UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

MARCELA SAMPAIO LIMA

Expressão de Ciclina D1 em Carcinoma de Células Renais

RIBEIRÃO PRETO

2013

MARCELA SAMPAIO LIMA

Expressão de Ciclina D1 em Carcinoma de Células Renais

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível na secretaria do Departamento de Patologia e Medicina Legal FMRP-USP.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências, na Área de Concentração: Patologia, opção: Patologia Humana.

Orientador: Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva

Colaboradores: Prof. Dr. Roberto Cuan Ravinal
Prof. Dr. Roberto Silva Costa

RIBEIRÃO PRETO

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Lima, Marcela Sampaio
Expressão de Ciclina D1 em Carcinoma de Células Renais.
Ribeirão Preto, 2013.
135 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia.
Orientador: Silva, Gyl Eanes Barros.

1. Carcinoma de células renais. 2. Carcinoma renal de células
claras. 3. Ciclina D1. 4. Fatores prognósticos.

Nome: LIMA, Marcela Sampaio

Título: Expressão de Ciclina D1 em Carcinoma de Células Renais

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, na Área de Concentração: Patologia, opção: Patologia Humana.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Renal do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e contou com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedicatória

A meus pais, Gilson Barreto Lima e Carmem Sampaio Lima, pela minha formação e por sempre me apoiarem em todos os momentos de minha vida.

A meus irmãos, Carolina e Ricardo, e tias-avós, Helena e Lúcia, que sempre acompanharam minha trajetória pessoal e profissional.

A meu companheiro Paulo M. C. Salotti pela paciência, amor e compreensão em todos os anos de convivência, especialmente durante a realização deste trabalho.

Agradecimentos

A Deus, por sempre me iluminar nos momentos mais difíceis e por me dar forças para superá-los.

Ao Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva, pela orientação, amizade e atenção com que fui recebida. Agradeço pelo incentivo e apoio às decisões tomadas.

Ao Prof. Dr. Roberto Silva Costa, pela co-orientação, apoio laboratorial e por se mostrar sempre solícito quando precisei de auxílio. Agradeço os ensinamentos e exemplos transmitidos não só durante o Mestrado, como também durante a Residência Médica no SERPAT (Serviço de Patologia) do HC FMRP-USP.

Ao Prof. Dr. Roberto Cuan Ravinal, pela co-orientação e auxílio na idealização da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Valdair Francisco Muglia, pela disponibilidade quando necessitei de consultoria.

Ao colega de pós-graduação e amigo, Renan Augusto Pereira, pelas trocas de idéias, incentivo e auxílio na realização da parte experimental do trabalho e formatação da dissertação.

Aos técnicos do Laboratório de Patologia Renal, Flávio Henrique Leite e Guilherme de Paula Lemos, pelo auxílio técnico, dedicação e por nossa amizade.

Ao CEMEQ (Centro de Métodos Quantitativos), em especial à estatística Mayara Piani, pela ajuda com assuntos estatísticos e por sempre se mostrar disponível a me receber.

A todos os funcionários da secretaria do Departamento de Patologia da FMRP-USP e do SERPAT, em especial a Camila de Luca Zambonini Gimenes, pela convivência e ajuda com assuntos burocráticos.

A minha família e amigos pela força e carinho que sempre demonstraram, apesar da distância.

E, finalmente, a meu companheiro Paulo M. C. Salotti, por ouvir minhas idéias e desabafos, incentivando-me a ir em frente.

Muito obrigada!

"Não há transição que não implique um ponto de partida, um processo e um ponto de chegada. Todo amanhã se cria num ontem, através de um hoje. De modo que o nosso futuro baseia-se no passado e se corporifica no presente. Temos de saber o que fomos e o que somos para sabermos o que seremos."

Paulo Freire

RESUMO

LIMA, M. S. **Expressão de Ciclina D1 em Carcinoma de Células Renais**. 2013. 135f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Carcinoma de Células Renais (CCR) representa uma família de tumores distintos com evolução clínica imprevisível. Uma variedade de moléculas tem sido avaliada como marcadores prognósticos para CCR. Ciclina D1, uma proteína reguladora do ciclo celular, encontra-se superexpressa em vários tumores primários. Nosso objetivo é avaliar sua expressão como marcador prognóstico em CCR. Antes disso, traçamos um perfil clínico e histopatológico da amostra e verificamos sua relação com os fatores prognósticos considerados clássicos pela literatura. 109 espécimes de pacientes diagnosticados com CCR foram obtidos entre 2005 e 2010 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e submetidos à análise imunoistoquímica juntamente com 07 amostras de tecido renal normal. A maior parte das características epidemiológicas e clínicas de nossa amostra foi similar àquelas descritas na literatura mundial. Houve predomínio do gênero masculino, da raça branca, com idade próxima a 60 anos, frequência de pacientes assintomáticos em torno de 36% e grande prevalência do CCR de células claras (71,55%). A mortalidade específica da doença foi de 13,76%, sendo o CCR de células claras o tipo mais frequente entre os óbitos e casos metastáticos. Os casos que exibiram má evolução clínica, definida pela ocorrência de metástase e/ou óbito por CCR (22,01%), estiveram associados à presença de sintomas ao diagnóstico, maior tamanho tumoral, grupo de estágio alto (III ou IV), grau nuclear de Fuhrman alto (3 ou 4), presença de necrose e de diferenciação sarcomatóide no tumor, além de outros fatores histológicos desfavoráveis ($p < 0,01$). Isso indica que as variáveis utilizadas na avaliação de prognóstico em países desenvolvidos podem ser aplicadas aos nossos pacientes. Não houve expressão imunoistoquímica de Ciclina D1 nos casos de tecido renal normal. Observou-se heterogeneidade de marcação nuclear intratumoral no total de casos e menor expressão proteica entre os CCR papilífero e cromóforo. Pacientes com tumores com Ciclina D1^{baixa} (até 30% de células positivas) apresentaram má evolução clínica ($p = 0,03$), maior tamanho tumoral ($p = 0,01$), presença de sintomas ao diagnóstico ($p = 0,04$), grau nuclear alto ($p = 0,001$), presença de necrose ($p = 0,004$) e de diferenciação sarcomatóide ($p = 0,04$) no tumor, além de menor sobrevida sem metástase e/ou óbito por CCR ($p = 0,03$). Após análise multivariada, a expressão de Ciclina D1 não apresentou valor prognóstico independente para má evolução clínica, embora tenha aumentado levemente a acurácia prognóstica do modelo adotado. Em todas as análises realizadas para o CCR de células claras isoladamente, observamos significância estatística semelhante à do total de casos (CCR). Nosso estudo demonstrou que: a proteína Ciclina D1 encontra-se superexpressa em CCR; os tipos de CCR parecem exibir diferentes padrões de marcação imunoistoquímica da Ciclina D1; alta marcação da proteína (acima de 30% de células positivas) esteve associada à boa evolução clínica e à maioria dos fatores prognósticos favoráveis bem estabelecidos na literatura. Novas investigações são necessárias para descobrir que mecanismos levam a seu acúmulo nas células neoplásicas e quais outros eventos podem estar contribuindo para a progressão da doença.

Palavras-chave: Carcinoma de células renais, carcinoma renal de células claras, ciclina D1, fatores prognósticos.

