seguintes variáveis clínicas apresentaram associação estatisticamente significativa com a expressão de PD-1: presença de anemia e classificação IMDC.

Tabela 9 - Variáveis clínicas correlacionadas com a expressão de PD-1 de 60 pacientes com CCRccm

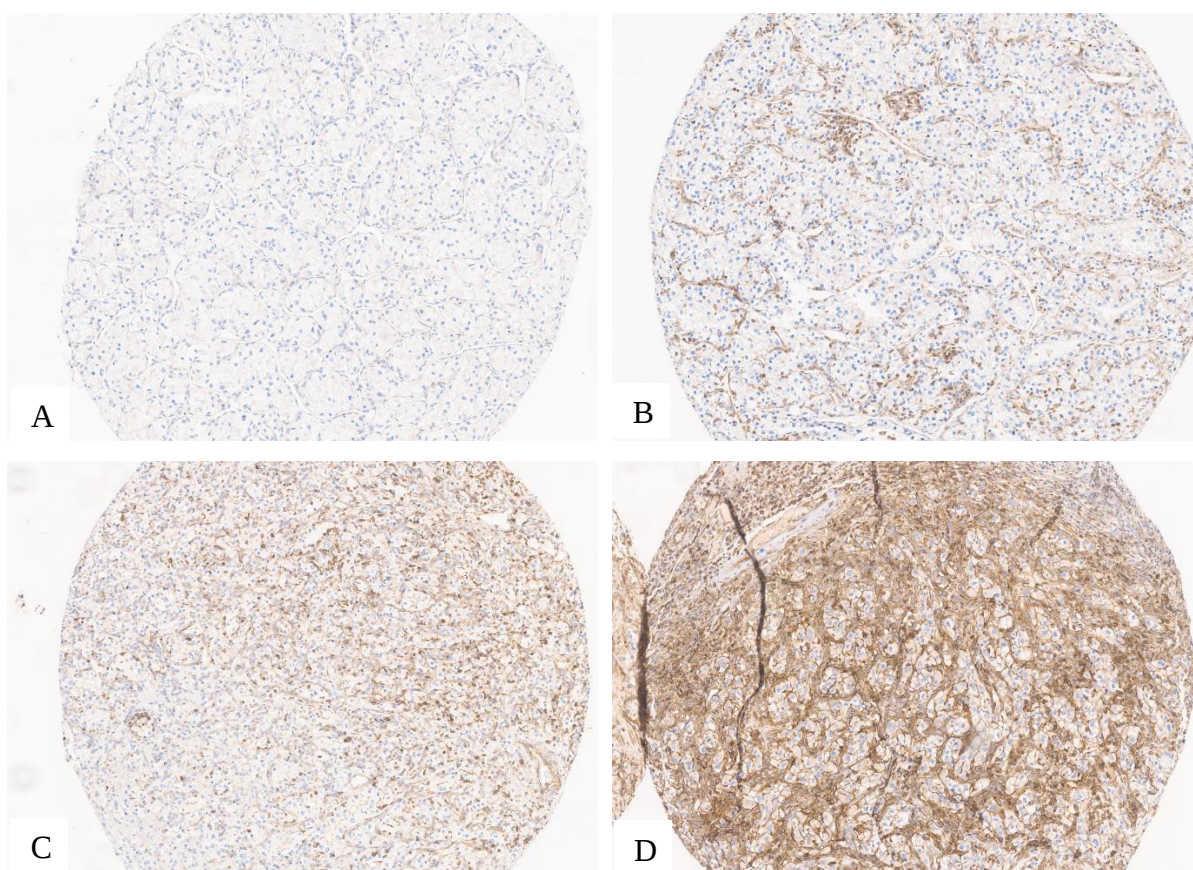
Variável	Categoria	PD-1 negativo	PD-positivo	Valor p
Classificação IMDC	Bom	5 (55,6%)	4 (44,4%)	0,041
	Intermediário	30 (83,3%)	6 (16,7%)	
	Pobre	11 (100%)	0	
KPS > 80	Sim	7 (100%)	0	0,176
	Não	21 (75,0%)	7 (25,0%)	
Anemia	Sim	21 (100)	0	0,006
	Não	23 (71,9%)	9 (28,1%)	
Neutrofilia	Sim	14 (93,3%)	1 (6,7%)	0,232
	Não	28 (80,0%)	7 (20,0%)	
Plaquetose	Sim	7 (100%)	0	0,249
	Não	37 (80,4%)	9 (19,6%)	
Hipercalcemia	Sim	11 (84,6%)	2 (15,4%)	0,538
	Não	30 (88,2%)	4 (11,8%)	
Tempo > 1 ano entre diagnóstico e tratamento	Sim	19 (82,6%)	4 (17,4%)	0,583
	Não	30 (81,1%)	7 (18,9%)	

Legenda: KPS: *Karnofsky Performance Status*. IMDC: *International Metastatic RCC Database Consortium*

4.3 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE PD-L1

Dos 60 pacientes, 98,3% possuíam disponível material histopatológico para a análise de imuno-histoquímica. O marcador PD-L1 foi analisado na membrana celular, a pontuação atribuída reflete a intensidade de marcação. 55 pacientes (93,2%) apresentaram marcação positiva para este marcador, sendo 10 com marcação fraca, 5 com marcação média e 40 com marcação forte. Quatro pacientes apresentaram resultado negativo para este marcador.

A correlação de PD-L1 com as variáveis epidemiológicas e patológicas está descrita na Tabela 10. As seguintes variáveis epidemiológicas/patológicas apresentaram associação estatisticamente significativa com a expressão de PD-L1: estadió N e presença de metástase pulmonar. (Figura 5)



Legenda: A: 0, negativo (< 5 das células positivas); B: 1, fraco (5% a menos de 25% das células); C: 2, moderado (entre 25 e 60% das células); e D: 3, forte (mais de 60% das células).

Figura 5 – Lâminas de IHQ de PD-L1.

Tabela 10 - Variáveis epidemiológicas e patológicas correlacionadas com a expressão de PD-L1 de 60 pacientes com CCRccm

ET de 60 pacientes com CCRCm						
Variável	Categoria	PD-L1 negativo	PD-L1 fraco	PD-L1 moderado	PD-L1 alto	valor p
Gênero	Feminino	3 (21,4%)	2 (14,3%)	2 (14,3%)	7 (50,0%)	0,38
	Masculino	4 (8,9%)	8 (17,8%)	3 (6,7%)	30 (66,7%)	
Nefrectomia	Sim	7 (12,7%)	10 (18,2%)	4 (7,3%)	34 (61,8%)	0,462
	Não	0,0%	0,0%	1 (25%)	3 (75,0%)	
Estadiamento Patológico	T1N0	0	2 (18,2%)	1 (9,1%)	8 (72,7%)	0,622
	T2N0	1 (20,0%)	0	0	4 (80,0%)	
	T3 ou N+	4 (23,5%)	3 (17,6%)	1 (5,9)	9 (52,9%)	
	T4 ou M1			1 (25%)	3 (75,0%)	
Acometimento linfonodal	Negativo	0	5 (19,2%)	0	21 (80,8%)	0,01
	Positivo	2 (25%)	2 (25%)	1 (12,5%)	3 (37,5%)	
ISUP	1	1 (100%)	0	0	0	0,452
	2	0	1 (11,1%)	0	8 (88,9%)	
	3	2 (18,2%)	2 (18,2%)	1 (9,1%)	6 (54,5%)	
	4	1 (14,3%)	1 (14,3%)	0	5 (71,4%)	
Sítios metastáticos						
Pulmonar	Sim	2 (5,6%)	4 (11,1%)	3 (8,3%)	27 (75,0%)	0,027
	Não	5 (23,8%)	6 (28,6%)	2 (9,5%)	8 (38,1%)	
Hepático	Sim	1 (9,1%)	1 (9,1%)	1 (9,1%)	8 (72,7%)	0,942
	Não	6 (12,8%)	9 (19,1%)	4 (8,5%)	28 (59,6%)	
Óssea	Sim	4 (11,8%)	8 (23,5%)	3 (8,8%)	19 (55,9%)	0,549
	Não	3 (13,0%)	2 (8,7%)	2 (8,7%)	16 (69,6%)	
SNC	Sim	2 (14,3%)	2 (14,3%)	0	10 (71,4%)	0,731
	Não	5 (11,4%)	8 (18,2%)	5 (11,4%)	26 (59,1%)	
Intra- abdominal	Sim	2 (16,7%)	2 (16,7%)	2 (16,7%)	6 (50%)	0,546
	Não	5 (10,9%)	8 (17,4%)	3 (6,5%)	30 (65,2%)	
Tecido Mole	Sim	3 (25,0%)	0	2 (16,7%)	7 (58,3%)	0,074
	Não	4 (8,7%)	10 (21,7%)	3 (6,5%)	29 (63,0%)	
Linfonodal	Sim	1 (5%)	2 (10%)	1 (5%)	16 (80%)	0,342
	Não	6 (15,4%)	8 (20,5%)	4 (10,3%)	21 (53,8%)	

Legenda: ISUP: *International Society of Urological Pathology*.

Não houve qualquer variável clínica que apresentou associação estatisticamente significativa com a expressão de PD-L1.

Tabela 11 - Variáveis clínicas correlacionadas com a expressão de PD-L1 de 60 pacientes com CCRccm

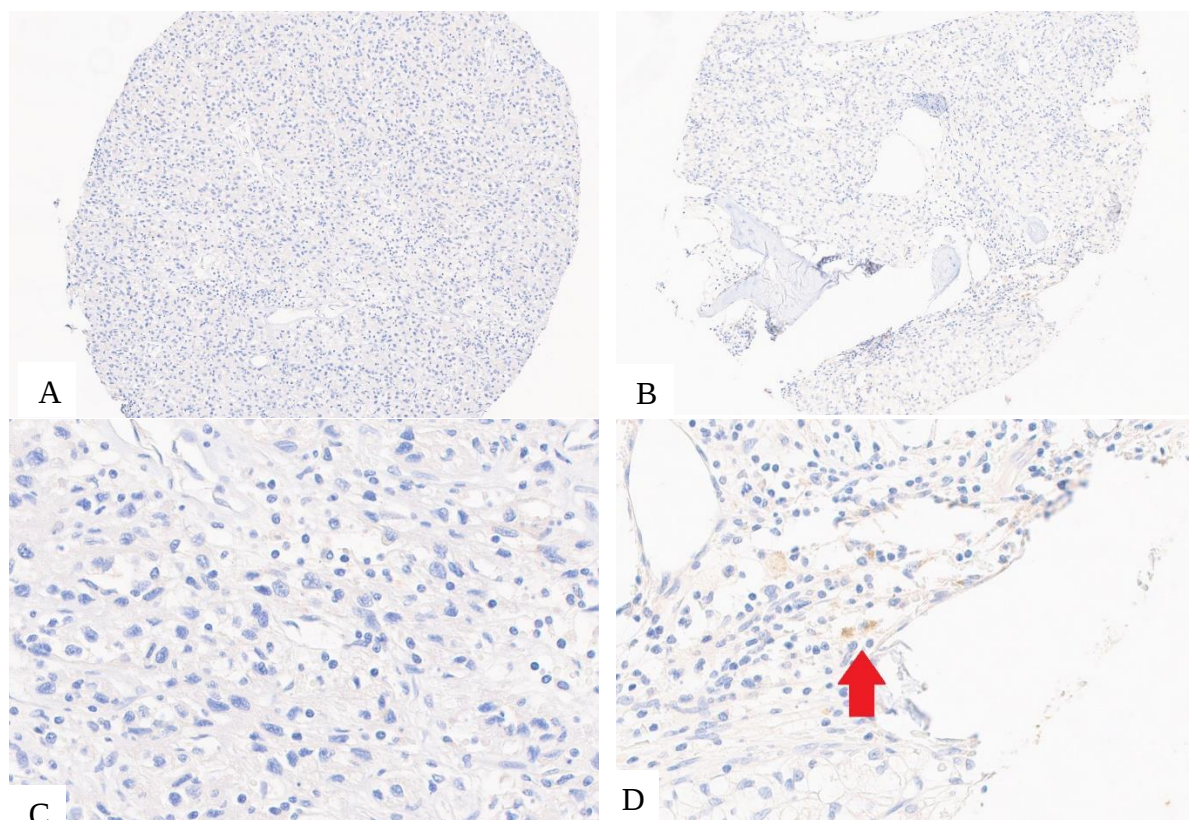
Variável	Categoria	PD-L1 negativo	PD-L1 fraco	PD-L1 moderado	PD-L1 alto	valor p
Classificação IMDC	Bom	1 (11,1%)	2 (22,2%)	1 (11,1%)	5 (55,6%)	0,903
	Intermediário	5 (14,3%)	6 (17,1%)	1 (2,9%)	23 (65,7%)	
	Mau	1 (9,1%)	2 (18,2%)	0	8 (72,7%)	
KPS > 80	Sim	2 (28,6%)	1 (14,3%)	0	4 (57,1%)	0,79
	Não	4 (14,3%)	3 (10,7%)	2 (7,1%)	19 (67,9%)	
Anemia	Sim	4 (19,0%)	3 (14,3%)	0	14 (66,7%)	0,398
	Não	2 (6,5%)	7 (22,6%)	2 (6,5%)	20 (64,5%)	
Neutrofilia	Sim	2 (14,3%)	3 (21,4%)	0	9 (64,3%)	1
	Não	4 (11,4%)	6 (17,1%)	2 (5,7%)	23 (65,7%)	
Plaquetose	Sim	0	2 (28,6%)	0	5 (71,4%)	0,775
	Não	6 (13,3%)	8 (17,8%)	2 (4,4%)	29 (64,4%)	
Hipercalcemia	Sim	1 (7,7%)	2 (15,4%)	1 (7,7%)	9 (69,2%)	0,888
	Não	4 (12,1%)	7 (21,2%)	1 (3,0%)	21 (63,6%)	
Tempo > 1 ano entre diagnóstico e tratamento	Sim	2 (8,7%)	4 (17,4%)	2 (8,7%)	15 (65,2%)	0,969
	Não	5 (13,9%)	6 (16,7%)	3 (8,3%)	22 (61,1%)	

Legenda: KPS: *Karnofsky Performance Status*. IMDC: *International Metastatic RCC Database Consortium*

4.4 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE CTLA-4

Dos 60 pacientes, 96,6% possuíam material disponível histopatológico para a análise de imuno-histoquímica. O marcador CTLA-4 foi analisado na membrana celular do linfócito, apenas 1 paciente (1,72%) apresentou marcação positiva.

A correlação de CTLA-4 com as variáveis epidemiológicas e patológicas está descrita na Tabela 12. Não houve qualquer variável epidemiológica/patológica que apresentou associação estatisticamente significativa com a expressão de CTLA-4. Devido à baixa incidência de marcação positiva para este marcador, não foi possível calcular o p para algumas variáveis. (Figura 6)



Legenda: A: expressão negativa; B: expressão positiva; C: expressão negativa campo de grande aumento (CGA); D: expressão positiva CGA.