ABSTRACT

LIMA, M. S. **Expression of Cyclin D1 in Renal Cell Carcinoma**. 2013. 135f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Renal Cell Carcinoma (RCC) is a family of distinct tumors with unpredictable clinical outcome. A variety of molecules have been evaluated as prognostic markers for RCC. Cyclin D1, a cell cycle regulatory protein, is overexpressed in several primary tumors. Our purpose is to evaluate its expression as a prognostic marker in RCC. Before that, we drew a clinical and histopathological profile of the sample and verified its relationship with prognostic factors regarded as classics in literature. 109 specimens from patients diagnosed with RCC were obtained between 2005 and 2010 at Hospital das Clínicas - Ribeirão Preto School of Medicine – USP and submitted to immunohistochemical analysis, along with 07 normal kidney tissue samples. Most epidemiological and clinical characteristics of our sample were similar to those described in the literature. There was a predominance of male, Caucasian, aged about 60 years, the frequency of asymptomatic patients around 36%, and high prevalence of clear cell RCC (71.55%). The disease-specific mortality was 13.76%, being the clear cell RCC the most frequent type among deaths and metastatic cases. Cases that exhibited poor clinical outcome, defined by the occurrence of metastasis and/or death by RCC (22.01%), were related to the presence of symptoms at diagnosis, larger tumor size, high stage group (III or IV), high Fuhrman nuclear grade (3 or 4), presence of necrosis and sarcomatoid differentiation in the tumor and other unfavorable histological factors ($p < 0.01$). This indicates that the variables used in the assessment of prognosis in developed countries can be applied to our patients. There was no immunohistochemical expression of Cyclin D1 in cases of normal kidney tissue. There was intratumoral heterogeneity in nuclear staining in all cases and lower protein expression among papillary and chromophobe RCC. Patients with Cyclin D1^{low} tumors (up to 30% positive cells) showed poor clinical outcome ($p = 0.03$), larger tumor size ($p = 0.01$), presence of symptoms at diagnosis ($p = 0.04$), high nuclear grade ($p = 0.001$), presence of necrosis ($p = 0.004$) and sarcomatoid differentiation ($p = 0.04$) in the tumor and lower survival without metastasis and/or death by RCC ($p = 0.03$). After multivariate analysis, the expression of Cyclin D1 showed no independent prognostic value for poor clinical outcome, although it has slightly increased the prognostic accuracy of the model adopted. In all analyzes performed for clear cell RCC alone, we observed statistical significance similar to that of the total cases (RCC). Our study showed that: Cyclin D1 protein is overexpressed in RCC; RCC types seem to exhibit different patterns of immunohistochemical staining for Cyclin D1; high protein expression (over 30% positive cells) was related to good clinical outcome and to most favorable prognostic factors well established in the literature. Further investigations are necessary to reveal which mechanisms lead to its accumulation in neoplastic cells and what other events might be contributing to the progression of the disease.

Keywords: Renal cell carcinoma, clear cell renal cell carcinoma, cyclin D1, prognostic factors.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC – Área Sob a Curva

CCR – Carcinoma de Células Renais

CDKis – inibidores de ciclinas quinase-dependentes

CDKs – ciclinas quinase-dependentes

CEMEQ – Centro de Métodos Quantitativos

CK – Citoceratina

DM – Diabetes Mellitus

DP – Desvio-padrão

EMA – Antígeno de Membrana Epitelial

HC FMRP-USP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

IC – Intervalo de Confiança

IMC – Índice de Massa Corpórea

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IRC – Insuficiência Renal Crônica

ITU – Infecção do Trato Urinário

OMS – Organização Mundial da Saúde

OR – *Odds Ratio*

PAS – Ácido Periódico de Schiff

pRB – Proteína Retinoblastoma

RCC – Marcador imunoistoquímico de carcinoma de células renais

RNM – Ressonância Nuclear Magnética

ROC – *Receiver Operating Characteristic*

SERPAT – Serviço de Patologia

TC – Tomografia Computadorizada

US – Ultra-sonografia

VHL – Von Hippel-Lindau

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	11
1. Caracterização do Carcinoma de Células Renais.....	12
2. Ciclo Celular e Ciclina D1.....	27
3. Hipótese.....	33
OBJETIVOS.....	34
MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
1. Delineamento do estudo.....	37
2. Amostra estudada.....	37
3. Critérios de inclusão.....	37
4. Critérios de exclusão.....	37
5. Variáveis demográficas, clínicas, laboratoriais e histopatológicas.....	38
6. Análise histopatológica do Carcinoma de Células Renais.....	39
7. Quantificação da reação imunoistoquímica para Ciclina D1.....	41
8. Análise estatística.....	42
RESULTADOS.....	44
1. Descrição geral da amostra.....	45
2. Fatores de risco.....	45
3. Análise laboratorial.....	47
4. Formas de apresentação clínica.....	49
5. Dados histológicos.....	52
6. Seguimento clínico.....	56
7. Expressão de Ciclina D1 pela Técnica de Imunoistoquímica.....	62
DISCUSSÃO.....	76
CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
ANEXOS.....	108

INTRODUÇÃO

1. Caracterização do Carcinoma de Células Renais

As neoplasias renais classificam-se em primárias e secundárias. Dentre as primárias, elas podem ser benignas (exemplo: adenoma, oncocitoma) ou malignas (exemplo: carcinoma de células renais, tumor de células transicionais, sarcoma). Cerca de 85% das massas renais sólidas diagnosticadas são carcinomas renais, 5% são tumores de células transicionais e raramente sarcomas ou tumores metastáticos de outros órgãos. O restante são tumores benignos (POMPEO, 2007).

O carcinoma de células renais (CCR) é reconhecido como uma família de carcinomas derivados do epitélio tubular, mas que exibem aspectos morfológicos distintos, resultantes de anormalidades genéticas diferentes (BANNAYAN e LAMM, 1980; KOVACS; AKHTAR; BECKWITH;BUGERT *et al.*, 1997;MOTZER;RUSSO;NANUS e BERG, 1997; SCHMID e SZABO, 1997;VOGELZANG e STADLER, 1998;REIS e GUIMARAES, 1999; GODLEY e ATAGA, 2000;REUTER e PRESTI, 2000;WHANG e GODLEY, 2003). Estes tumores apresentam características interessantes como a regressão espontânea de metástases distantes após a retirada do tumor, recorrência da lesão após anos do processo cirúrgico curativo, alta taxa de resposta à imunoterapia, baixa eficácia de quimio e radioterapias e diagnóstico geralmente tardio. Devido a estas características, os fatores prognósticos mais valiosos são o grau tumoral e o estadiamento (SCHMID e SZABO, 1997;REIS e GUIMARAES, 1999; RUSSO, 2000;HEIDENREICH;SCHRADER e VARGA, 2003).

Os carcinomas de células renais representam 1 a 3% de todos os cânceres viscerais e correspondem a 85-90% de todos os cânceres renais no adulto, em ambos os sexos, representando 2% das mortes por câncer na população. (BANNAYAN e LAMM, 1980; VOGELZANG e STADLER, 1998;RUSSO, 2000;HEIDENREICH;SCHRADER *et al.*, 2003; WHANG e GODLEY, 2003). As taxas de incidência em geral são altas na Europa e América do Norte e baixas na Ásia e América do Sul (CHOW;DONG e DEVESA, 2010). Sua incidência no Brasil é cerca de 3/100.000 hab./ano e nos Estados Unidos, três vezes maior (WROCLAWSKI, 2005;POMPEO, 2007). A incidência do CCR vem aumentando na maior parte do mundo e isto é devido não só à maior oferta de serviços médicos e avanços tecnológicos, especialmente no campo dos procedimentos de imagem, mas também ao aumento da prevalência dos fatores de risco (LINDBLAD, 2004;LIPWORTH;TARONE e MCLAUGHLIN, 2006).

No Brasil, dados sobre a epidemiologia do CCR em escala nacional são escassos, já que a doença não se encontra entre os tumores mais frequentes, bianualmente reportados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) (NARDI;ZEQUI SDE;CLARK;ALMEIDA *et al.*, 2010; BRASIL, 2012). Dados de pesquisas regionais sugerem que CCR representem aproximadamente 1,2% de todos os casos de câncer do país (MIRRA AP, 2001).

CCR ocorre mais frequentemente em indivíduos idosos, geralmente na sexta e sétima décadas da vida, numa prevalência progressivamente maior a partir dos 40 anos de idade. Apresenta uma preponderância definida para o sexo masculino, numa razão de 2 a 3 para 1 (BANNAYAN e LAMM, 1980;VOGELZANG e STADLER, 1998;RUSSO, 2000; HEIDENREICH;SCHRADER *et al.*, 2003;WHANG e GODLEY, 2003;EBLE J.N., 2004). As taxas de incidência vêm aumentando mais rapidamente na população negra que nos caucasianos (CHOW;DEVESA;WARREN e FRAUMENI, 1999).

A sobrevida é altamente dependente do estágio em que o tumor se encontra ao diagnóstico. A sobrevida média em 5 anos é de 45 a 70% na ausência de metástases a distância, chegando a 80% para lesões localizadas em alguns estudos (DICKMAN; HAKULINEN;LUOSTARINEN;PUKKALA *et al.*, 1999). Com a invasão da veia renal ou extensão à gordura perinefrética os números reduzem-se a 15-20% (BOSTWICK e MURPHY, 1998;FLANIGAN;CAMPBELL;CLARK e PICKEN, 2003; KIRKALI e LEKILI, 2003). A sobrevida média em 5 anos para CCR metastático é considerada menor que 10% (CHOW;DEVESA *et al.*, 1999). A presença de transformação sarcomatóide tem forte efeito negativo, com morte de muitos pacientes em menos de 12 meses (EBLE J.N., 2004).

O risco de desenvolvimento de CCR é 2 a 3 vezes maior em indivíduos que têm um parente em primeiro grau com a doença, segundo a maioria dos estudos (NOORDZIJ e MICKISCH, 2004). Aproximadamente 2-4% dos casos de CCR são associados a síndromes de câncer hereditário, nesses casos, acometendo adultos jovens, enquanto a maioria é considerada esporádica (FLEMING, 1998;BOSTWICK, 2008). Dentre essas doenças genéticas, a mais comum é a Doença de Von Hippel-Lindau (VHL) (WAXMAN, 2005). É uma desordem autossômica dominante, causada por mutações no gene VHL, localizado no cromossomo 3p25-26, que predispõe ao desenvolvimento de múltiplos cistos e tumores, como angioma de retina, hemangioblastoma cerebelar e espinhal, cistos pancreáticos, feocromocitoma, entre outros. CCR é a lesão maligna mais frequentemente associada a VHL e se apresenta exclusivamente como o subtipo de células claras (EBLE J.N., 2004; WAXMAN, 2005;BARONTINI e DAHIA, 2010). Outras doenças associadas ao desenvolvimento de CCR incluem síndrome de Birt-Hogg-Dubé, Esclerose Tuberosa,

Carcinoma Renal Papilar Hereditário e Leiomiomatose Hereditária (EBLE J.N., 2004; LINDBLAD, 2004).

Estudos experimentais em animais demonstraram que os carcinomas de células renais podem ser facilmente induzidos por uma variedade de agentes carcinogênicos, incluindo agentes químicos e virais. Estudos epidemiológicos mostraram uma significativa frequência dos CCR em fumantes de cigarro, cachimbo e charuto, usuários crônicos de analgésicos, pessoas em contato ocupacional com certos fatores ambientais como asbesto e cádmio e em pacientes obesos (YUAN;CASTELAO;GAGO-DOMINGUEZ;YU *et al.*, 1998; HU;MAO e WHITE, 2002;HU e UGNAT, 2005). As taxas de incidência e mortalidade são maiores em áreas mais desenvolvidas/industrializadas, o que deve provavelmente refletir o maior consumo de cigarros, bem como melhor assistência à saúde e tecnologia de exames de imagem para diagnóstico (EBLE J.N., 2004;LIPWORTH;TARONE *et al.*, 2006).

Tabagismo é o fator de risco mais consistentemente estabelecido para CCR. Estima-se que contribua aproximadamente para 20% a 30% dos CCR em homens e 10 a 20% nas mulheres (MCLAUGHLIN;LINDBLAD;MELLEMGAARD;MCCREDIE *et al.*, 1995; MCLAUGHLIN e LIPWORTH, 2000). Comparando com pacientes que nunca fumaram, o risco de desenvolvimento do câncer aumenta em cerca de 50% para homens e 20% para mulheres fumantes. Demonstrou-se também haver forte relação dose dependente para o aumento do risco, bem como diminuição do mesmo após anos de cessação do consumo (HUNT;VAN DER HEL;MCMILLAN;BOFFETTA *et al.*, 2005).

Vários estudos epidemiológicos, prospectivos e retrospectivos, têm estabelecido que o risco de câncer renal aumenta continuamente com o aumento do Índice de Massa Corpórea (IMC). Estima-se 24% de aumento para homens e de 34% para mulheres para cada 5 Kg/m² de aumento no IMC (RENEHAN;TYSON;EGGER;HELLER *et al.*, 2008). O aumento da prevalência da obesidade pode explicar em parte o aumento da incidência de CCR. A proporção de casos de CCR atribuíveis ao sobrepeso ou obesidade é estimada em cerca de 40% nos Estados Unidos e 30% na Europa (BERGSTROM;HSIEH;LINDBLAD;LU *et al.*, 2001;CALLE e KAAKS, 2004).

É difícil separar a influência que a hipertensão e seu tratamento com anti-hipertensivos, especialmente diuréticos, exercem sobre o desenvolvimento de CCR (LINDBLAD, 2004;LIPWORTH;TARONE *et al.*, 2006). No entanto, a maioria dos estudos tem demonstrado que a hipertensão é um fator de risco independente para a doença (MCLAUGHLIN e LIPWORTH, 2000;LIPWORTH;TARONE *et al.*, 2006). O risco é ainda

maior entre indivíduos obesos e hipertensos do que naqueles que apresentem somente uma dessas condições (WEIKERT;BOEING;PISCHON;WEIKERT *et al.*, 2008).

História de diabetes mellitus tem sido relacionada a risco de desenvolvimento de CCR em vários estudos, porém seu papel independente da obesidade e hipertensão não se demonstrou conclusivo (LINDBLAD;CHOW;CHAN;BERGSTROM *et al.*, 1999; LINDBLAD, 2004;SETIAWAN;STRAM;NOMURA;KOLONEL *et al.*, 2007). Entre indivíduos obesos e diabéticos, foi encontrado um maior risco para as mulheres do que entre os homens, que pode ser devido a alterações hormonais (LINDBLAD;CHOW *et al.*, 1999).

O uso de analgésicos contendo fenacetina está implicado na etiologia do carcinoma de células transicionais da pelve renal, porém seu papel na etiologia do CCR é menos claro (MCLAUGHLIN e LIPWORTH, 2000;LINDBLAD, 2004). Grandes estudos com outros tipos de analgésicos, como acetaminofeno, aspirina e outros anti-inflamatórios não esteroidais não conseguiram demonstrar uma relação convincente com o CCR (MCCREDIE; POMMER; MCLAUGHLIN;STEWART *et al.*, 1995; ROSENBERG;RAO;PALMER;STROM *et al.*, 1998).