Figura 6 – Lâminas de IHQ de CTLA-4.

Tabela 12 - Variáveis epidemiológicas e patológicas correlacionadas com a expressão de CTLA-4 de 60 pacientes com CCRccm

Variável	Categoria	CTLA-4 negativo	CTLA-4 positivo	- Valor p
Gênero	Masculino	13 (100%)	0	0,776
	Feminino	44 (97,8%)	1 (2,2%)	
Nefrectomia	Sim	53 (98,1%)	1 (1,9%)	0,931
	Não	4 (100%)	0	
Estadiamento Patológico	T1N0	11 (100%)	0	-
	T2N0	5 (100%)	0	
	T3 ou N+	16 (100%)	0	
	T4 ou M1	4 (100%)	0	
ISUP	1	1 (100%)	0	-
	2	9 (100%)	0	
	3	10 (100%)	0	
	4	7 (100%)	0	
Sítios metastáticos Pulmonar	Sim	35 (100%)	0	0,375
	Não	20 (95,2%)	1 (4,8%)	
Hepático	Sim	11 (100%)	0	0,807
	Não	45 (97,8%)	1 (2,2%)	
Óssea	Sim	32 (97,0%)	1 (3,0%)	0,589
	Não	23 (100%)	0	
SNC	Sim	14 (100%)	0	0,754
	Não	42 (97,7%)	1 (2,3%)	
Intra-abdominal	Sim	12 (100%)	0	0,789
	Não	44 (97,8%)	1 (2,2%)	
Tecido Mole	Sim	12 (100%)	0	0,789
	Não	44 (97,8%)	1 (2,2%)	
Linfonodal	Sim	20 (100%)	0	0,665
	Não	37 (97,4%)	1 (2,6%)	

Legenda: ISUP: *International Society of Urological Pathology*.

Não houve qualquer variável clínica que apresentou associação estatisticamente significativa com a expressão de CTLA-4. Devido à baixa incidência de marcação positiva para este marcador, não foi possível calcular o p para algumas variáveis.

Tabela 13 - Variáveis clínicas correlacionadas com a expressão de PD-L1 de 60 pacientes com CCRccm

Variável	Categoria	CTLA-4 negativo	CTLA-4 positivo	Valor p
Classificação IMDC	Bom	9 (100%)	0	0,37
	Intermediário	34 (100%)	0	
	Mau	10 (90,9%)	1 (9,1%)	
KPS > 80	Sim	7 (100%)	0	-
	Não	27 (100%)	0	
Anemia	Sim	20 (95,2%)	1 (4,8%)	-
	Não	30 (100%)	0	
Neutrofilia	Sim	13 (92,9%)	1 (7,1%)	-
	Não	34 (100%)	0	
Plaquetose	Sim	7 (100%)	0	-
	Não	43 (97,7%)	1 (2,3%)	
Hipercalcemia	Sim	13 (100%)	0	0,711
	Não	31 (96,9%)	1 (3,1%)	
Tempo > 1 ano entre diagnóstico e tratamento	Sim	21 (95,5%)	1 (4,5%)	0,379
	Não	36 (100%)	0	

Legenda: KPS: *Karnofsky Performance Status*. IMDC: *International Metastatic RCC Database Consortium*

4.5 ANÁLISE DE SOBREVIDA

Durante o acompanhamento ocorreram 24 mortes, com tempo mediano de acompanhamento de 74,2 meses e sobrevida global mediana de 45,3 meses (4,30 - 162,90 meses). A mediana da primeira sobrevida livre de progressão foi de 12,6 meses (0,4 – 73,2 meses).

A investigação da análise univariada de variáveis clínicas e sobrevida global é apresentada na Tabela 14. Considerando as variáveis epidemiológicas e patológicas, para a análise de sobrevida global, a ausência de nefrectomia, existência de metástase óssea e metástase em tecido mole conferiram um prognóstico ruim aos pacientes analisados. Com relação a análise de sobrevida livre de progressão as variáveis grau ISUP e metástase em tecido mole conferiram um pior prognóstico aos pacientes analisados.

Com relação as variáveis clínicas, para a análise de sobrevida global, os pacientes que apresentaram KPS < 80 apresentaram prognóstico pior. Com relação a análise de sobrevida livre de progressão, os pacientes que apresentaram as variáveis de KPS < 80 e hipercalcemia apresentaram um pior prognóstico.

Tabela 14 - Modelo de risco de Cox simples das variáveis epidemiológicas e patológicas com sobrevida global e sobrevida livre de progressão

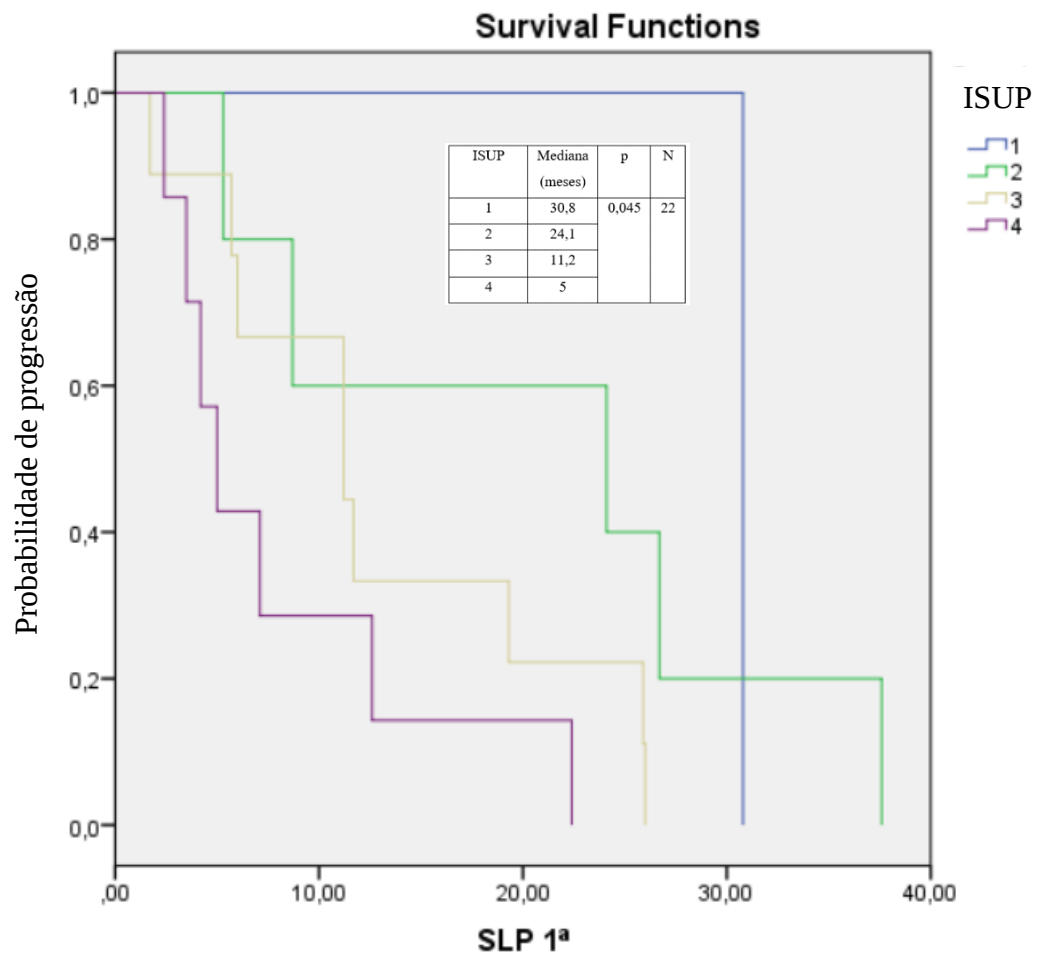
Variável	Categoria	SLP mediana	Valor p	SG mediana	Valor p
Gênero	Masculino	12,6	0,209	79,7	0,486
	Feminino	11,7		NA	
Nefrectomia	Sim	12,6	0,058	80,7	0,034
	Não	3,2		13,1	
Estadiamento Patológico	T1N0	7,7	0,26	43,9	0,164
	T2N0	11,2		81,8	
	T3 ou N+	16,2		na	
	T4 ou M1	5		na	
N	Positivo	11,7	0,334	NA	0,838
	Negativo	16,2		73,9	
ISUP	1	30,8	0,045	NA	0,58
	2	24,1		75,7	
	3	11,2		81,9	
	4	5		65,3	
Sítios metastáticos Pulmonar	Sim	12,6	0,434	73,9	0,358
	Não	11,7		97	
Hepático	Sim	11,7	0,327	NA	0,742
	Não	17		79,7	
Óssea	Sim	11,2	0,978	65,7	0,013
	Não	12,2		NA	
SNC	Sim	11,7	0,172	50,8	0,935
	Não	16,2		81,8	
Intra-abdominal	Sim	12,6	0,795	97	0,951
	Não	11,7		81,8	
Tecido Mole	Sim	4,9	0,008	26,2	0,019
	Não	16,2		81,8	
Linfonodal	Sim	11,1	0,5	65,7	0,237
	Não	17,5		81,8	

Legenda: ISUP: *International Society of Urological Pathology*.

Tabela 15 - Modelo de risco de Cox simples das variáveis clínicas com sobrevida global e sobrevida livre de progressão

Variável	Categoria	SLP mediana	Valor p	SG	
				mediana	Valor p
Classificação IMDC	Bom	49,1	0,204	97	0,178
	Intermediário	21,3		81,8	
	Mau	34,6		50,8	
KPS < 80	Sim	5,7	0,05	8,7	0,009
	Não	12,6		81,8	
Anemia	Sim	16,2	0,79	65,7	0,247
	Não	16,2		NA	
Neutrofilia	Sim	11,1	0,94	NA	0,525
	Não	17		79,7	
Plaquetose	Sim	22,4	0,919	na	0,907
	Não	16,2		79,7	
Hipercalcemia	Sim	8,7	0,042	73,9	0,454
	Não	19,3		81,8	
Tempo > 1 ano entre diagnóstico e tratamento	Sim	12,2	0,755	81,8	0,708
	Não	12,6		79,7	

Legenda: KPS: *Karnofsky Performance Status*. IMDC: *International Metastatic RCC Database Consortium*



Legenda: ISUP: *International Society of Urological Pathology*

Figura 7 - Curvas de sobrevida livre de progressão analisando os pacientes de acordo com seu grau ISUP ($p=0,045$).

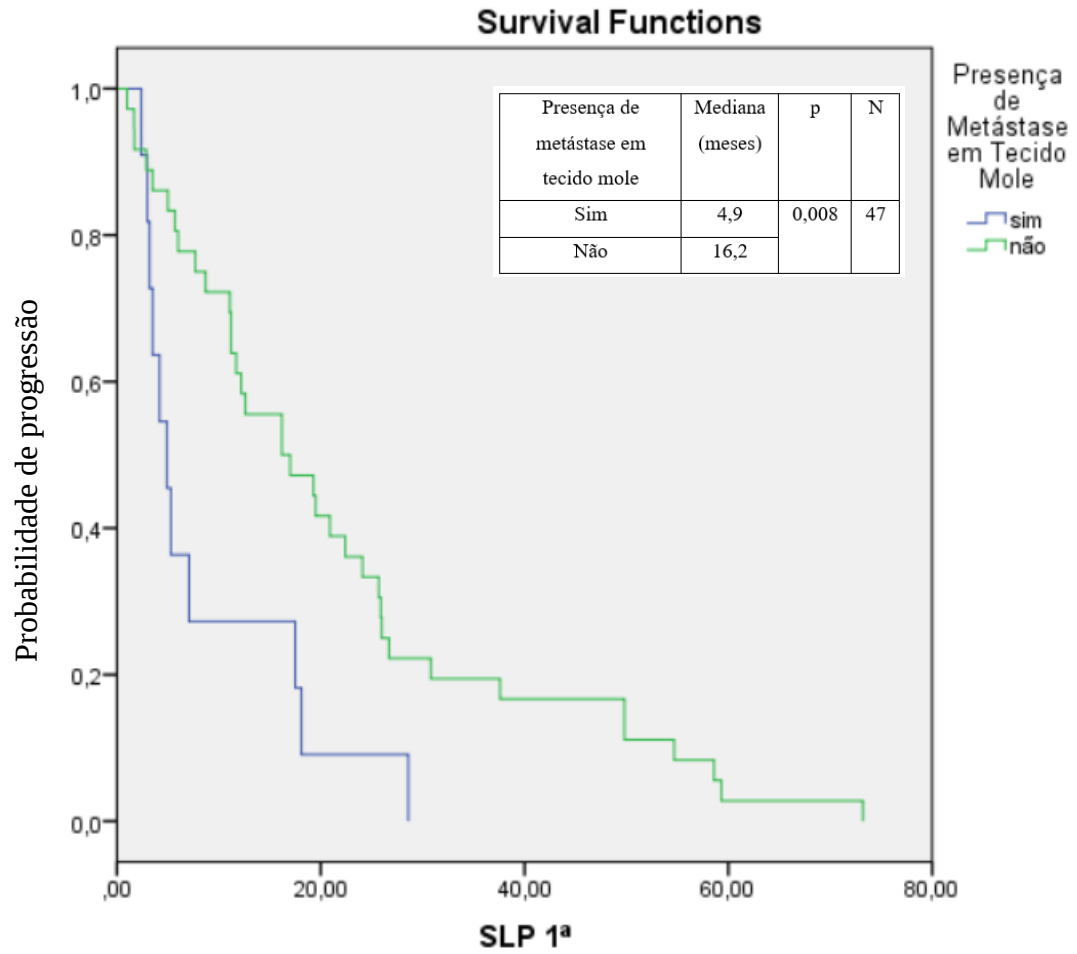
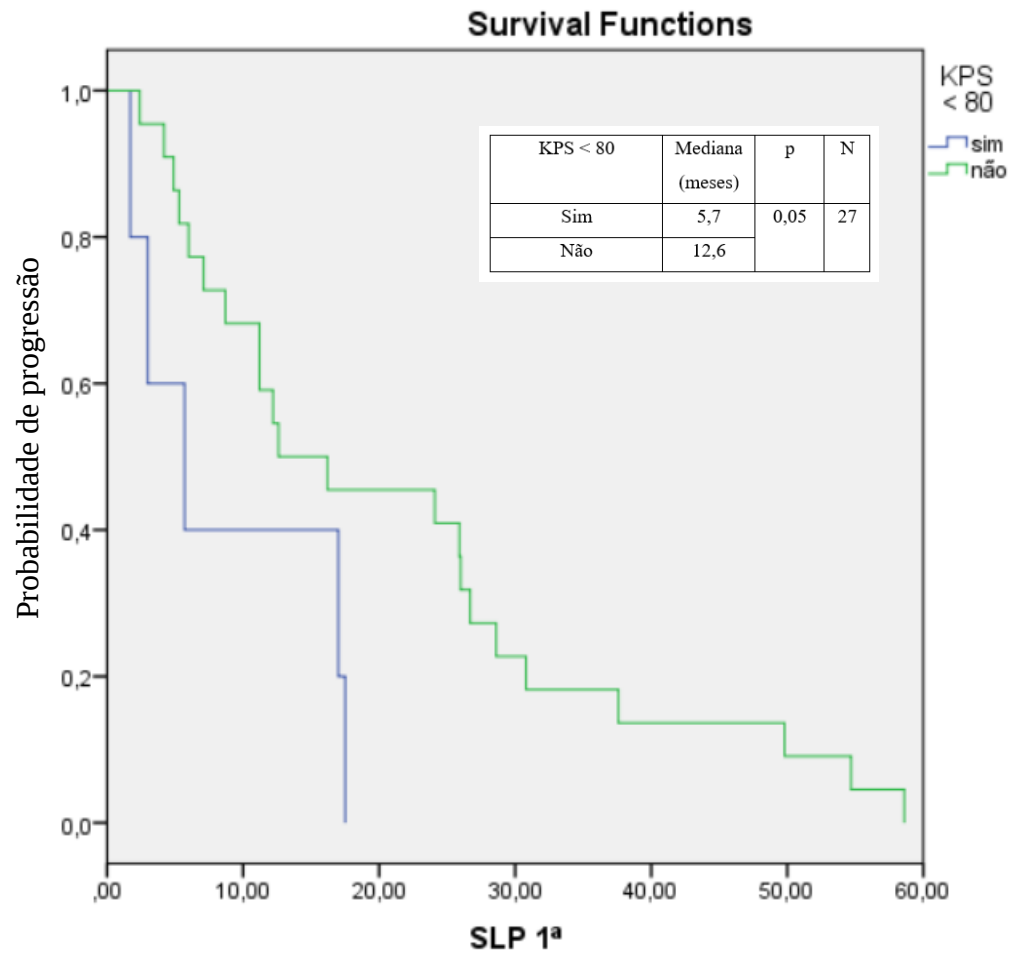