Com relação a elementos da dieta e risco de CCR, observou-se apenas um efeito protetivo consistente do consumo de frutas e vegetais (RASHIDKHANI;LINDBLAD e WOLK, 2005). O alto consumo de gordura e proteína, principalmente de origem animal, foi sugerido como potencial fator de risco, porém vários estudos não revelaram essa associação (WOLK;GRIDLEY;NIWA;LINDBLAD *et al.*, 1996;ALLEN;RODDAM;SIERI;BOEING *et al.*, 2009). Uma hipotética associação entre consumo de álcool e risco de CCR também não foi corroborada (MCLAUGHLIN e LIPWORTH, 2000). Alguns autores sugerem inclusive uma relação inversa, com redução do risco estimada em 28% para os indivíduos que consumiram ≥ 15 g/dia de bebidas alcoólicas, especialmente vinho (WOLK;LINDBLAD e ADAMI, 1996;LEE;HUNTER;SPIEGELMAN;ADAMI *et al.*, 2007).

Paridade é um fator que tem sido investigado, porém apresenta resultados discordantes na literatura (LAMBE;LINDBLAD;WUU;REMLER *et al.*, 2002). Estudos sugerem um aumento do risco de desenvolvimento do câncer de 40 a 90% entre as mulheres que pariram quando comparadas às nulíparas e também em relação ao maior número de partos (LAMBE;LINDBLAD *et al.*, 2002;LEE;HANKINSON e CHO, 2009) Associações com outros fatores relacionados à reprodução, como uso de contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal, não são consistentemente observadas (CHOW e DEVESA, 2008).

Em geral, CCR não é considerado uma doença ocupacional (MCLAUGHLIN e LIPWORTH, 2000), mas uma série de estudos epidemiológicos tem feito associações (não

muito fortes, na maioria dos casos) entre exposição a certas substâncias ligadas ao trabalho/indústrias e a doença. Dentre esses agentes encontram-se o asbesto (MANDEL; MCLAUGHLIN; SCHLEHOFER; MELLEMGAARD *et al.*, 1995; MCLAUGHLIN e LIPWORTH, 2000; SALI e BOFFETTA, 2000), o solvente tricloroetileno (BRUNING; PESCH; WIESENHUTTER; RABSTEIN *et al.*, 2003; SCOTT e CHIU, 2006) e o arsénio (HOPENHAYN-RICH; BIGGS e SMITH, 1998; LIPWORTH; TARONE *et al.*, 2006). Outras substâncias como gasolina e petróleo, cádmio, urânio e hidrocarbono não demonstraram uma ligação consistente com o câncer renal na maioria dos estudos (MCLAUGHLIN, 1993; LEWIS; SCHNATTER; DRUMMOND; MURRAY *et al.*, 2003; IL'YASOVA e SCHWARTZ, 2005; LIPWORTH; TARONE *et al.*, 2006; CANU; ELLIS e TIRMARCHE, 2008; CHOW; DONG *et al.*, 2010).

É relatada uma maior incidência de CCR em pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) terminal que se encontram em diálise por longo período (STEWART; BUCCIANI; AGODOA; GELLERT *et al.*, 2003). A presença de doença renal cística adquirida, que aumenta em prevalência e gravidade com o tempo de diálise, é considerada o principal fator de risco para CCR nesses pacientes, independente da idade ou da doença de base (LINDBLAD, 2004; SATOH; TSUCHIYA; HABUCHI; ISHIYAMA *et al.*, 2005). Observou-se uma diferença entre sexos, na qual os homens apresentaram maior incidência e gravidade das alterações císticas do que as mulheres (MARPLE; MACDOUGALL e CHONKO, 1994). É também relatado um aumento do risco para doença renal cística adquirida e, conseqüentemente, de CCR no rim nativo de pacientes transplantados renais (DOUBLET; PERALDI; GATTEGNO; THIBAUT *et al.*, 1997; NEUZILLET; LAY; LUCCIONI; DANIEL *et al.*, 2005). Enquanto a proliferação de células epiteliais dos túbulos proximais é considerada um dos principais mecanismos patogênicos da formação de cistos, hormônios (ex: estrógenos) e fatores de crescimento e seus receptores podem estimular a proliferação celular e promover carcinogênese. Este mecanismo poderia explicar, em parte, o surgimento de múltiplos adenomas renais e carcinomas bilaterais que se desenvolvem na doença renal cística adquirida (CONCOLINO; LUBRANO; OMBRES; SANTONATI *et al.*, 1993).

Associações estatisticamente significantes entre carcinoma renal e doenças pré-existentes do rim e trato urinário, incluindo litíase e infecções, embora fracas, foram verificadas em alguns estudos (MCLAUGHLIN; MANDEL; BLOT; SCHUMAN *et al.*, 1984; DHOTE; THIOUNN; DEBRE e VIDAL-TRECAN, 2004; PARKER; CERHAN; LYNCH; LEIBOVICH *et al.*, 2004).

Radiação ionizante parece aumentar levemente o risco de CCR em pacientes tratados para espondilite anquilosante, câncer cervical e tuberculose óssea (MCLAUGHLIN e LIPWORTH, 2000;LIPWORTH;TARONE *et al.*, 2006).

Outras condições que podem ser complicadas com CCR incluem forma adulta da doença renal policística e nefroma multicístico, devido à presença de focos de hiperplasia papilar (BERNSTEIN;EVAN e GARDNER, 1987) e linfoma, devido ao relato de vários casos de coexistência com CCR (TIHAN e FILIPPA, 1996).

Os sintomas relacionados à neoplasia podem ser devidos ao crescimento local, hemorragia, síndromes paraneoplásicas ou doença metastática. Hematúria micro ou macroscópica é a manifestação clínica mais comum, encontrada em 60% dos pacientes (MOTZER;RUSSO *et al.*, 1997;POMPEO, 2007). A tríade clássica composta por hematúria, dor lombar ou abdominal e massa palpável está presente em menos de 10% dos casos e é geralmente indicativa de doença avançada (MOTZER;RUSSO *et al.*, 1997; CORGNA; BETTI;GATTA;ROILA *et al.*, 2007;POMPEO, 2007). Dor óssea pode estar presente nos casos de metástase para o esqueleto e sintomas respiratórios nos casos de acometimento pulmonar (POMPEO, 2007). Varicocele de aparecimento agudo pode significar envolvimento de veia renal ou cava inferior (DRUCKER, 2005;POMPEO, 2007).

Manifestações paraneoplásicas estão presentes em 20 a 40% dos casos e resultam da secreção de polipeptídeos e fatores humorais (POMPEO, 2007). Destacam-se eritrocitose, anemia, hipercalcemia (pseudohiperparatiroidismo), ginecomastia, perda de peso, febre, hipertensão e disfunção hepática não metastática – Síndrome de Stauffer (síndrome reversível associada a carcinoma renal, caracterizada por hepatoesplenomegalia, coagulopatia, febre, fadiga e perda de peso e que se resolve após a retirada do tumor primário) (CORGNA;BETTI *et al.*, 2007;BOSTWICK, 2008). Comumente essas manifestações desaparecem com a retirada do tumor. Entretanto, quando persistem ou aparecem tardiamente, suspeita-se de doença metastática (MICKISCH;CARBALLIDO;HELLSTEN;SCHULZE *et al.*, 2001;EBLE J.N., 2004;WROCLAWSKI, 2005).

Graças ao maior uso de exames de imagem, bem como ao seu avanço tecnológico, cerca de 30 a 40% dos CCR são achados incidentais, ainda em fase assintomática (HEIDENREICH e RAVERY, 2004;VOLPE e JEWETT, 2005). Estes tumores frequentemente são pequenos e encontrados após exames de rotina e avaliação de outras doenças (GODLEY e ATAGA, 2000). Geralmente apresentam menor grau nuclear, menor incidência de invasão microvascular e ocorrem em estágios mais iniciais, proporcionando maior sobrevida livre de doença (DALL'OGGIO;SROUGI;ORTIZ;NESRALLAH *et al.*,

2004). CCR é também conhecido por se apresentar como carcinoma metastático de sítio primário oculto, às vezes em locais bastante incomuns, como olhos e vagina (FLANIGAN; CAMPBELL *et al.*, 2003; EBLE J.N., 2004). O padrão histológico da lesão extirpada pode revelar que se trata em verdade de uma lesão metastática de carcinoma renal latente.

Em relação à forma de apresentação desta neoplasia, aproximadamente 45% dos casos se apresenta de forma localizada, 25% localmente avançada e 30% como doença metastática (BANNAYAN e LAMM, 1980; MILOWSKY e NANUS, 2001; RUSSO, 2001). Uma de suas características é a tendência a metastatizar-se amplamente antes de dar lugar a qualquer sintoma ou sinal local. As localizações mais comuns de metástase são os pulmões (aproximadamente 50%) e os ossos (33%), seguido em ordem decrescente por linfonodos regionais, fígado, supra-renais e cérebro. Em 10 a 15% dos casos o tumor primário metastatiza para o rim contralateral (BANNAYAN e LAMM, 1980; MILOWSKY e NANUS, 2001; PANTUCK; ZISMAN e BELLDEGRUN, 2001; RUSSO, 2001; FLANIGAN; CAMPBELL *et al.*, 2003).

Ultra-sonografia (US) é o método de imagem mais comumente empregado para rastreamento de doenças renais, pelo baixo custo, simplicidade e principalmente por permitir o diagnóstico diferencial entre massas cística e sólida (POMPEO ACL; AS; CARVALHAL EF; CARVALHAL GF *et al.*, 2006; POMPEO, 2007). Tomografia Computadorizada (TC) é o exame padrão para diagnóstico, estadiamento e caracterização da lesão, além de auxiliar na programação cirúrgica dos tumores. Ressonância Nuclear Magnética (RNM) é geralmente utilizada para solucionar dúvidas, especialmente na avaliação de lesões pequenas (menores que 2 cm), cistos complexos e nos casos de invasão venosa para definir adequadamente a extensão dos trombos neoplásicos, ou nos casos de contra-indicação clínica à realização de TC (ROFSKY e BOSNIAK, 1997; POMPEO ACL; AS *et al.*, 2006; CORGNA; BETTI *et al.*, 2007; BOSTWICK, 2008). Urografia Excretora tem utilidade na avaliação inicial de hematúria, mas não tem eficácia na detecção de tumores renais (POMPEO ACL; AS *et al.*, 2006; POMPEO, 2007). Os critérios de classificação radiológica de Bosniak para cistos renais (Anexo A) são utilizados na avaliação das lesões por TC e RNM e auxiliam a conduta clínica (POMPEO ACL; AS *et al.*, 2006).

O estadiamento clínico do câncer renal se faz basicamente por TC ou RNM. Dois sistemas de estadiamento são usados, Robson e TNM-2002, porém o TNM é o mais utilizado atualmente por apresentar melhor estratificação com relação à sobrevida dos pacientes,

quando comparado a classificações anteriores (DRUCKER, 2005;POMPEO ACL;AS *et al.*, 2006;CORGNA;BETTI *et al.*, 2007) (Anexos B e C).

Com base em aspectos morfológicos, histoquímicos e citogenéticos, essas neoplasias são classificadas em quatro tipos principais: células claras (convencional), papilar (ou papilífero), cromóforo e de ductos coletores (Bellini). Outros tipos menos prevalentes incluem: cístico multilocular, medular, associado à translocação Xp11.2/fusão do gene TFE3, associado a neuroblastoma, carcinoma tubular mucinoso e de células fusiformes do rim e carcinoma inclassificável. Além desses, outros tipos vêm sendo recentemente descritos e em breve deverão ser incluídos na classificação das neoplasias epiteliais renais da Organização Mundial da Saúde (OMS), como é o caso do carcinoma renal associado à doença renal cística adquirida (EBLE J.N., 2004;POMPEO, 2007;SRIGLEY e DELAHUNT, 2009).

O CCR de células claras corresponde a 75% de todos os carcinomas de células renais. Acredita-se que surja das células epiteliais de túbulos proximais. Mais de 90% dos casos apresentam anormalidades citogenéticas que envolvem a perda de material genético do braço curto do cromossomo 3 (3p) e mutações no gene VHL (KOVACS;AKHTAR *et al.*, 1997; EBLE J.N., 2004;BOSTWICK, 2008). A maioria dos tumores ocorre como massa arredondada solitária cortical, de limites bem demarcados e coloração amarelo-ouro, devido ao rico conteúdo lipídico de suas células. Multicentricidade e/ou bilateralidade ocorrem em menos de 5% dos casos. Essas características, além de idade precoce ao diagnóstico, são típicas de síndromes de câncer hereditário como a Síndrome de Von Hippel-Lindau (EBLE J.N., 2004). A média de tamanho é de cerca de 7,0 cm. Aumento no tamanho está associado a maior frequência de metástases. Presença de cistos, necrose, hemorragia e calcificação são comuns. O padrão arquitetural do tumor é variável, podendo ser sólido, trabecular, tubular, acinar, cístico e, raramente, focalmente papilar, separados por abundantes vasos de paredes finas. As células são tipicamente claras, devido à perda de lipídios e glicogênio citoplasmáticos dissolvidos durante o processamento histológico, embora um padrão granular, eosinofílico, possa ser visto, especialmente em tumores de alto grau e próximo a áreas de necrose e hemorragia. Diferenciação sarcomatóide é evidenciada em cerca de 5% dos tumores. CCR de células claras apresenta pior prognóstico quando comparado aos subtipos cromóforo e papilar; no entanto, a taxa de resposta à terapia sistêmica é maior do que para os outros subtipos histológicos (BOSTWICK e MURPHY, 1998;EBLE J.N., 2004;LOPEZ-BELTRAN;SCARPELLI;MONTIRONI e KIRKALI, 2006;BOSTWICK, 2008).

CCR de células claras apresenta positividade imunoistoquímica para os anticorpos Vimentina, Antígeno de Membrana Epitelial (EMA), marcador de carcinoma de células renais

(RCC) e CD10. Também tende a ser positivo para proteínas de baixo peso molecular (CK8, CK18, CK19, Cam 5.2) e para “pull” de ceratinas AE1/AE3 (EBLE J.N., 2004;BOSTWICK, 2008).