Figura 8 - Curvas de sobrevida livre de progressão analisando os pacientes de acordo com a presença de metástase em tecido mole ($p=0,008$).



Legenda: KPS: *Karnofsky Performance Status*.

Figura 9 - Curvas de sobrevida livre de progressão analisando os pacientes com KPS < 80 (p=0,05).

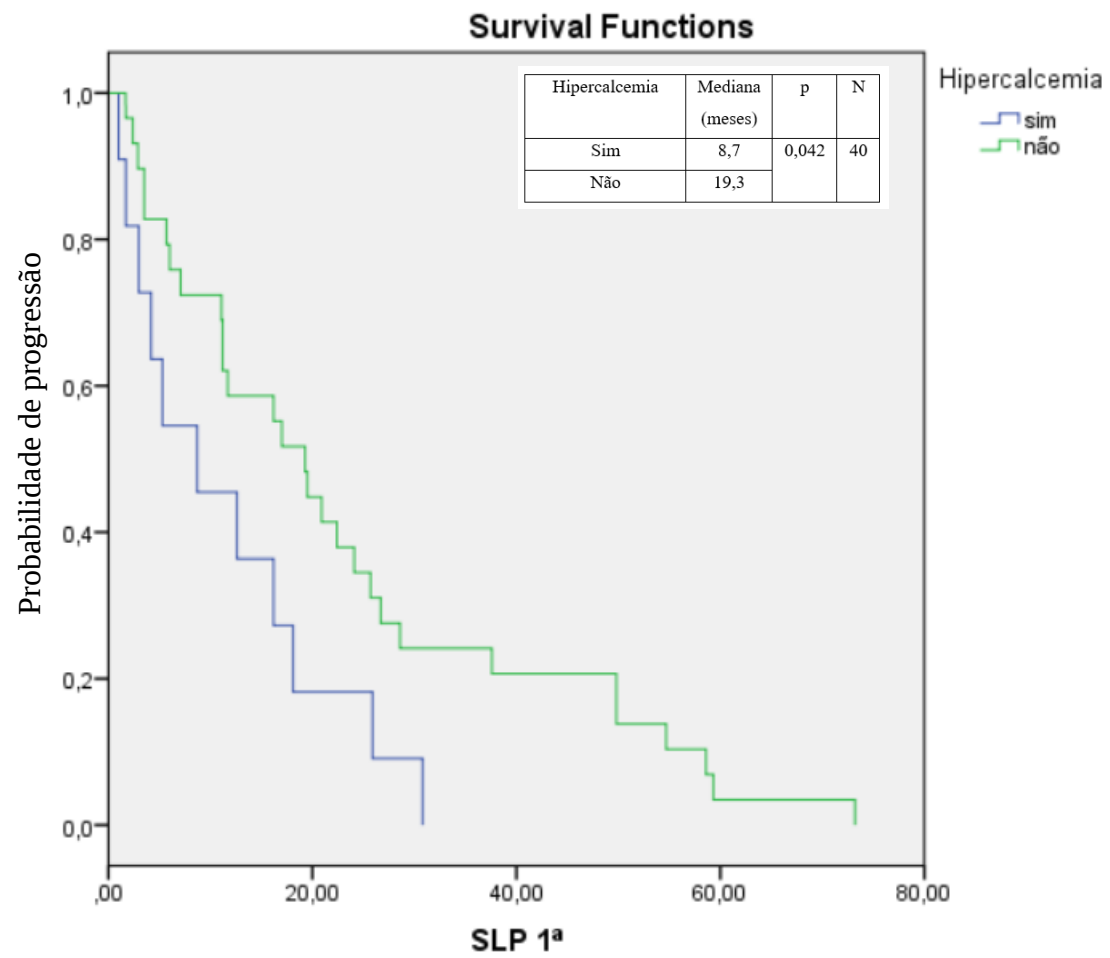


Figura 10 - Curvas de sobrevida livre de progressão analisando os pacientes com hipercalcemia ($p=0,042$).

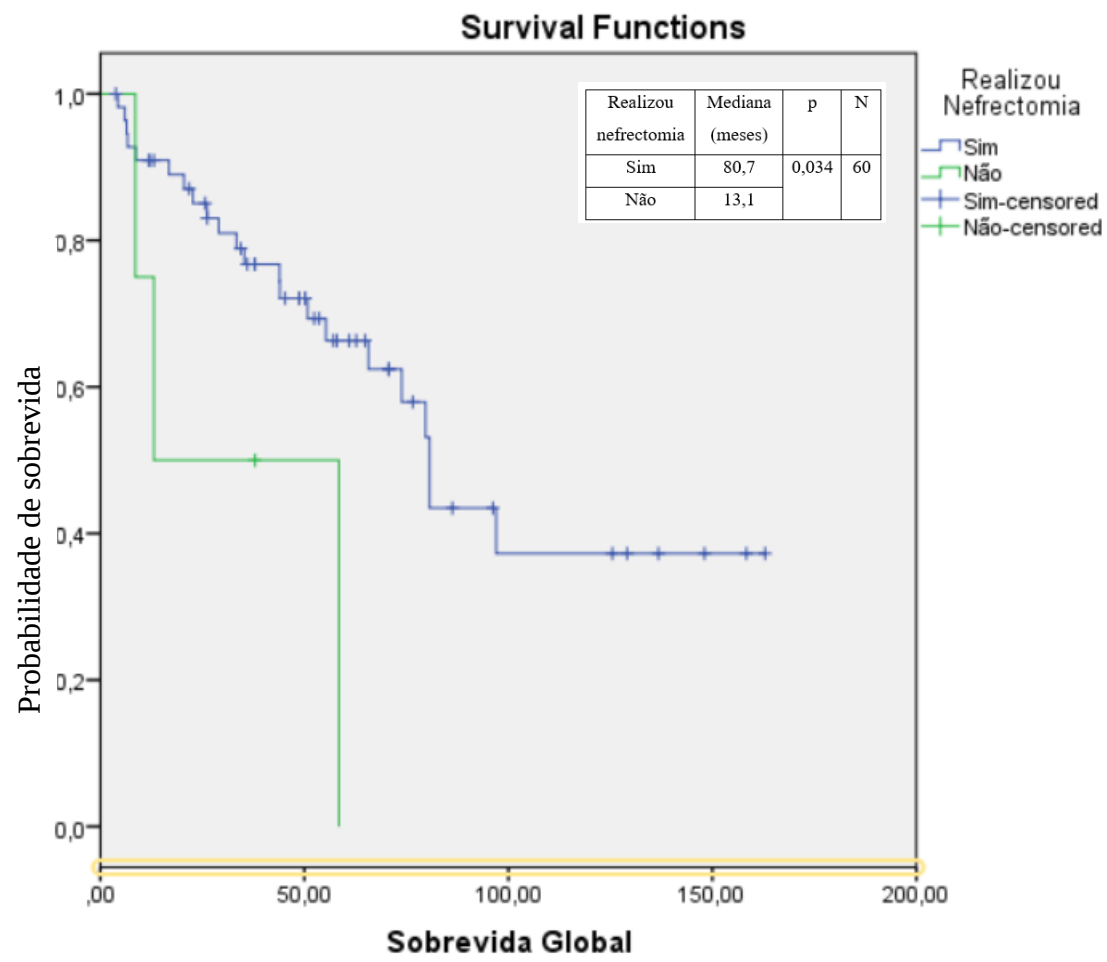


Figura 11 - Curvas de sobrevida global analisando a variável de realização ou não de nefrectomia ($p=0,034$).

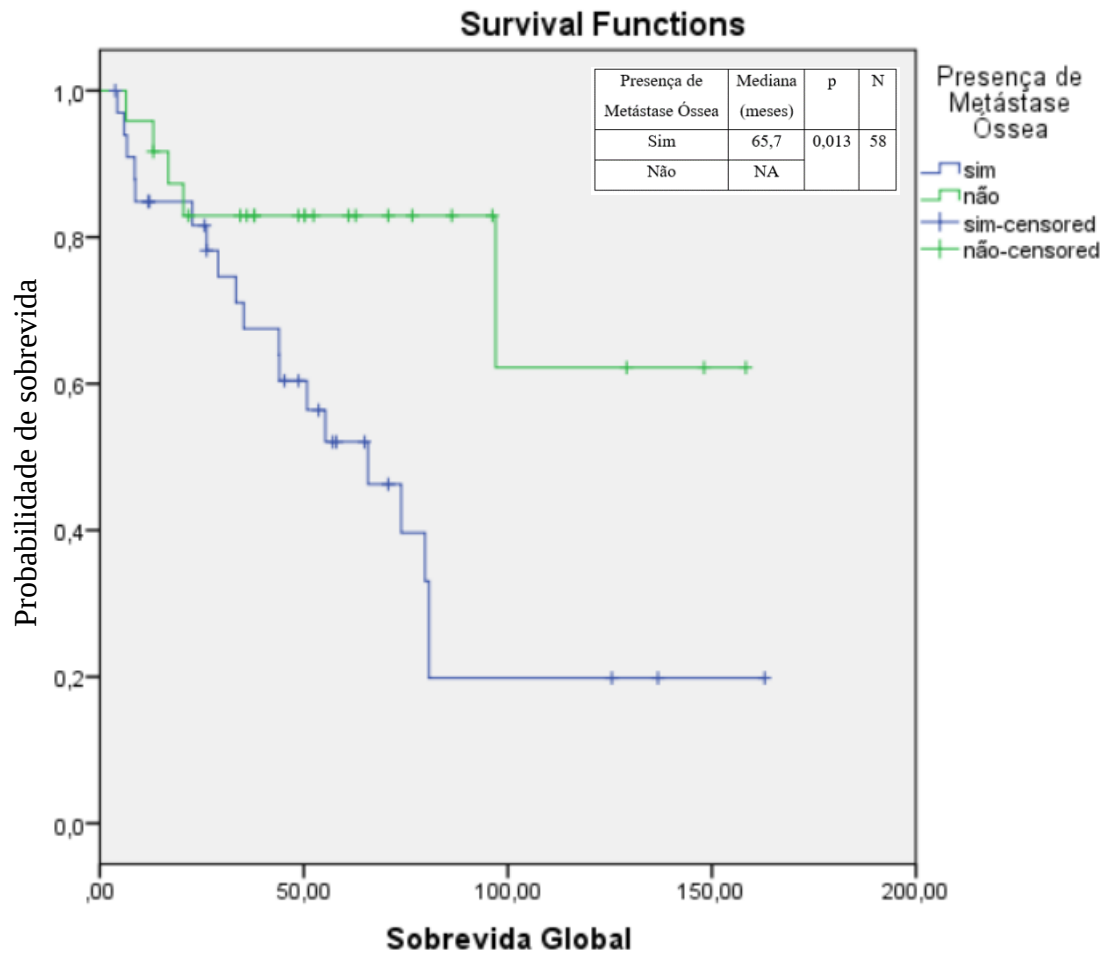


Figura 12 - Curvas de sobrevida global analisando a presença de metástase óssea (p=0,013).

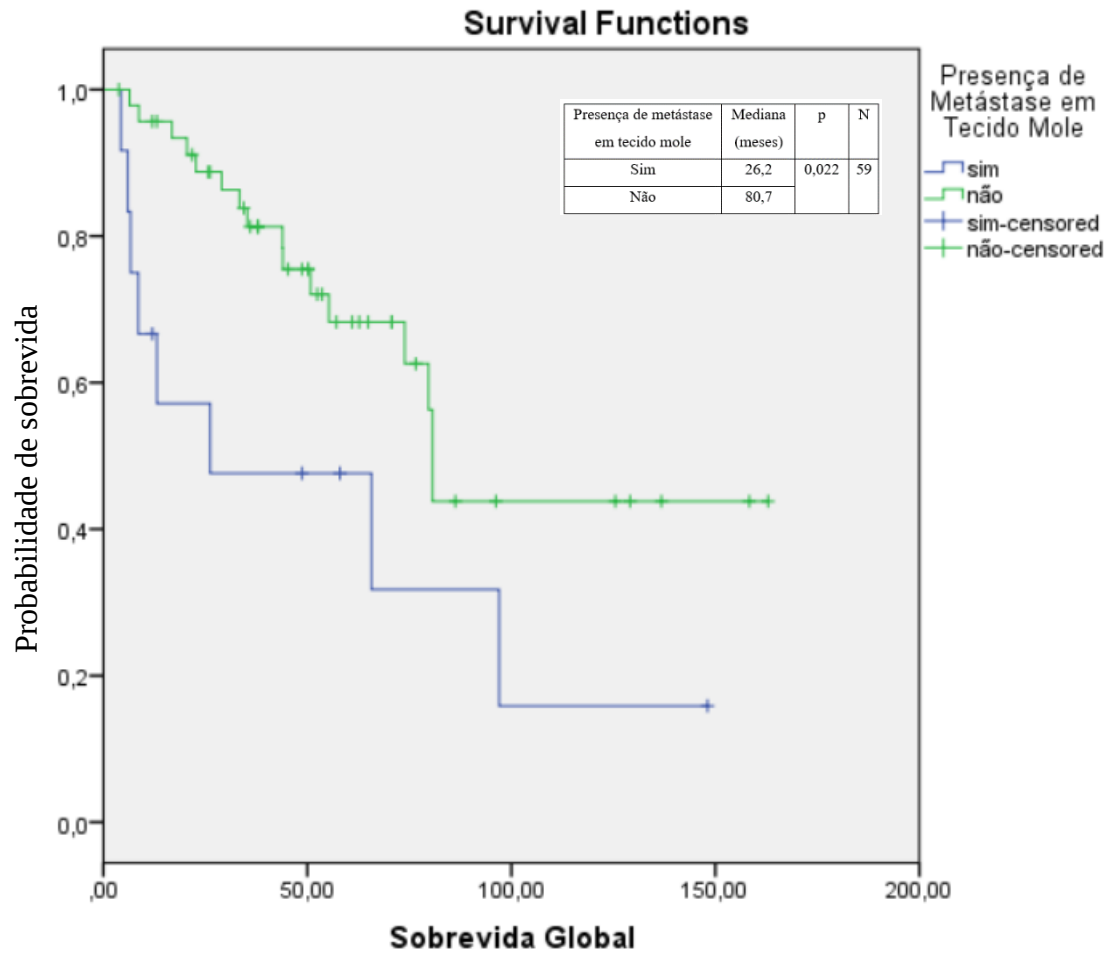
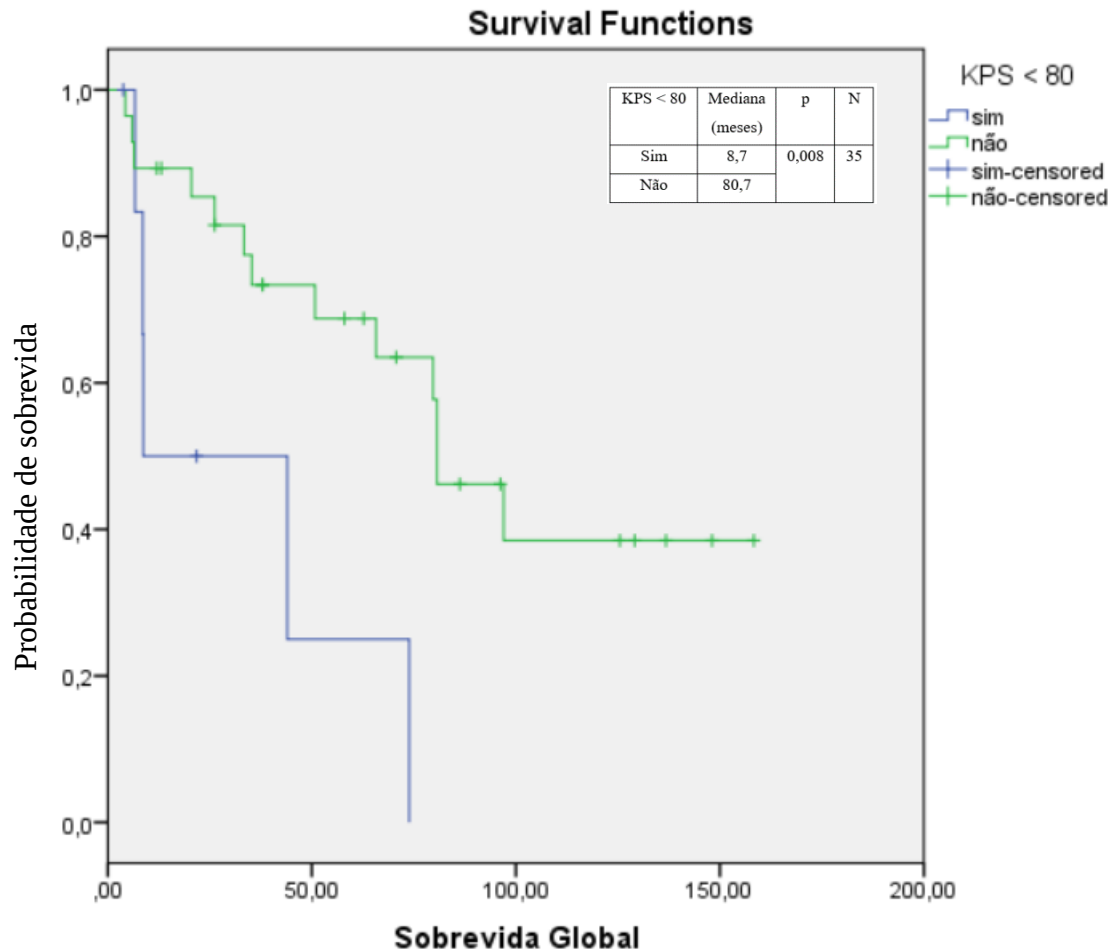


Figura 13 - Curvas de sobrevida global analisando a presença de metástase em tecido mole ($p=0,022$).



Legenda: KPS: *Karnofsky Performance Score*

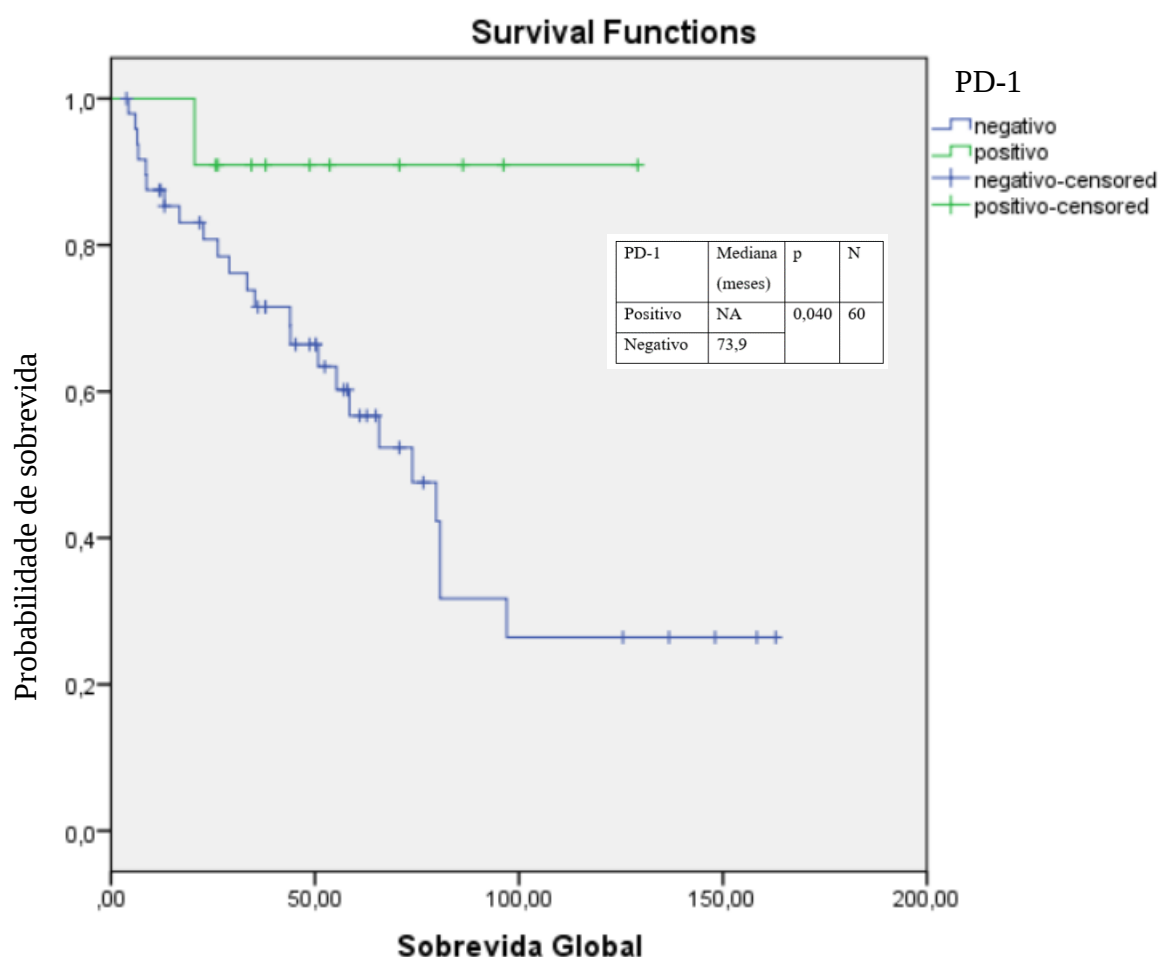
Figura 14 - Curvas de sobrevida global analisando os pacientes com KPS < 80 ($p=0,008$).

A análise do modelo univariado das variáveis moleculares e SG e SLP está apresentada na Tabela 16. Foi observado significância estatística para o marcador molecular PD-1 para a análise de sobrevida global. (Figura 15).

Tabela 16 - Modelo de risco de univariado das variáveis moleculares com SG e SLP

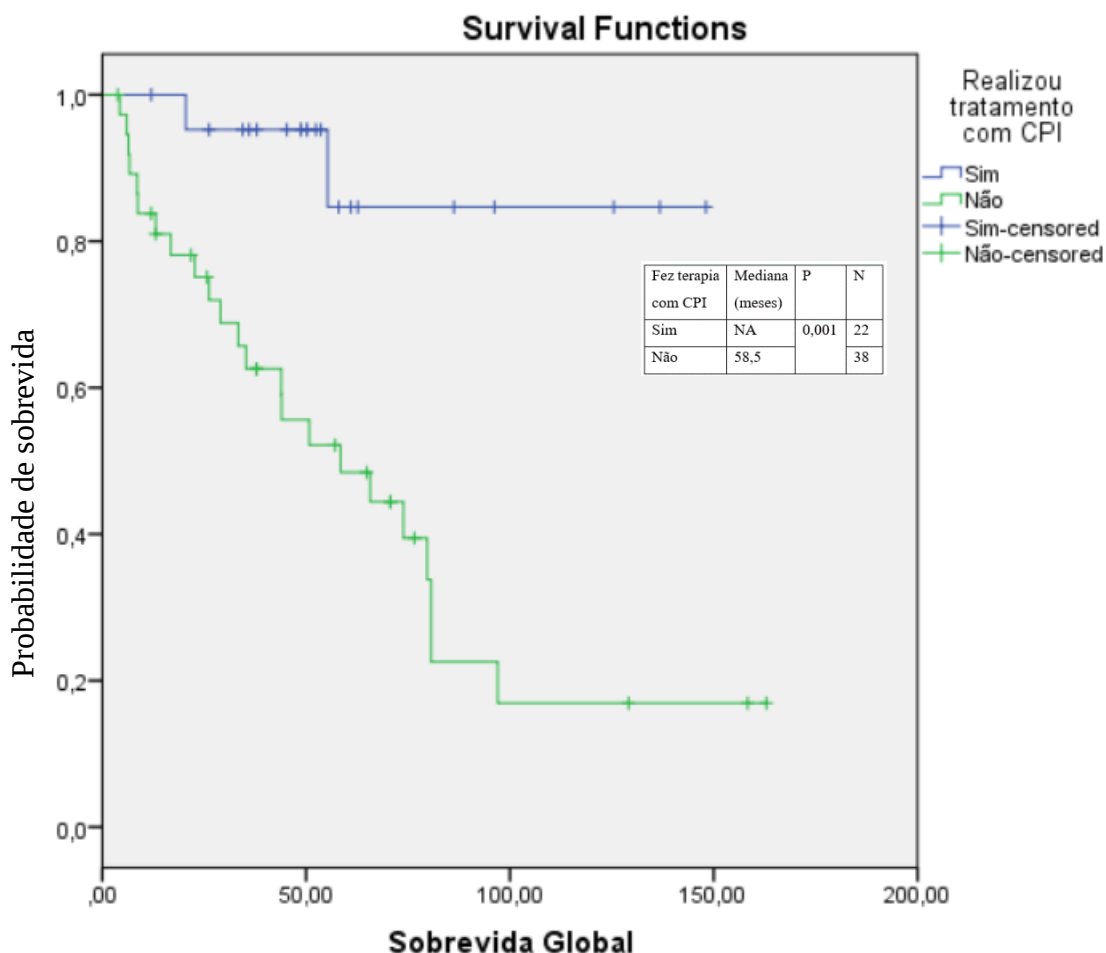
Variável	Categoria	SG	Valor p	SLP	Valor p
		mediana		mediana	
PD-1	Negativo	73,9	0,044	11,2	0,68
	Positivo	NA		20,9	
PD-L1	Negativo	97,0	0,619	4,9	0,631
	Fraco	NA		19,5	
	Moderado	43,9		7,7	
	Forte	81,8		3,5	
CTLA-4	Negativo	80,7	0,478	12,6	0,04
	Positivo	NA		73,2	

Legenda: SG: sobrevida global. SLP: sobrevida livre de progressão.

**Figura 15** - Curvas de sobrevida global analisando os pacientes conforme a expressão do biomarcador PD-1 ($p=0,044$).

Para se considerar o impacto que os CPI possam ter ocasionado na coorte de pacientes, foi realizada uma análise de sobrevida global, não prevista inicialmente, comparando um grupo

de pacientes que haviam recebido terapia com CPI em qualquer momento de sua jornada versus pacientes que não tinham recebido terapia com CPI. A seguinte curva de SG foi encontrada, conforme Figura 16.



Legenda: CPI: *checkpoint inhibitors*.

Figura 16 - Curvas de sobrevida global analisando os pacientes conforme uso de CPI (p=0,001).

4.5.1 Análise de Cox múltiplo

Para realizar a análise multivariada para SLP foram selecionadas as variáveis de maior interesse clínico. O número de eventos para sobrevida livre de progressão foi 27, desta maneira foram selecionadas as 4 seguintes variáveis: grau ISUP, hipercalcemia, presença de metástase em tecido mole e KPS < 80.

Após a análise do modelo de Cox múltiplo para sobrevida livre de progressão as variáveis presença de metástase em tecido mole (RR = 24,161, IC 95%: 2,588 – 225,536) e

KPS < 80 (RR = 40,905, IC 95%: 2,983 – 560,945) foram confirmadas como variáveis de significância estatística independentes para risco de progressão.

Tabela 17. Modelo de risco de Cox múltiplo das variáveis com SLP

Variável	RR	IC 95%	p
ISUP	0,454	0,080 - 2,563	0,458
Hipercalcemia	1,283	0,650 - 2,533	0,473
Meta Tec Mole	24,161	2,588 - 225,536	0,005
KPS < 80	40,905	2,983 - 560,945	0,005

Legenda: KPS: Karnofsky performance status. RR: razão de risco. IC: intervalo de confiança.