O CCR papilar é o segundo tipo mais comum, responsável por aproximadamente 10-15% dos casos. Trissomia dos cromossomos 3q, 7, 8, 12, 16, 17 e 20 e perda do cromossomo Y são as alterações genéticas mais consistentes (KOVACS;AKHTAR *et al.*, 1997;EBLE J.N., 2004;LOPEZ-BELTRAN;SCARPELLI *et al.*, 2006). A distribuição por sexo e idade, bem como sinais e sintomas são semelhantes ao CCR de células claras. Multifocalidade, bilateralidade e necrose são mais comuns do que em outros tipos de CCR, assim como a presença de doença renal terminal nos pacientes acometidos (EBLE J.N., 2004;BOSTWICK, 2008). Macroscopicamente, os tumores são bem circunscritos e pseudoencapsulados, com coloração que varia de cinza claro a amarelo-ouro e castanho-avermelhado, a depender da quantidade de macrófagos e cristais de colesterol no estroma e da presença de hemorragia e acúmulo de hemossiderina. O padrão arquitetural mostra proporções variáveis de papilas e túbulos, ocasionalmente com áreas sólidas e cistos contendo excrescências papilares. São descritas duas variantes morfológicas do CCR papilífero: Tipo 1 e Tipo 2. Os tumores de tipo 1 apresentam papilas recobertas por células pequenas, com pouco citoplasma, de grau nuclear baixo, dispostas em camada única, com frequentes macrófagos e edema nos *cores* papilares. É o tipo que se observa também no Carcinoma Papilar Renal Hereditário. Os tumores de tipo 2 tendem a ser maiores, apresentam papilas recobertas por células com citoplasma mais abundante e eosinofílico, de maior grau nuclear e com núcleos dispostos em graus variáveis de pseudoestratificação. Os *cores* papilares são mais densos e fibrosos, com menor quantidade de macrófagos. É o tipo que ocorre também na Síndrome da Leiomiomatose Hereditária. CCR papilífero exibe melhor prognóstico, especialmente o tipo 1, e tende a se apresentar em estágios mais precoces quando comparado ao de células claras (EBLE J.N., 2004;WAXMAN, 2005;LOPEZ-BELTRAN;SCARPELLI *et al.*, 2006;BOSTWICK, 2008).

O CCR papilífero costuma ser positivo para “pull” de ceratinas AE1/AE3 e CD15. A maioria dos casos expressa CD10 e RCC. Os tumores de tipo 1 expressam mais frequentemente CK7 (87%) do que os de tipo 2 (20%), além de MUC1; já os de tipo 2 expressam mais frequentemente E-caderina e CK20 do que os de tipo 1 (EBLE J.N., 2004; BOSTWICK, 2008).

O CCR cromóforo corresponde a 5% dos casos de carcinoma de células renais. Acredita-se que se origine das células intercaladas dos ductos coletores. Geneticamente, é caracterizado por uma combinação de perda de heterozigosidade nos cromossomos 1, 2, 6, 10,

13, 17 e 21 e hipodiploidia do DNA (KOVACS;AKHTAR *et al.*, 1997;EBLE J.N., 2004; LOPEZ-BELTRAN;SCARPELLI *et al.*, 2006;BOSTWICK, 2008). Apresenta prevalência similar entre os gêneros. Tipicamente é solitário, bem circunscrito, de coloração castanho-clara e ocasionalmente exibe área de cicatriz central. O padrão de crescimento em geral é sólido, podendo haver áreas de arquitetura tubulocística com focos de calcificação e septos fibrosos. Em contraste com CCR de células claras, os vasos são predominantemente mais calibrosos e excentricamente hialinizados. As células são grandes, poligonais, de citoplasma pálido e membranas celulares proeminentes, geralmente misturadas a células menores, de citoplasma granular eosinofílico. É o tipo de CCR mais comumente observado quando associado à Síndrome de Birt-Hogg-Dubé. Marcação difusa citoplasmática pela reação de ferro coloidal de Hale, especialmente nas células maiores, é característica. A imunoistoquímica revela, em geral, positividade para “pull” de ceratinas AE1/AE3 e EMA e negatividade para vimentina e CD10. O marcador RCC pode ser positivo ou negativo. O prognóstico do CCR cromóforo é melhor que o de células claras e a mortalidade costuma ser menor que 10% (EBLE J.N., 2004;WAXMAN, 2005;BOSTWICK, 2008).

O CCR de ductos coletores (tumor de Bellini) é responsável por apenas 1% dos CCR diagnosticados. Origina-se das células principais dos ductos coletores de Bellini. As alterações genéticas são ainda pouco compreendidas, porém incluem perda de heterozigosidade nos cromossomos 1q, 6p, 8p, 13q e 21q, além de raramente em 3p. Localiza-se geralmente na região central do rim, às vezes relacionado a uma pirâmide medular. Suas bordas são irregulares, indistintas, exibe consistência firme, coloração brancacenta e geralmente se apresenta infiltrando seio renal e gordura perirrenal. Microscopicamente, exibe arquitetura tubulopapilar infiltrativa complexa, podendo coexistir com áreas sólidas cordonais. Os túbulos são irregulares, lineados por epitélio altamente atípico, por vezes de aparência “*hobnail*”, envolvidos num estroma desmoplásico, inflamado. Alguns tumores apresentam microcistos com proliferações papilares intracísticas de alto grau e produção focal de mucina que pode ser demonstrada pelas colorações de mucicarmim, Alcian-Blue ou Ácido Periódico de Schiff (PAS). Uma afinidade imunoistoquímica pela lectina *Ulex europaeus* suporta o diagnóstico. Também costuma expressar citoceratinas de alto e baixo peso molecular e vimentina, enquanto CD15 e EMA são variáveis. CD10 e RCC são quase sempre negativos. Esses tumores são bastante agressivos, apresentando alta prevalência de metástases ao diagnóstico (cerca de 1/3 dos pacientes). A média de sobrevida reportada é de 11,5 meses entre todos os estágios, sendo que cerca de 2/3 dos pacientes morrem pela doença dentro de 2

anos (KOVACS;AKHTAR *et al.*, 1997;EBLE J.N., 2004;WAXMAN, 2005;LOPEZ-BELTRAN;SCARPELLI *et al.*, 2006;BOSTWICK, 2008;SRIGLEY e DELAHUNT, 2009).

O CCR cístico multilocular é raro (menos de 1% dos CCR) e de excelente prognóstico. Geneticamente, demonstra mutação no gene VHL o que suporta sua classificação como um subtipo de CCR de células claras, porém os critérios diagnósticos e o prognóstico diferenciado o colocam como uma entidade a parte. É bem circunscrito e encapsulado, inteiramente composto por cistos de variados tamanhos, cujos septos contêm pequenos grupos de células claras indistinguíveis do CCR células claras de grau nuclear 1. A maioria dos pacientes é assintomática e o tumor é descoberto incidentalmente, não havendo relatos de recorrência ou metástase (EBLE J.N., 2004;LOPEZ-BELTRAN;SCARPELLI *et al.*, 2006; BOSTWICK, 2008).

O CCR medular é incomum, de rápido crescimento, originado da medula renal e associado quase exclusivamente ao traço falciforme. Ocorre em pessoas jovens, com idade entre 10 e 40 anos, sendo duas vezes mais comum em homens, especialmente negros portadores de traço falciforme. Praticamente todos os pacientes são sintomáticos e cerca de 95% apresentam metástase ao diagnóstico. Os sintomas incluem hematúria, dor abdominal ou em flanco, perda de peso e massa palpável. O tumor é centralmente localizado, pouco circunscrito, infiltrativo e geralmente invade o seio renal. Histologicamente, o padrão é variável, sendo o reticular ou microcístico os mais característicos, lembrando tumor do saco vitelínico ou carcinoma adenoide cístico. O grau nuclear geralmente é alto e o estroma, desmoplásico e inflamado. Apresenta prognóstico pobre, com média de sobrevida de 15 semanas após a cirurgia. O CCR medular é atualmente considerado uma variante mais agressiva do CCR de ductos coletores (EBLE J.N., 2004;LOPEZ-BELTRAN;SCARPELLI *et al.*, 2006;BOSTWICK, 2008;SRIGLEY e DELAHUNT, 2009).

O CCR associado à translocação Xp11.2/fusão do gene TFE3 é também uma rara entidade, definido por várias diferentes translocações envolvendo o cromossomo Xp11.2, todas resultando em fusões de genes envolvendo o gene TF3. Esse tumor afeta predominantemente crianças e adultos jovens e costuma se apresentar em estágio avançado, observando-se uma história de quimioterapia prévia em 15% dos pacientes. Macroscopicamente assemelha-se ao CCR de células claras. A aparência microscópica é de um carcinoma com arquitetura papilar associado a células claras e/ou uma arquitetura mais compacta, em ninhos, com células claras volumosas e células de citoplasma eosinofílico granular. Corpos de psamoma e glóbulos hialinos são constantes e, às vezes, proeminentes. A principal característica imunoistoquímica é a reatividade nuclear para a proteína TFE3, além

de positividade para CD10 e RCC. Pouco se conhece sobre o comportamento clínico desse carcinoma, mas parece ter um curso indolente mesmo na presença de metástase (EBLE J.N., 2004;LOPEZ-BELTRAN;SCARPELLI *et al.*, 2006;BOSTWICK, 2008;SRIGLEY e DELAHUNT, 2009).

O CCR associado a neuroblastoma ocorre em pacientes sobreviventes de neuroblastoma diagnosticados e tratados na infância. A terapia para o neuroblastoma pode ter um papel na patogênese do CCR, porém alguns pesquisadores acreditam na possibilidade de o desenvolvimento desse tumor ser parte de uma síndrome genética incomum. Até a edição mais recente da OMS, apenas 18 casos haviam sido reportados. A análise citogenética de três deles mostrou desequilíbrio alélico no *locus* 20q13. Homens e mulheres são igualmente afetados e a média de idade ao diagnóstico de CCR é de 13,5 anos (2 a 35 anos). Esse grupo de tumores é morfológicamente heterogêneo, podendo ser multifocal e bilateral. Apresenta padrão de crescimento papilar e sólido, composto por células oncocitóides, com abundante citoplasma eosinofílico, atipia leve a moderada e um menor número de células com citoplasma reticular. O prognóstico se correlaciona com o estágio tumoral e grau nuclear de Fuhrman, semelhante a outros tipos de CCR (EBLE J.N., 2004;LOPEZ-BELTRAN;SCARPELLI *et al.*, 2006;BOSTWICK, 2008;SRIGLEY e DELAHUNT, 2009).

O carcinoma tubular mucinoso e de células fusiformes do rim é um tipo raro de CCR, tipicamente de baixo grau, que acomete mais mulheres, numa razão de 4:1. Sua origem histológica é ainda debatida entre as células da alça de Henle ou dos ductos coletores. Geneticamente, observa-se uma combinação de perdas envolvendo os cromossomos 1, 4, 6, 8, 13 e 14 e ganhos nos cromossomos 7, 11, 16 e 17. Usualmente se apresenta como massa assintomática, circunscrita, composta por túbulos e cordões celulares embebidos num estroma mucinoso pálido, associados a áreas de configuração fusocelular, que simulam um leiomioma ou sarcoma. O padrão imunoistoquímico é complexo, mas em geral mostra positividade para citoceratinas de baixo peso molecular e CK7, enquanto é usualmente negativo para citoceratinas de alto peso molecular e CD10. A expressão de CD15 e RCC é variável. O prognóstico é favorável, com curso indolente e raros relatos de metástase na literatura (EBLE J.N., 2004;LOPEZ-BELTRAN;SCARPELLI *et al.*, 2006;BOSTWICK, 2008;SRIGLEY e DELAHUNT, 2009).

O CCR inclassificável é uma categoria diagnóstica que inclui os casos cujas características histológicas não somam critérios para nenhum dos tipos conhecidos de CCR, mesmo após análises genéticas. Em séries cirúrgicas, esse grupo chega a contar com 4-5% dos casos. São exemplos de tumores que podem ser alocados nessa categoria aqueles compostos

por áreas de diferentes aspectos que lembram os vários tipos de CCR, aqueles compostos por células irreconhecíveis e aqueles com morfologia inteiramente sarcomatóide, em que faltam elementos epiteliais reconhecíveis. A alteração sarcomatóide pode ocorrer em qualquer tipo de CCR e não constitui um tipo em particular, mas uma indicação de progressão do tumor, com aumento do grau nuclear e pior prognóstico (KOVACS;AKHTAR *et al.*, 1997;EBLE J.N., 2004;LOPEZ-BELTRAN;SCARPELLI *et al.*, 2006;BOSTWICK, 2008).

A categoria de CCR inclassificável tende a se tornar cada vez mais restrita já que novos tipos vêm sendo recentemente coletados e descritos na literatura, como é o caso do CCR associado à doença renal cística adquirida (doença renal terminal). Aproximadamente 3 a 7% dos pacientes com doença renal cística adquirida desenvolvem tumores de células renais em seus rins nativos, representando um risco 100 vezes maior que para a população geral. Historicamente, a maioria deles era considerada como do tipo papilar. Estudos genéticos são escassos, mas há relatos de ganhos nos cromossomos 1, 2, 6 e 10. Os pacientes com esse tipo de CCR tendem a ser mais jovens, predominantemente do sexo masculino e a lesão é mais frequentemente multicêntrica e bilateral, mas menos agressiva que os CCR esporádicos (TICKOO;DEPERALTA-VENTURINA;HARIK;WORCESTER *et al.*, 2006;BOSTWICK, 2008;SRIGLEY e DELAHUNT, 2009).

Estudos recentes demonstraram que cerca de 40 % dos tumores que se desenvolvem no rim terminal são CCR dos tipos clássicos, enquanto a maioria é representada por dois subtipos designados: CCR associado à doença renal cística adquirida, mais comum, e CCR papilífero de células claras do rim terminal. O primeiro exhibe uma variedade de padrões arquiteturais, sendo comum uma aparência cribriforme. Parece originar-se de hiperplasia epitelial da parede dos cistos e cerca de 80% deles apresentam abundantes cristais de oxalato de cálcio no estroma e estruturas luminiais. O segundo tipo exhibe arquitetura predominantemente papilar, a maioria das células tem citoplasma claro e baixo grau nuclear (TICKOO;DEPERALTA-VENTURINA *et al.*, 2006;BOSTWICK, 2008;SRIGLEY e DELAHUNT, 2009).

O comportamento biológico dos CCR é variável. O crescimento súbito e expressão de metástases generalizadas contrapõem-se ao crescimento lento e silencioso durante anos. Mas, em geral, crescem lentamente. Ocasionalmente, metástases podem aparecer em pacientes submetidos a nefrectomia há vários anos por CCR (FLANIGAN;CAMPBELL *et al.*, 2003; KIRKALI e LEKILI, 2003;POMPEO, 2007). A evolução dessas neoplasias está relacionada a fatores tumorais e também às condições clínicas do indivíduo. Vários estudos têm buscado identificar fatores que auxiliem na avaliação prognóstica, destacando-se o estágio patológico,

o grau nuclear de Fuhrman, o tamanho tumoral, a presença de diferenciação sarcomatóide e a presença de sintomas ao diagnóstico, além do tipo histológico (KONTAK e CAMPBELL, 2003;SCHIPS;LIPSKY;ZIGEUNER;SALFELLNER *et al.*, 2003;BOSTWICK, 2008;VOLPE e PATARD, 2010).