Para realizar a análise multivariada para SG foram selecionadas as variáveis de maior interesse clínico. O número de eventos para sobrevida global foi 24, desta maneira foram selecionadas as 4 seguintes variáveis: KPS < 80, presença de metástase óssea, presença de metástase em tecido mole e expressão de PD-1.

Após a análise do modelo de Cox múltiplo para sobrevida global as variáveis presença de metástase óssea (RR = 5,036, IC 95%: 1,303 – 19,464) e presença de metástase em tecido mole (RR = 3,317, IC 95%: 1,174 – 9,371) foram confirmadas como variáveis de significância estatística independentes para risco de óbito.

Tabela 18 - Modelo de risco de Cox múltiplo das variáveis com SG

Variável	RR	IC 95%	p
KPS < 80	3,173	0,985 - 10,221	0,053
Meta Óssea	5,037	1,303 - 19,464	0,019
Meta Tec Mole	3,317	1,174 - 9,371	0,024
PD-1	0,955	0,087 - 10,508	0,97

Legenda: KPS: Karnofsky performance status. RR: razão de risco. IC: intervalo de confiança.

5. DISCUSSÃO

Dentre as neoplasias genitourinárias, o CCR é o de maior mortalidade, com sobrevida global de aproximadamente 76% ¹¹¹. A incidência e mortalidade global do CCR aumentou na última década, com mais de 400.000 novos casos diagnosticados anualmente e 140.000 mortes. No entanto, a taxa de mortalidade varia entre os países devido às disparidades nos ambientes médicos, como a disponibilidade de exames de imagem frequentes e tratamentos oncológicos sistêmicos eficazes ¹¹². Embora com avanços proporcionados por terapias alvo, como os inibidores de tirosina quinase, inibidores de fator de crescimento endotelial vascular e finalmente com a imunoterapia (CPI), a cura dos pacientes com CCRm ainda é uma promessa distante, além dos custos das novas terapias que tem trazido limitações de acesso e no número de pacientes que possam se beneficiar destes tratamentos, de tal sorte que encontrar biomarcadores que possam selecionar melhor os pacientes representam um objetivo não somente biológico, como financeiro, tornando-se um dos maiores desafios da atualidade.

Células cancerígenas altamente imunogênicas podem evitar a destruição imunológica desativando componentes do sistema imunológico que foram enviados para eliminá-las. Por exemplo, as células cancerosas podem paralisar linfócitos T citotóxicos infiltrantes e células NK, secretando TGF- β ou outros fatores imunossupressores. Mecanismos mais sutis operam através do recrutamento de células inflamatórias que são ativamente imunossupressoras, incluindo células T reguladoras e células supressoras derivadas de mieloides. Ambos podem suprimir as ações dos linfócitos citotóxicos ¹¹³.

Quase todos os cânceres renais estão associados à disfunção imunológica. Entre estes, o carcinoma de células renais (CCR) representa aproximadamente 2% das neoplasias malignas que afetam adultos e por 90-95% de todos os cânceres renais. Evidências recentes têm colaborado para elucidar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento desta doença. Nessa visão, a migração disfuncional de neutrófilos, bem como o *cross talk* de linfócitos T células dendríticas (T-DC) (células dendríticas), maturação de células dendríticas, metabolismo de células imunes e reatividade e expressão anormal de citocinas e quimiocinas e seus receptores têm sido destacados no CCR e nas células do estroma. O desenvolvimento racional de novas terapias para recuperar a atividade antitumoral do sistema imunológico está intimamente relacionado ao entendimento das complexas interações entre o sistema imunológico e o tumor. Nos últimos anos algumas percepções foram alcançadas e moléculas imunomoduladoras, como

interleucina-2 (IL-2) e IFN- α , inibidores de *checkpoint* imunológico e antagonistas de quimiocinas, mostraram eficácia clínica ¹¹⁴.

Independentemente da categoria, os tumores renais têm sido associados às disfunções imunológicas. Os CCRs são ricos em infiltrados imunes constituídos por células T, *natural killer* (NK), células dendríticas, macrófagos entre outros. No entanto, RCC e alguns tipos de células imunes infiltrantes de tumor, como células supressoras derivadas de mieloides, presentes no microambiente tumoral podem suprimir a resposta antitumoral de células T mediadas pela expressão do ligante-1 de morte programada (PD-L1, também conhecido como B7-H1 ou CD274) ¹⁰². O PD-L1 se liga ao PD-1 presente na superfície celular das células T ativadas, levando ao bloqueio da proliferação, resposta disfuncional e morte das células T. O CTLA-4, um receptor presente nas células T efetoras ativadas, é a molécula inibitória mais bem estudada, especialmente no processo de apresentação de antígeno aos linfócitos, onde é conhecida por sua capacidade de bloquear respostas imunes mediadas por células T ¹¹⁵. CTLA-4 compete com CD28 pela ligação de CD80 ou CD86. Quando ocorre a interação CTLA-4/CD80 ou CD86, a célula torna-se anérgica e morre. A superexpressão de CTLA-4 está envolvida em várias doenças neoplásicas, inflamatórias e autoimunes. A inibição da resposta T permite que o CCR evite efetores do controle imunológico e facilite a invasão e a metástase. Assim, a super expressão de PD-L1 está relacionada a pior prognóstico para CCR metastático e, portanto, é um alvo importante para a descoberta de medicamentos ¹¹⁶.

Apesar dos grandes avanços no tratamento sistêmico com as terapias anti-VGFR e os CPI, os pacientes com doença metastáticas ainda são tratados da mesma forma. Há apenas fatores clínicos e laboratoriais prognósticos, mas não preditivos ou selecionadores de terapias, como já existem em outros tumores. A busca de biomarcadores falhou em todos os estudos de fase III que ditam as terapias atuais, representando uma área de grande desafio no tratamento dos CCRm. E o entendimento da heterogeneidade não somente intratumoral no tumor primário, como também nas metástases, tornam este desafio ainda maior. Poucos estudos buscaram biomarcadores nas metástases, até pelas dificuldade técnicas de se ter este material, de forma que o presente estudo teve como objetivo explorar e esclarecer melhor os papéis do marcadores PD1, PD-L1 e CTLA-4 neste cenário de doença.

O valor prognóstico de PD-1 foi analisado em células tumorais colorretais do seu infiltrado tumoral (tumor primário). A análise de Kaplan-Meier indicou que expressões de PD-1 mais altas se correlacionaram com melhor SG ($p = 0,002$, respectivamente). As análises de subgrupo mostraram que a expressão de PD-1 em células infiltrantes tumorais foi um fator prognóstico independente para SG e SLD em pacientes com células tumorais colorretais. Os

autores concluíram que expressões mais elevadas de PD-1 correlacionam-se com melhor prognóstico de pacientes com células tumorais colorretais ¹¹⁷.

Para CCRccm, não há a descrição em literatura sobre a perda de expressão de PD-1 em tecido metastático e seu impacto na SG. De acordo com o nosso estudo, os pacientes sem a expressão de PD-1 em tecido metastático tiveram um pior prognóstico quando comparado aos pacientes com a expressão de PD-1. Uma hipótese para este resultado é o impacto positivo que o tratamento com CPI pode ter gerado em pacientes com expressão de PD-1. Onze pacientes expressaram positivamente PD-1, sendo que 7 deles utilizaram CPI como terapia sistêmica em qualquer momento de sua jornada. Realizamos uma análise comparando pacientes que havia realizado tratamento com CPI em qualquer momento da sua jornada, versus pacientes que não haviam realizado tratamento com CPI. Os pacientes que realizaram CPI tiveram sobrevida global superior, com significância estatística. A mediana para o grupo que realizou CPI não foi atingida, enquanto a mediana do grupo que não havia realizado CPI foi de 58,5 meses. Apesar de haver alguns vieses nessa análise, por exemplo, os pacientes que realizaram terapia com CPI foram incluídos no estudo tardiamente, porém esta análise de sobrevida pode ser uma hipótese para os pacientes com expressão de PD-1 terem uma sobrevida maior que os pacientes que perderam a expressão de PD-1, considerando que 64% dos pacientes com expressão de PD-1 realizaram tratamento com CPI. Enquanto apenas 37% da amostra total foi tratada com CPI.

Considerando o biomarcador PD-L1 temos a seguinte distribuição de expressão e uso de CPI durante a jornada de tratamento sistêmico do CCRccm. Vinte e nove por cento (29%) dos pacientes com ausência de expressão de PD-L1 utilizaram CPI, 20% dos pacientes com expressão fraca de PD-L1 utilizaram CPI, 20% dos pacientes com expressão moderada utilizaram CPI e 43% dos pacientes com expressão forte utilizaram CPI. Infelizmente o grupo que utilizou CPI em qualquer fase do tratamento durante a jornada de tratamento sistêmico do CCRccm foi pequeno, com apenas 22 pacientes, sendo assim qualquer análise deste grupo para qualquer expressão de biomarcador ficou muito limitada, não sendo possível chegar em conclusões adicionais.

Os tumores que super expressaram o biomarcador PD-L1, em material de tumor primário, no início do estudo foram associados a uma melhor RR e SLP com nivolumabe mais ipilimumabe do que sunitinibe (SLP, RR: 0,48 IC 95%: 0,28-0,82). Portanto, o biomarcador PD-L1 parece preditivo para SLP. No entanto, devido à natureza exploratória deste trabalho, a significância não pode ser traçada. Os principais diretrizes atualmente não recomendam a seleção de pacientes para o tratamento com base no resultados de imuno-histoquímica do biomarcador PD-L1 ¹¹⁸.

Não há descrição em literatura científica qual é o impacto prognóstico do biomarcador PD-L1 em tecido metastático de pacientes com CCRccm. Como já descrito na introdução deste trabalho, Jilaveanu analisou a expressão de PD-L1 em pares de amostras de nefrectomia e sítios metastáticos, a expressão do biomarcador foi maior em amostras de tecido metastático versus o tumor primário, sugerindo que a expressão de PD-L1 no tumor primário não pode selecionar pacientes para o uso de CPI. Através da nossa análise, o resultado encontrado de expressão de PD-L1 não demonstrou impacto prognóstico em SG, assim como ocorre para amostras de tumor primário de CCRccm, como descrito por diversos autores. Desta maneira o marcador PD-L1, em amostras de tecido metastático, também demonstrou um fraco papel prognóstico na SLP e SG. Este estudo demonstrou que a expressão de PD-1 é um indicador de prognóstico ruim para SG em pacientes com CCRccm.

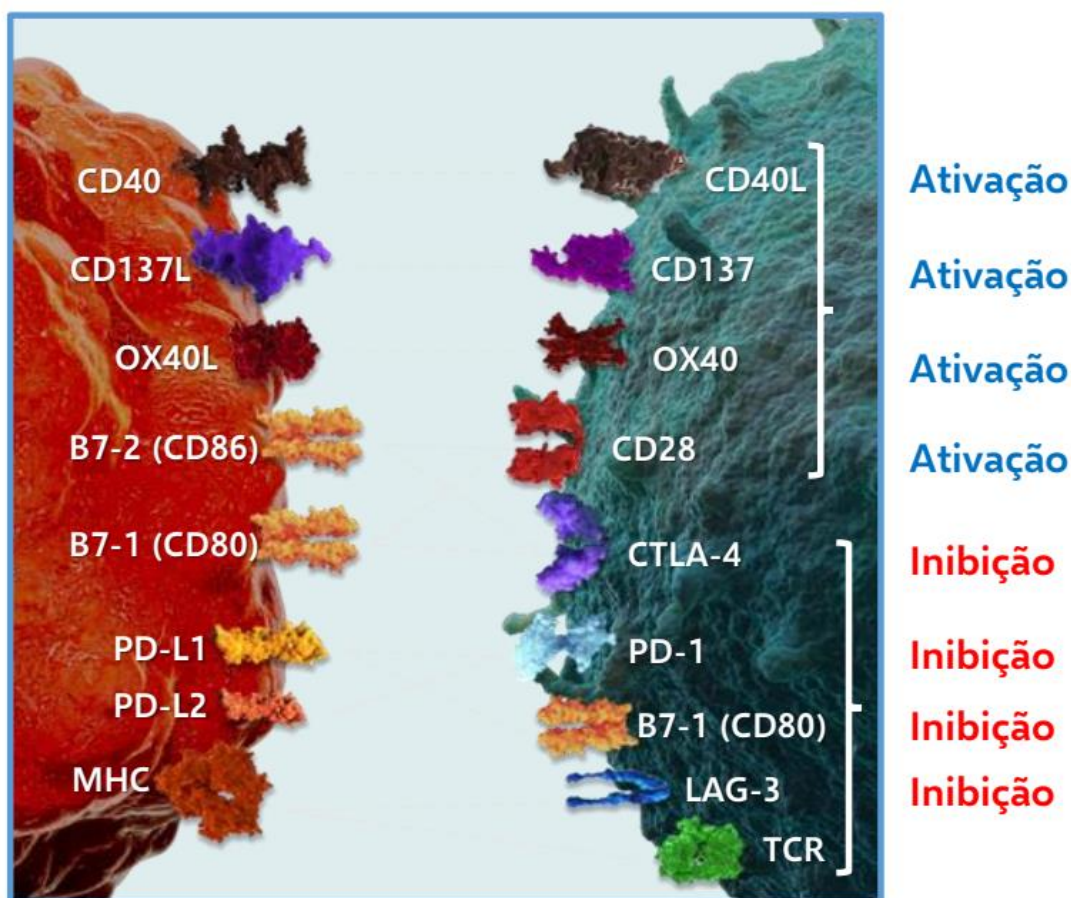
As classificações de risco para CCRccm IMDC e MSKCC são amplamente utilizadas não apenas em ensaios clínicos, mas também na prática clínica diária. Patil et al. sugeriram que a classificação de risco MSKCC é útil na era da terapia alvo molecular, embora tenha sido baseada em dados de pacientes com CCRm tratados durante a era da terapia com citocinas e também nas terapias com inibidores de tirosina quinase ¹¹⁹. Enquanto isso, alguns grupos demonstraram que existem vários fatores prognósticos para CCRm além da classificação de risco MSKCC e do IMDC ¹²⁰. Takagi et al. demonstraram que proteína C-reativa, relação neutrófilos-linfócitos e o número de órgãos metastáticos foram fatores prognósticos independentes em pacientes de risco intermediário IMDC ¹²¹. Neste estudo, não houve diferença significativa entre a expressão de PD-L1 e a classificação de risco IMDC, porém para o marcador PD-1 apresentou associação, com significado estatístico, com a classificação IMDC. Cinquenta e seis por cento dos pacientes classificados com risco bom expressaram PD-1, enquanto 17% dos pacientes classificados com risco intermediário expressaram PD-1 e nenhum paciente classificado como risco pobre expressou PD-1.

PD-1 na superfície celular de células T ativadas é imunossupressor quando é ativado em tecido periférico por células tumorais via expressão de PD-L1 ou PD-L2. Em nossa análise, a expressão de PD-1 foi detectada em cerca de 18,3% de nossas amostras de metástases. Estudos anteriores sobre o valor prognóstico da expressão de PD-1 em CCRccm são contraditórios ^{122,123,124}. Em nossa coorte, encontramos uma associação significativa de PD-1 com SG pela análise de regressão de Cox univariada, mas a análise de regressão de Cox multivariada revelou que não é uma fator prognóstico independente. Estes achados são condizentes com os dados contraditórios descritos em literatura científica sobre o papel PD-1 como valor prognóstico. Como já descrito na revisão bibliográfica inicial, Ueda, K. et al. analisaram 33 pacientes com

CCRccm, amostras de tumor primário, que foram submetidos a cirurgia e receberam terapias de alvo molecular de março de 2008 a abril de 2016. O grupo concluiu que a expressão de PD-1 e PD-L1 está significativamente associada a características clínico-patológicas adversas no CCRcc.

CTLA-4 é o outro alvo das terapias de inibição de checkpoint no carcinoma de células renais. Anticorpos para CTLA-4 foram os primeiros inibidores de checkpoint com atividade antitumoral ¹²⁵. A expressão de CTLA-4 foi significativamente correlacionada com doenças metastáticas primárias e associada a uma SG e SCE reduzida em toda a coorte, bem como em um subgrupo apenas com CCRcc. Embora associada a doenças metastáticas primárias, a expressão de CTLA-4 em um subgrupo de doença não metastática ainda está significativamente associada a uma pior SG e SCE. A análise multivariada revelou a expressão de CTLA-4 como um fator prognóstico independente após um ajuste para o grau do tumor, estágio do tumor, idade, sexo e status de desempenho ECOG ⁶⁸. Em nossa análise a expressão imuno-histoquímica de CTLA4 foi muito baixa, onde apenas 2% da coorte apresentou o biomarcador, sendo assim não foi possível chegar a qualquer conclusão sobre o seu papel prognóstico nesta coorte de pacientes, mas sugere que diante desta baixa expressão, possa ter pouco ou nenhuma influência como biomarcador no material metastático de CCR, porém necessita de análises confirmatórias em outras coortes. Antes da publicação final desta dissertação, o fornecedor (abcam) do anticorpo anti-CTLA4, ab19792, decidiu remover este marcador, devido a sua baixa reatividade ¹²⁶.

Em doenças metastáticas, a expressão de PD-L1 em células tumorais ou LIT é o biomarcador mais estudado para a predição de uma resposta aos CPI ^{73,127,128}. As taxas de resposta são melhores em tumores positivos para PD-L1, mas, como existem taxas de resposta relevantes em subgrupos negativos para PD-L1, a expressão de PD-L1 ainda é considerada um marcador prognóstico, mas não preditivo e, portanto, não pode ser recomendada para alocação de terapia ¹²⁹. Os principais problemas no desenvolvimento de biomarcadores preditivos para a terapia com CPI são a expressão dinâmica, a heterogeneidade dentro do tumor primário e a baixa correlação entre os sítios primário e metastático ^{106,108,130}. Em nossa análise as seguintes variáveis epidemiológicas/patológicas apresentaram associação com significado estatístico com a expressão de PD-L1: acometimento linfonodal e presença de metástase pulmonar. A expressão imuno-histoquímica de PD-L1 não demonstrou impacto nas análises de SG e SLP. Sendo assim, de acordo com esta análise, a expressão de PD-L1 em tecido metastático de CCRccm não possui significado prognóstico.



Fonte: Adaptado de Pardoll DM, et al. 2012.

Figura 17 - Receptores de imune checkpoint, divididos pela sua capacidade de inibição e ativação das células de defesa.

Já havia descrito seis preditores independentes de baixa sobrevida global: *status performance* de Karnofsky inferior a 80%, menos de 1 ano do diagnóstico ao tratamento, anemia (concentração de hemoglobina < limite inferior do normal), hipercalcemia (> limite superior do normal), neutrofilia (contagem de neutrófilos > limite superior do normal) e trombocitose (contagem de plaquetas > limite superior do normal). De acordo com o número de fatores de mau prognóstico, os pacientes foram segregados em grupos de risco favorável (sem fatores), intermediário (um ou dois fatores) e pobre (mais de três fatores) ¹³¹.

Em nossa análise as seguintes variáveis apresentaram significância estatística no impacto prognóstico de SLP em análise univariada: grau ISUP, presença de metástase em tecido mole, KPS <80, hipercalcemia. Na análise multivariada apenas metástase em tecido mole e KPS < 80 se mostraram variáveis que impactam a SLP de maneira independente. Desta maneira, as características que realmente levam o paciente a progressão estão mais relacionadas as

características clínicas e patológicas, enquanto as características imuno-histológicas parecem ter um papel secundário.

Com relação a análise de SG e as variáveis que possuem significado estatístico em análise univariada, temos: realização de nefrectomia, presença de metástase óssea, presença de metástase em tecido mole, KPS < 80 e expressão de PD-1. Na análise multivariada apenas a presença de metástase óssea e metástase em tecido mole se mostraram variáveis que impactam a SG de maneira independente. Desta maneira, as características que realmente levam o paciente a morte estão mais relacionadas as características clínicas e patológicas, enquanto as características imuno-histológicas parecem ter um papel secundário.

Nenhum dos 3 biomarcadores analisados demonstrou significância estatística na análise de SG, sendo assim as características clínicas, patológicas e terapêuticas que realmente levaram os pacientes a morte. Não foi possível comprovar que os biomarcadores PD-1, PD-L1 e CTLA-4 possuem impacto na SG destes pacientes.

A análise de acompanhamento do estudo CHECKMATE-214, com tempo de acompanhamento mediano de acompanhamento de 55 meses, comparou a associação de nivolumabe e ipilimumabe versus sunitinibe, em pacientes CCRccm. A combinação de inibidores de *checkpoint* ainda se mostra mais eficaz, com SG superior com nivolumabe + ipilimumabe vs sunitinibe ITT (HR 0,69; IC 95% 0,59 a 0,81), bem como em pacientes com risco intermediário e pobre (HR 0,65; IC 95% 0,54 a 0,78). SG mediana com nivolumabe + ipilimumabe não foi alcançado vs 38,4 meses com sunitinibe na população geral e 48,1vs 26,6 meses em pacientes com risco intermediário e pobre ¹³². Em nossa análise a sobrevida global mediana dos pacientes conforme a categorização de risco de acordo com o IMDC foram as seguintes: 97 meses para o grupo favorável, 81,8 meses para o grupo intermediário e 50,8 meses para o grupo de pobre. Algumas hipóteses podem ser consideradas para a mediana de sobrevida global ser superior que estudos anteriores. Todos os pacientes da coorte do nosso estudo realizaram biópsia de metástase, geralmente este tipo de procedimento é realizado em pacientes com melhor prognóstico e com poucas metástases, portanto pacientes com melhor prognóstico. Além disso 68% dos pacientes não apresentaram metástase ao diagnóstico. A mediana de tempo, para os 60 pacientes, entre o diagnóstico de CCRcc e o CCRccm foi de 21,4 meses. Estes dados demonstram que a coorte de pacientes deste estudo possui características prognósticas melhores, em geral, do que pacientes de estudos clínicos randomizados.

A técnica de TMA facilitou a avaliação de grandes estudos de coorte; no entanto, há poucos dados sobre o melhor método para preservar as amostras, DiVito, K. et al, avaliaram três métodos de armazenamento de lâminas de TMA de câncer de mama: revestimento de

parafina e armazenamento em um dessecador de nitrogênio, sozinho ou em combinação. Foram testados a durabilidade de três antígenos, citoqueratina, receptor de estrogênio e Ki-67 em TMA. As amostras foram armazenadas nessas condições por 3 meses em temperatura ambiente. A coloração foi avaliada com pontuação manual usando coloração marrom tradicional (0-3+), bem como pontuação automatizada usando seções coradas por fluorescência. A intensidade da coloração foi comparada à obtida em lâminas recém-cortadas. Lâminas armazenadas em condições ambientais (temperatura ambiente e ar) por 3 meses exibiram degradação acentuada de todos os antígenos alvo, em alguns casos resultando em lâminas praticamente ilegíveis. O revestimento combinado de parafina e o armazenamento de nitrogênio resultaram na melhor preservação da antigenicidade, com retenção de 72 a 99% da antigenicidade de uma lâmina recém-cortada, dependendo do marcador e do sistema de detecção utilizado. O uso de revestimento de parafina ou armazenamento de nitrogênio sozinho protegeu as lâminas em menor grau ¹³³.

A heterogeneidade metodológica para se avaliar os biomarcadores deste estudo é algo importante para ser levado em consideração na análise de resultados deste estudo. Não há padrão para se determinar qual amostra deve ser analisada, podendo ser células tumorais, ou células do infiltrado tumoral. Além disso, há vários tipos de anticorpos utilizados na análise de IHQ para a determinação de PD-L1, a padronização realizada com o estudo Blueprint é válida apenas para tumores de pulmão, sendo necessário que ocorra uma análise semelhante para tumores renais para se entender se os diferentes anticorpos existentes são intercambiáveis. Infelizmente neste estudo ocorreu uma perda de 96 amostras de imuno-histoquímica devido a perda de imunogenicidade das amostras do TMA. Esta amostra havia sido preparada em 2016 e foi armazenada envolvida em parafina, ao abrigo da luz. O estudo publicado por DeVito, K. et al concluiu que o melhor método de armazenamento é combinando o revestimento de parafina com nitrogênio. Esta perda significativa impactou a análise estatística dos dados, pois diversas variáveis conhecidas por seu impacto prognóstico não apresentaram significância estatística neste estudo. Inclusive a análise de biomarcadores, como por exemplo o PD-L1, o número reduzido de pacientes pode ter impactado conclusões adicionais.

Nosso estudo tem várias fraquezas, incluindo seu desenho retrospectivo, tamanho da amostra extremamente pequeno e análise em apenas um único centro. A avaliação de PD-1, PD-L1 e CLTA-4 ainda não foi padronizada no CCRccm. Além disso, um valor de corte padronizado para positividade de PD-1 e PD-L1 ainda não foi claramente estabelecido. Como vimos o uso dos CPI pode ter sido um fator de confusão, principalmente para os pacientes com expressão de PD-1. Estudos adicionais são necessários para se entender quais biomarcadores

podem ter associação com desfechos clínicos, prognóstico na doença e preditivos para resposta de tratamentos sistêmicos.

6. CONCLUSÃO

1. Quando avaliadas na metástase de carcinoma de células claras renal, a expressão imuno-histoquímica de PD-1 tem papel prognóstico para sobrevida global, porém o marcador não se mostrou ser uma variável de importância prognóstica independente das outras variáveis.
2. Quando avaliadas na metástase de carcinoma de células claras renal, a expressão imuno-histoquímica de PDL-1 não se mostrou ter um papel prognóstico para sobrevida global e sobrevida livre de progressão.
3. Quando avaliadas na metástase de carcinoma de células claras renal, a expressão imuno-histoquímica de CTLA-4 não se mostrou ter um papel prognóstico para sobrevida global e sobrevida livre de progressão.

7. REFERÊNCIAS

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(1):7–30.
2. Capitanio U, Montorsi F. Renal cancer. *Lancet* [Internet]. 2016;387(10021):894–906. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00046-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00046-X)
3. International Agency for Research on Cancer [Internet]. [cited 2020 May 21]. Available from: <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>
4. Mohammadian M, Pakzad R, Towhidi F, Makhsofi BR, Ahmadi A, Salehiniya H. Incidence and mortality of kidney cancer and its relationship with HDI (Human Development Index) in the world in 2012. *Clujul Med*. 2017;90(3):286–93.
5. Scelo G, Larose TL. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(36):3574–81.
6. Wozniak MB, Brennan P, Brenner DR, Overvad K, Olsen A, Tjønneland A, et al. Alcohol consumption and the risk of renal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer*. 2015;137(8):1953–66.
7. Moore SC, Lee IM, Weiderpass E, Campbell PT, Sampson JN, Kitahara CM, et al. Association of leisure-time physical activity with risk of 26 types of cancer in 1.44 million adults. *JAMA Intern Med*. 2016;176(6):816–25.
8. Haas NB, Nathanson KL. Hereditary Kidney Cancer Syndromes. *Adv Chronic Kidney Dis* [Internet]. 2014;21(1):81–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.ackd.2013.10.001>
9. Maher ER, Neumann HPH, Richard S. Von Hippel-Lindau disease: A clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet*. 2011;19(6):617–23.
10. Srigley JR, Delahunt B, Eble JN, Egevad L, Epstein JI, Grignon D, et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver classification of renal neoplasia. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(10):1469–89.
11. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. World Health Organization classification of tumours: Pathology & genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. *Urology*. 2005;65(1):214–5.
12. Brugarolas J. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Molecular Genetics of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. 2014;32(18).
13. Ohh M, Kaelin J. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: New perspectives.

- Mol Med Today. 1999;5(6):257–63.
14. Maxwell PH, Wiesener MS, Ratcliffe 1999. *Nature*. 1999;459(1997):271–5.
 15. Linehan WM, Vasselli J, Srinivasan R, Walther MM, Merino M, Choyke P, et al. Genetic basis of cancer of the kidney: Disease-specific approaches to therapy. *Clin Cancer Res*. 2004;10(18 II):6282–90.
 16. Moch H, Gasser T, Amin MB, Torhorst J, Sauter G, Mihatsch MJ. Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma: A swiss experience with 588 tumors. *Cancer*. 2000;89(3):604–14.
 17. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol [Internet]*. 2016;70(1):93–105. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.029>
 18. Linehan WM, Spellman PT, Ricketts CJ, Creighton CJ, Fei SS, Davis C, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2016;374(2):135–45.
 19. Steffens S, Janssen M, Roos FC, Becker F, Schumacher S, Seidel C, et al. Incidence and long-term prognosis of papillary compared to clear cell renal cell carcinoma - A multicentre study. *Eur J Cancer*. 2012;48(15):2347–52.
 20. Kunath F, Schmidt S, Krabbe LM, Miernik A, Dahm P, Cleves A, et al. Partial nephrectomy versus radical nephrectomy for clinical localised renal masses. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;2017(5).
 21. Janssen MWW, Linxweiler J, Terwey S, Ruge S, Ohlmann CH, Becker F, et al. Survival outcomes in patients with large (7cm) clear cell renal cell carcinomas treated with nephron-sparing surgery versus radical nephrectomy: Results of a multicenter cohort with long-term follow-up. *PLoS One*. 2018;13(5):1–13.
 22. Mir MC, Derweesh I, Porpiglia F, Zargar H, Mottrie A, Autorino R. Partial Nephrectomy Versus Radical Nephrectomy for Clinical T1b and T2 Renal Tumors: A Systematic Review and Meta-analysis of Comparative Studies. *Eur Urol [Internet]*. 2017;71(4):606–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2016.08.060>
 23. Méjean A, Ravaud A, Thezenas S, Colas S, Beauval J-B, Bensalah K, et al. Sunitinib Alone or after Nephrectomy in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2018 Aug 2;379(5):417–27.
 24. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*.