O estágio patológico (TNM) constitui o fator isolado mais importante em prever o comportamento clínico do CCR, com decaimento marcante à medida que o estágio aumenta. A sobrevida em 5 anos para T1-T2 (localizada) é de 74-96% e cai para 0-20% na presença de metástase linfonodal e 0-10% em casos de metástase sistêmica. Invasão da gordura peri-renal, principalmente na região do seio renal, e da glândula adrenal ipsilateral, bem como de linfonodos regionais, demonstraram ser fatores de pior prognóstico, independentes da classificação “T” em vários estudos (DRUCKER, 2005;POMPEO, 2007; FURNISS; HARNDEN;ALI;ROYSTON *et al.*, 2008;VOLPE e PATARD, 2010). Pacientes com metástase diagnosticada concomitantemente à lesão primária apresentam menor sobrevida (cerca de 15 meses ou menos) do que nos casos de aparecimento tardio, independente do tipo histológico. O risco de recidiva depende do estágio e do grau histológico do tumor, sendo de fundamental importância o seguimento clínico do paciente para surpreendê-la precocemente (KONTAK e CAMPBELL, 2003;POMPEO, 2007).

O grau nuclear de Fuhrman é o fator prognóstico histológico mais aceito mundialmente, apesar de variações intra e inter-observadores existirem. Segundo esse fator, a sobrevida em 5 anos varia de 86-89% para o grau 1 até 28-29% para o grau 4. O valor do grau histológico em outros tipos de CCR fora o de células claras ainda é motivo de discussão. Áreas de diferenciação sarcomatóide podem aparecer em qualquer tipo histológico de CCR. Sua presença se relaciona a um pior prognóstico (BOSTWICK, 2008;FURNISS;HARNDEN *et al.*, 2008;VOLPE e PATARD, 2010;FLANIGAN;POLCARI e HUGEN, 2011).

O tamanho tumoral é um significativo indicador de prognóstico quando analisado como uma variável contínua. O sistema TNM de classificação sofreu alterações relacionadas ao ponto de corte do tamanho tumoral entre os estágios baseadas em análises de maior transição de risco entre os tamanhos propostos. Estudos mostram que o risco de morte aumenta com o aumento do tamanho da lesão (FURNISS;HARNDEN *et al.*, 2008;VOLPE e PATARD, 2010;FLANIGAN;POLCARI *et al.*, 2011).

Além desses fatores histológicos, a presença de necrose tumoral é um indicador de agressividade bem estabelecido para o CCR de células claras, mas é controverso para os tipos papilífero e cromóforo. A presença de invasão microvascular é importante preditor de recidiva, apresentando maior chance de progressão da doença. Já a relação entre idade e

prognóstico é mínima. Pacientes mais jovens costumam ter melhor sobrevida que pode estar relacionada a estágio mais baixo ao diagnóstico. Controvérsias existem sobre se o comprometimento de grandes vasos (Veia Cava e Veia Renal) isoladamente é fator prognóstico adverso. Há relatos de associação entre aumento de células T no infiltrado inflamatório, como manifestação de atividade antitumoral, e maior grau nuclear, porém esse achado ainda é incerto (DALL'OGGIO;SROUGI *et al.*, 2004;BOSTWICK, 2008; FURNISS; HARNDEN *et al.*, 2008;VOLPE e PATARD, 2010).

Há vários relatos sugerindo que lesões detectadas incidentalmente são, em média, menores, têm menor grau nuclear, raramente exibem invasão da microvasculatura tumoral e se apresentam em estágio mais precoce que aquelas detectadas em pacientes sintomáticos. Isso traduz uma associação com melhor prognóstico. A taxa de tumores diagnosticados incidentalmente subiu de 7% em estudos antigos para cerca de 60% nos mais recentes, sendo que boa parte dessas lesões são assintomáticas. Baixo índice de performance, avaliado pelo Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) ou escala de Karnofsky que visam quantificar o impacto da doença sobre a saúde do paciente, também é associado a menor sobrevida (SCHIPS;LIPSKY *et al.*, 2003;DALL'OGGIO;SROUGI *et al.*, 2004;VOLPE e JEWETT, 2005;VOLPE e PATARD, 2010).

Em anos recentes, uma variedade de marcadores moleculares vem sendo avaliada como marcadores prognósticos para o CCR, incluindo fatores indutores de hipóxia (anidrase carbônica IX, fator de crescimento vascular endotelial – VEGF), reguladores de apoptose (p53, Bcl-2), reguladores do ciclo celular (p27, PTEN), marcadores de proliferação celular (Ki-67/MIB-1) e moléculas de adesão (EpCam), dentre muitos outros. Eles têm sido considerados potencialmente úteis, mas com pouca aplicação na prática clínica atual (KIRKALI e LEKILI, 2003;BOSTWICK, 2008;VOLPE e PATARD, 2010; FLANIGAN; POLCARI *et al.*, 2011).

Várias tentativas de combinar esses diversos fatores prognósticos em sistemas integrados têm sido feitas no sentido de se obter maior relevância prognóstica. Esses sistemas podem auxiliar a identificar grupos que se beneficiariam com o uso de tratamentos adjuvantes e também grupos cujo seguimento clínico deveria ser mais concentrado. (FURNISS;HARNDEN *et al.*, 2008;VOLPE e PATARD, 2010).

O estudo dos mecanismos moleculares do carcinoma de células renais além de promover a reclassificação destas neoplasias é extremamente importante para entender sua patogenia e para o desenvolvimento de novos esquemas terapêuticos. Infelizmente até o momento não existe nenhum marcador em Patologia Renal, incorporado à prática clínica, que

permita distinguir ou identificar, em nível molecular, o possível potencial maligno de uma neoplasia benigna como o adenoma ou que permita fazer um prognóstico nos carcinomas renais (LARSSON;ROOS;STENLING e LJUNGBERG, 1993; BUI; ZISMAN; PANTUCK; HAN *et al.*, 2001;MAGYARLAKI;BUZOGANY;KAISER;SUKOSD *et al.*, 2001).

2. Ciclo Celular e Ciclina D1

O ciclo celular apresenta 4 fases sequenciais: G1 (repouso), S (síntese), G2 e M (mitose). G1 segue-se à fase de mitose (M) e representa o momento em que a célula é sensível a sinais positivos e negativos de crescimento. Durante a fase S ocorre a replicação do DNA. Na fase G2 a célula se prepara para entrar em mitose. A fase G0 representa um estado reversível ou irreversível, a depender de características particulares dos tipos celulares, de retirada da célula do ciclo de divisão celular em resposta a alta densidade celular ou privação mitogênica (WILLIAMS e STOEBER, 2012).

A progressão ordenada das células através das fases do ciclo celular é orquestrada pelas ciclinas, ciclinas quinase-dependentes (CDKs) e seus inibidores. As CDKs são expressas durante o ciclo, em níveis relativamente constantes, mas numa forma inativa. São ativadas por fosforilação após ligação com as ciclinas. O complexo Ciclina/CDK (ciclina como subunidade reguladora e CDK como subunidade catalítica) promove a fosforilação de proteínas específicas que permitirão a transferência de células em