- 2015;373(19):1803–13.
25. Escudier, B, N.M. Tannir, D.F. McDermott, O.A. Frontera, B. Melichar ERP, P. Barthelemy, S. George, V. Neiman, C. Porta, T.K. Choueiri TP, F. Donskov, P. Salman, C.K. Kollmannsberger, B. Rini SM, M.B. McHenry, H.J. Hammers RJM. CheckMate 214: Efficacy and safety of nivolumab 1 ipilimumab (N1I) v sunitinib (S) for treatment-naïve advanced or metastatic renal cell carcinoma (mRCC), including IMDC risk and PD-L1 expression subgroups. *Ann Oncol.* 2017;28(September):v621.
 26. Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2019;380(12):1116–27.
 27. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. Sorafenib in Advanced Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2007;356(2):125–34.
 28. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S, et al. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2009;27(22):3584–90.
 29. Choueiri TK, Escudier B, Powles T, Tannir NM, Mainwaring PN, Rini BI, et al. Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2016;17(7):917–27. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30107-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30107-3)
 30. Choueiri TK, Powles T, Burotto M, Escudier B, Boursion MT, Zurawski B, et al. Nivolumab plus Cabozantinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2021;384(9):829–41.
 31. Rini BI, Escudier B, Tomczak P, Kaprin A, Szczylik C, Hutson TE, et al. Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): A randomised phase 3 trial. *Lancet* [Internet]. 2011;378(9807):1931–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61613-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61613-9)
 32. Motzer R, Alekseev B, Rha S-Y, Porta C, Eto M, Powles T, et al. Lenvatinib plus Pembrolizumab or Everolimus for Advanced Renal Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2021;384(14):1289–300.
 33. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Rioux-Leclercq N, Bex A, Khoo V, et al. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2019;30(5):706–20.
 34. Clinical N, Guidelines P, Guidelines N. *Kidney Cancer.* 2023;
 35. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); Bethesda (MD): National

- Institutes of Health (US); 2016-. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. 2020;(Md). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/> Co-published by National Institutes of Health (US), Bethesda (MD).
36. Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2002;20(1):289–96.
 37. Igor Frank , Michael L Blute, John C Cheville, Christine M Lohse, Amy L Weaver HZ. 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* [Internet]. 2002;168(6):2395–400. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12441925/>
 38. López JI. Renal tumors with clear cells. A review. *Pathol Res Pract* [Internet]. 2013;209(3):137–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2013.01.007>
 39. Heng DY, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, et al. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: Results from a large, multicenter study. *J Clin Oncol*. 2009;27(34):5794–9.
 40. Motzer BRJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. 1999;17(8):2530–40.
 41. Makhail TM, Abou-Jawde RM, BouMerhi G, Malhi S, Wood L, Elson P, et al. Validation and extension of the Memorial Sloan-Kettering prognostic factors model for survival in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2005;23(4):832–41.
 42. Négrier S, Escudier B, Gomez F, Douillard JY, Ravaud A, Chevreau C, et al. Prognostic factors of survival and rapid progression in 782 patients with metastatic renal carcinomas treated by cytokines: A report from the Groupe Français d’Immunothérapie. *Ann Oncol*. 2002;13(9):1460–8.
 43. Manola J, Royston P, Elson P, McCormack JB, Mazumdar M, Négrier S, et al. Prognostic model for survival in patients with metastatic renal cell carcinoma: Results from the international kidney cancer working group. *Clin Cancer Res*. 2011;17(16):5443–50.
 44. Shinohara N, Nonomura K, Abe T, Maruyama S, Kamai T, Takahashi M, et al. A new

- prognostic classification for overall survival in asian patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2012;103(9):1695–700.
45. Ko JJ, Xie W, Kroeger N, Lee J lyun, Rini BI, Knox JJ, et al. The international metastatic renal cell carcinoma database consortium model as a prognostic tool in patients with metastatic renal cell carcinoma previously treated with first-line targeted therapy: A population-based study. *Lancet Oncol* [Internet]. 2015;16(3):293–300. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71222-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71222-7)
 46. Wells JC, Stukalin I, Norton C, Srinivas S, Lee JL, Donskov F, et al. Third-line Targeted Therapy in Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results from the International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium. *Eur Urol* [Internet]. 2017;71(2):204–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2016.05.049>
 47. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2018 Apr 5;378(14):1277–90.
 48. Sim SH, Messenger MP, Gregory WM, Wind TC, Vasudev NS, Cartledge J, et al. Prognostic utility of pre-operative circulating osteopontin, carbonic anhydrase IX and CRP in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* [Internet]. 2012;107(7):1131–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2012.360>
 49. Sabatino M, Kim-Schulze S, Panelli MC, Stroncek D, Wang E, Taback B, et al. Serum vascular endothelial growth factor and fibronectin predict clinical response to high-dose interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol.* 2009;27(16):2645–52.
 50. Li G, Feng G, Gentil-Perret A, Genin C, Tostain J. Serum Carbonic Anhydrase 9 Level is Associated With Postoperative Recurrence of Conventional Renal Cell Cancer. *J Urol.* 2008;180(2):510–4.
 51. Minardi D, Lucarini G, Milanese G, Di Primio R, Montironi R, Muzzonigro G. Loss of nuclear BAP1 protein expression is a marker of poor prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2016;34(8):338.e11-338.e18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2016.03.006>
 52. Kapur P, Peña-Llopis S, Christie A, Zhrebker L, Pavía-Jiménez A, Rathmell WK, et al. Effects on survival of BAP1 and PBRM1 mutations in sporadic clear-cell renal-cell carcinoma: A retrospective analysis with independent validation. *Lancet Oncol* [Internet]. 2013;14(2):159–67. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70584-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70584-3)
 53. Joseph RW, Kapur P, Serie DJ, Parasramka M, Ho TH, Cheville JC, et al. Clear Cell

- Renal Cell Carcinoma Subtypes Identified by BAP1 and PBRM1 Expression. *J Urol* [Internet]. 2016;195(1):180–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2015.07.113>
54. Rini B, Goddard A, Knezevic D, Maddala T, Zhou M, Aydin H, et al. A 16-gene assay to predict recurrence after surgery in localised renal cell carcinoma: Development and validation studies. *Lancet Oncol*. 2015;16(6):676–85.
 55. da Costa WH, da Cunha IW, Fares AF, Bezerra SM, Shultz L, Clavijo DA, et al. Prognostic impact of concomitant loss of PBRM1 and BAP1 protein expression in early stages of clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol* [Internet]. 2018 May;36(5):243.e1-243.e8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2018.01.002>
 56. Chipollini J, da Costa WH, Werneck da Cunha I, de Almeida e Paula F, Guilherme O. Salles P, Azizi M, et al. Prognostic value of PD-L1 expression for surgically treated localized renal cell carcinoma: implications for risk stratification and adjuvant therapies. *Ther Adv Urol*. 2019;11:1–7.
 57. da Costa WH, da Cunha IW, Fares AF, Bezerra SM, Shultz L, Clavijo DA, et al. Prognostic impact of concomitant loss of PBRM1 and BAP1 protein expression in early stages of clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2018;36(5):243.e1-243.e8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2018.01.002>
 58. Da Costa WH, Rezende M, Carneiro FC, Rocha RM, Da Cunha IW, Carraro DM, et al. Polybromo-1 (PBRM1), a SWI/SNF complex subunit is a prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *BJU Int*. 2014;113(5 B):157–63.
 59. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992;11(11):3887–95.
 60. Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: New pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:29–53.
 61. Neel BG, Gu H, Pao L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci*. 2003;28(6):284–93.
 62. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 2009;114(8):1537–44.
 63. Staron MM, Gray SM, Marshall HD, Parish IA, Chen JH, Perry CJ, et al. The Transcription Factor FoxO1 Sustains Expression of the Inhibitory Receptor PD-1 and

- Survival of Antiviral CD8⁺ T Cells during Chronic Infection. *Immunity* [Internet]. 2014;41(5):802–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.013>
64. Li C, Li W, Xiao J, Jiao S, Teng F, Xue S, et al. ADAP and SKAP 55 deficiency suppresses PD-1 expression in CD 8 + cytotoxic T lymphocytes for enhanced anti-tumor immunotherapy . *EMBO Mol Med*. 2015;7(6):754–69.
 65. Youngblood B, Oestreich KJ, Ha SJ, Duraiswamy J, Akondy RS, West EE, et al. Chronic Virus Infection Enforces Demethylation of the Locus that Encodes PD-1 in Antigen-Specific CD8⁺ T Cells. *Immunity* [Internet]. 2011;35(3):400–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.06.015>
 66. Xiao G, Deng A, Liu H, Ge G, Liu X. Activator protein 1 suppresses antitumor T-cell function via the induction of programmed death 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(38):15419–24.
 67. Salmaninejad A, Khoramshahi V, Azani A, Soltaninejad E, Aslani S, Zamani MR, et al. PD-1 and cancer: molecular mechanisms and polymorphisms. *Immunogenetics*. 2018;70(2):73–86.
 68. Kahlmeyer A, Stöhr CG, Hartmann A, Goebell PJ, Wullich B, Wach S, et al. Expression of PD-1 and CTLA-4 Are Negative Prognostic Markers in Renal Cell Carcinoma. *J Clin Med*. 2019;8(5):743.
 69. Drake CG, Stein MN. The immunobiology of kidney cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(36):3547–52.
 70. Salmaninejad Arash, Khoramshahi Vahid, Azani Alireza, Soltaninejad Ehsan, Aslani Saeed, Reza Zamani Mohammad, Zal Masoud, Nesaei Abolfazl MHS. *Cancer J. Cancer J*. 2014;20(4):: 256–261.
 71. Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, et al. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007;13(6):1757–61.
 72. Roemer MGM, Advani RH, Ligon AH, Natkunam Y, Redd RA, Homer H, et al. PD-L1 and PD-L2 genetic alterations define classical hodgkin lymphoma and predict outcome. *J Clin Oncol*. 2016;34(23):2690–7.
 73. Zhu J, Armstrong AJ, Friedlander TW, Kim W, Pal SK, George DJ, et al. Biomarkers of immunotherapy in urothelial and renal cell carcinoma: PD-L1, tumor mutational burden, and beyond. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):1–10.
 74. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*. 2007;8(3):239–

- 45.
75. Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends Mol Med* [Internet]. 2015;21(1):24–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2014.10.009>
76. Ji M, Liu Y, Li Q, Li XD, Zhao WQ, Zhang H, et al. PD-1/PD-L1 pathway in non-small-cell lung cancer and its relation with EGFR mutation. *J Transl Med*. 2015;13(1):4–9.
77. Bellucci R, Martin A, Bommarito D, Wang K, Hansen SH, Freeman GJ, et al. Interferon- γ -induced activation of JAK1 and JAK2 suppresses tumor cell susceptibility to NK cells through upregulation of PD-L1 expression. *Oncoimmunology*. 2015;4(6).
78. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, Saco J, Escuin-Ordinas H, Rodriguez GA, et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep* [Internet]. 2017;19(6):1189–201. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.031>
79. Nunes-Xavier CE, Angulo JC, Pulido R, López JI. A Critical Insight into the Clinical Translation of PD-1/PD-L1 Blockade Therapy in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Curr Urol Rep*. 2019;20(1):1–10.
80. Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, et al. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*. 2005;104(10):2084–91.
81. Ueda K, Suekane S, Kurose H, Chikui K, Nakiri M, Nishihara K, et al. Prognostic value of PD-1 and PD-L1 expression in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2018;36(11):499.e9-499.e16. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2018.07.003>
82. Kumar B, Ghosh A, Datta C, Pal DK. Role of PDL1 as a prognostic marker in renal cell carcinoma: a prospective observational study in eastern India. *Ther Adv Urol*. 2019;11:175628721986885.
83. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1823–33.
84. Motzer RJ, Rini BI, McDermott DF, Arén Frontera O, Hammers HJ, Carducci MA, et al. Nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in first-line treatment for advanced renal cell carcinoma: extended follow-up of efficacy and safety results from a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(10):1370–85.

85. Motzer RJ, Penkov K, Haanen J, Rini B, Albiges L, Campbell MT, et al. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2019;380(12):1103–15.
86. Ionescu DN, Downes MR, Christofides A, Tsao MS. Harmonization of PD-L1 testing in oncology: A Canadian pathology perspective. *Curr Oncol*. 2018;25(3):e209–16.
87. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, Beasley MB, Borczuk AC, Botling J, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2018;13(9):1302–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.05.013>
88. Brunner MC, Chambers CA, Chan FK, Hanke J, Winoto A, Allison JP. CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J Immunol* [Internet]. 1999;162(10):5813–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10229815>
89. Krummel BME, Allison JP. C T L A - 4 E n g a g e m e n t Inhibits 11.+2 A c c u m u l a t i o n and Cell Cycle Progression u p o n Activation o f Resting T Cells By Matthew E Krummel and James P. Allison. 1996;183(June):1–8.
90. Carreno BM, Bennett F, Chau TA, Ling V, Luxenberg D, Jussif J, et al. CTLA-4 (CD152) Can Inhibit T Cell Activation by Two Different Mechanisms Depending on Its Level of Cell Surface Expression. *J Immunol*. 2000;165(3):1352–6.
91. Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, Korman AJ, Allison JP. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med*. 2009;206(8):1717–25.
92. Salvi S, Fontana V, Boccardo S, Merlo DF, Margallo E, Laurent S, et al. Evaluation of CTLA-4 expression and relevance as a novel prognostic factor in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(9):1463–72.
93. Erfani N, Mehrabadi SM, Ghayumi MA, Haghshenas MR, Mojtahedi Z, Ghaderi A, et al. Increase of regulatory T cells in metastatic stage and CTLA-4 over expression in lymphocytes of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* [Internet]. 2012;77(2):306–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2012.04.011>
94. Mao H, Zhang L, Yang Y, Zuo W, Bi Y, Gao W, et al. New Insights of CTLA-4 into Its Biological Function in Breast Cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010;10(7):728–36.
95. Liu S, Wang F, Tan W, Zhang L, Dai F, Wang Y, et al. CTLA4 has a profound impact on the landscape of tumor-infiltrating lymphocytes with a high prognosis value in clear

- cell renal cell carcinoma (ccRCC). *Cancer Cell Int* [Internet]. 2020;20(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01603-2>
96. Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *N Engl J Med*. 2017;377(25):2500–1.
 97. Guillermo de Velasco, Diana Miao, Martin H. Voss, A. Ari Hakimi JJH, Nizar M. Tannir, Pheroze Tamboli, Leonard J. Appleman, W. Kimryn Rathmell EM, Van Allen and TKC. Tumor Mutational Load and Immune Parameters across Metastatic Renal Cell Carcinoma Risk Groups. *Cancer Immunol Res*. 2016;4(10):820–2.
 98. Iacovelli R, Nolè F, Verri E, Renne G, Paglino C, Santoni M, et al. Prognostic Role of PD-L1 Expression in Renal Cell Carcinoma. A Systematic Review and Meta-Analysis. *Target Oncol*. 2016;11(2):143–8.
 99. Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, Hellmann MD, Shen R, Janjigian YY, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet* [Internet]. 2019;51(2):202–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41588-018-0312-8>
 100. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jun 28;366(26):2443–54.
 101. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer*. 2010;116(7):1757–66.
 102. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res*. 2006;66(7):3381–5.
 103. Motzer RJ, Rini BI, McDermott DF, Redman BG, Kuzel TM, Harrison MR, et al. Nivolumab for metastatic renal cell carcinoma: Results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol*. 2015;33(13):1430–7.
 104. Varela I, Tarpey P, Raine K, Huang D, Ong CK, Stephens P, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature* [Internet]. 2011;469(7331):539–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09639>
 105. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Mar 8;366(10):883–92. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22397650>
106. Callea M, Albiges L, Gupta M, Cheng SC, Genega EM, Fay AP, et al. Differential expression of PD-L1 between primary and metastatic sites in clear-cell renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(10):1158–64.
 107. Zhang X, Yin X, Zhang H, Sun G, Yang Y, Chen J, et al. Differential expressions of PD-1, PD-L1 and PD-L2 between primary and metastatic sites in renal cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2019;19(1):1–10.
 108. Jilaveanu LB, Shuch B, Zito CR, Parisi F, Barr M, Kluger Y, et al. PD-L1 expression in clear cell renal cell carcinoma: An analysis of nephrectomy and sites of metastases. *J Cancer.* 2014;5(3):166–72.
 109. M. Jawhar. mini-review tiSSue MicroArrAy. *Ann Saudi Med* [Internet]. 2009;29(April):123–7. Available from: www.saudiannals.net
 110. Heng DY, Xie W, Regan MM, Harshman LC, Bjarnason GA, Vaishampayan UN, et al. External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: A population-based study. *Lancet Oncol.* 2013;14(2):141–8.
 111. Cohen HT, Mcgovern FJ. Renal-Cell Carcinoma. 2005;2477–90.
 112. Ravaud A. A Step Ahead in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2021;384(14):1360–1.
 113. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
 114. Marisa Chudzinski-Tavassi A, Luciano Pereira Morais K, Gabriel de Souza J, Chammas R. Role of Immune System in Kidney Cancer. *Evol Trends Kidney Cancer.* 2020;
 115. Thompson RH, Kwon ED, Allison JP. Inhibitors of B7-CD28 costimulation in urologic malignancies. *Immunotherapy.* 2009;1(1):129–39.
 116. McDermott DF, Sosman JA, Sznol M, Massard C, Gordon MS, Hamid O, et al. Atezolizumab, an anti-programmed death-ligand 1 antibody, in metastatic renal cell carcinoma: Long-term safety, clinical activity, and immune correlates from a phase Ia study. *J Clin Oncol.* 2016;34(8):833–42.
 117. Li Y, Liang L, Dai W, Cai G, Xu Y, Li X, et al. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. *Mol Cancer.* 2016;15(1).
 118. Escudier B, Tannir NM, McDermott DF, Frontera OA, Melichar B, Plimack ER, et al. CheckMate 214: Efficacy and safety of nivolumab + ipilimumab (N+I) v sunitinib (S)

- for treatment-naïve advanced or metastatic renal cell carcinoma (mRCC), including IMDC risk and PD-L1 expression subgroups. *Ann Oncol* [Internet]. 2017;28(September):v621–2. Available from: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx440.029>
119. Patil S, Figlin RA, Hutson TE, Michaelson MD, Négrier S, Kim ST, et al. Prognostic factors for progression-free and overall survival with sunitinib targeted therapy and with cytokine as first-line therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Ann Oncol*. 2011;22(2):295–300.
 120. Seidel C, Busch J, Weikert S, Steffens S, Bokemeyer C, Grünwald V. Tumour shrinkage measured with first treatment evaluation under VEGF-targeted therapy as prognostic marker in metastatic renal cell carcinoma (mRCC). *Br J Cancer*. 2013;109(12):2998–3004.
 121. Takagi T, Fukuda H, Kondo T, Ishihara H, Yoshida K, Kobayashi H, et al. Prognostic Markers for Refined Stratification of IMDC Intermediate-Risk Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma Treated with First-Line Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy. *Target Oncol* [Internet]. 2019;14(2):179–86. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11523-019-00634-8>
 122. Erlmeier F, Weichert W, Schrader AJ, Autenrieth M, Hartmann A, Steffens S, et al. Prognostic impact of PD-1 and its ligands in renal cell carcinoma. *Med Oncol*. 2017;34(6):1–8.
 123. Kim KS, Sekar RR, Patil D, Dimarco MA, Kissick HT, Bilen MA, et al. Evaluation of programmed cell death protein 1 (PD-1) expression as a prognostic biomarker in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncoimmunology* [Internet]. 2018;7(4). Available from: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1413519>
 124. Kang MJ, Kim KM, Bae JS, Park HS, Lee H, Chung MJ, et al. Tumor-infiltrating PD1-positive lymphocytes and FoxP3-positive regulatory T cells predict distant metastatic relapse and survival of clear cell renal cell carcinoma. *Transl Oncol* [Internet]. 2013;6(3):282–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1593/tlo.13256>
 125. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* (80-). 1996;271(5256):1734–6.
 126. ABCAM. Disponível em: <https://www.abcam.com/ctla4-antibody-bni3-ab19792>. Último acesso em: 20/02/2023.
 127. Ribas A, Tumei PC. The future of cancer therapy: Selecting patients likely to respond to PD1/L1 blockade. *Clin Cancer Res*. 2014;20(19):4982–4.

128. Rodriguez-Vida A, Strijbos M, Hutson T. Predictive and prognostic biomarkers of targeted agents and modern immunotherapy in renal cell carcinoma. *ESMO Open*. 2016;1(3):1–13.
129. Gandini S, Massi D, Mandalà M. PD-L1 expression in cancer patients receiving anti PD-1/PD-L1 antibodies: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2016;100:88–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.02.001>
130. Thompson RH, Dong H, Kwon ED. Implications of B7-H1 expression in clear cell carcinoma of the kidney for prognostication and therapy. *Clin Cancer Res*. 2007;13(2 II):709–15.
131. Heng DY, Xie W, Regan MM, Harshman LC, Bjarnason GA, Vaishampayan UN, et al. External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: A population-based study. *Lancet Oncol* [Internet]. 2013;14(2):141–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70559-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70559-4)
132. Albiges L, Tannir NM, Burotto M, McDermott D, Plimack ER, Barthélémy P, et al. Nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib for first-line treatment of advanced renal cell carcinoma: Extended 4-year follow-up of the phase III CheckMate 214 trial. *ESMO Open*. 2020;5(6):1–10.
133. DiVito KA, Charette LA, Rimm DL, Camp RL. Long-term preservation of antigenicity on tissue microarrays. *Lab Investig*. 2004;84(8):1071–8.

ANEXO 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



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

**COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP**

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **22/09/2020**, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de **14/07/2020**, **aprovaram** a realização do projeto nº. **2900/20** intitulado: **“Análise de expressão do gene PD-1, PD-L1 e CTLA-4 no tecido metastático e avaliação de seu papel prognóstico em carcinoma renal de células claras metastático.”**

Pesquisador Responsável: Walter Henriques da Costa
Aluno: Giovanni César Coelho Bomfim (Mestrado)

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

São Paulo, 23 de Setembro de 2020.

Atenciosamente,

Luciana Facure Moredó
1ª. Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO 2 – Classificação TNM AJCC

Classificação TNM da “American Joint Committee on Cancer’s AJCC Cancer Staging” 8a. Ed.

TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
T1	Tumor ≤ 7 cm na maior dimensão, limitado ao rim
T1a	Tumor ≤ 4 cm na maior dimensão, limitado ao rim
T1b	Tumor > 4 , mas ≤ 7 cm na maior dimensão, limitado ao rim
T2	Tumor > 7 cm na maior dimensão, limitado ao rim
T2a	Tumor > 7 cm, mas ≤ 10 cm na maior dimensão, limitado ao
T2b	Tumor > 10 cm, limitado ao rim
	O tumor se estende para as veias principais ou tecidos perinéfricos, mas não para a glândula adrenal ipsilateral e não além da fáscia de Gerota
T3	O tumor se estende para a veia renal ou seus ramos segmentares, ou invade o sistema pélvico-cial, ou invade a gordura perirrenal e / ou seio renal, mas não além da fáscia
T3a	
T3b	O tumor se estende para a veia cava abaixo do diafragma
	O tumor se estende para a veia cava acima do diafragma ou invade a parede da veia cava
T3c	
	O tumor invade além da fáscia de Gerota (inclui extensão contígua na glândula adrenal ipsilateral)
T4	
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Sem metástase de linfonodo regional
N1	Metástase em linfonodo (s) regional (is)
M0	Sem metástase a distância
M1	Metástase a distância
Stage I	T1 N0 M0
Stage II	T2 N0 M0
Stage III	T1-T2 N1 M0, T3 N0-N1 M0
Stage IV	T4 Qualquer N M0, Qualquer T Qualquer N M1

ANEXO 3 – Grau de ISUP

Grau	Descrição
I	Os núcleos parecem redondos e uniformes, 10 µm; nucléolos são imperceptíveis ou ausentes.
II	Os núcleos têm aspecto irregular com sinais de formação de lóbulos, 15 µm; nucléolos são evidentes
III	Os núcleos parecem muito irregulares, 20 µm; nucléolos grandes e proeminentes.
IV	Os núcleos parecem bizarros e multilobados, 20 µm ou mais; nucléolos são proeminentes.

ANEXO 4 – Escala de performance de Karnofski

Karnofsky: KPSKarnofsky Performance Status Classification

100	Normal, nenhuma queixa, nenhuma evidência de doença
90	Capaz para continuar atividade normal; pequenos Sintomas ou sinais da doença.
80	Atividade normal com esforço; alguns sinais e sintomas.
70	Cuidados para si; incapaz para continuar suas atividades normais.
60	Requer ajuda ocasional; cuidados para a maioria das necessidades.
50	Requer ajuda considerável e cuidados médicos frequentes.
40	Incapacitado; requer cuidado especial e ajuda.
30	Severamente incapacitado; hospitalizado morte não iminente.
20	Muito doente; precisa de internação urgente e requer medidas de suporte ou
10	Moribundo; processo de fatalidade rapidamente progredindo.
0	Morto

D. A. Karnofsky and J. H. Burchenal, "The Clinical Evaluation of Chemotherapeutic Agents in Cancer," In: C. M. MacLeod, Ed., Evaluation of Chemotherapeutic Agents,

Referência: Columbia University Press, New York, 1949, P. 196.

ANEXO 5 – Critérios do IMDC e MSKCC

Variáveis utilizadas para classificação prognóstica em CCRm

	KFS ^a	Tempo entre diagnóstico e tratamento ^b	LDH ^c	Cálcio corrigido ^d	Hemoglobina ^e	Neutrófilos ^f	Plaquetas ^g
MSKCC ¹	X	X	X	X	X		
IMDC ²	X			X	X	X	X
Limites	< 80%	> 1 ano	1,5 x 140 /L	> que o limite normal. 8,5 - 10,2 mg/dL	< 13,5 g/dL (M) 12,0 g/dL (F)	> que o limite normal: 2.000 - 7.000 /uL	> que o limite normal: 150.000 - 400.000 /uL

a. < 80%

b. > 1 ano

c. > 1,5 x 140 U/L

d. > 10,2 mg/dL

e. < 13,5 g/dL (M)/12,0 g/dL (F)

f. > 7,0 x 10⁹ /L

g. > 400.000 /uL

MSKCC = Memorial Sloan Kettering Cancer Center;

IMDC = International Metastatic Renal Cancer Database Consortium;

KFS = Karnofsky performance status

Fonte:

1. Motzer, RJ. et al. J Clin Oncol. 2002 Jan 1;20(1):289-96

2. Heng, D. et al. Lancet Oncol. 2013 Feb; 14(2): 141–148.

APÊNDICE 1 - Formulário de coleta de dados

Nome:			
RGH:		Data de nascimento:	
Gênero:			
Data diagnóstico:			
Nefrectomia:		() Sim () Não	
2010 AJCC T Stage:			
2010 AJCC N Stage:			
Estadiamento do câncer:		I ()	II () III () IV ()
Grau ISUP:		1 ()	2 () 3 () 4 ()
Data do diagnóstico da metástas			
Sítios metastáticos:			
1. lung	2. bones	3. liver	4. CNS
	99. desconhecido	0. N/A	
5. lymphonodes	6. skin	88. outro	

Fez tratamento sistêmico:	() Sim () Não
Tempo entre o diagnóstico e início do tratamento:	

Terapia sistêmica 1:				
1. sunitinibe	2. sorafenib	3. pazopanibe	4. tensirolimo	5. interferon
6. interferon + bevacizumabe	7. interleucina	8. everolimo	9. axitinibe	
10. nivolumabe + ipilimumabe	11. pembrolimumabe + axitinibe			
88. outro	99. desconhecido			
Data de início de tratamento:		Data de final de tratamento:		
Melhor resposta:				
Resposta completa	Resposta parcial	Doença estável	Progressão de doença	

Terapia sistêmica 2:				
1. sunitinibe	2. sorafenib	3. pazopanibe	4. tensirolimo	5. interferon
6. interferon + bevacizumabe	7. interleucina	8. everolimo	9. axitinibe	
10. nivolumabe + ipilimumabe	12. nivolumabe	13. cabozantinibe		
14. everolimo + levantinibe		88. outro	99. desconhecido	
Data de início de tratamento:		Data de final de tratamento:		
Melhor resposta:				
Resposta completa	Resposta parcial	Doença estável	Progressão de doença	

Terapia sistêmica 3:				
1. sunitinibe	2. sorafenib	3. pazopanibe	4. tensirolimo	5. interferon
6. interferon + bevacizumabe	7. interleucina	8. everolimo	9. axitinibe	
10. nivolumabe + ipilimumabe	12. nivolumabe	13. cabozantinibe		
14. everolimo + levantinibe		88. outro	99. desconhecido	
Data de início de tratamento:		Data de final de tratamento:		
Melhor resposta:				
Resposta completa	Resposta parcial	Doença estável	Progressão de doença	

Último follow-up:

Status do último follow-up:

Data do óbito:

Hemoglobina:

Neutrófilos:

Plaquetas:

Lactato desidrogenase

Cálcio:

KPS:

Tempo de diagnóstico ao início do tratamento: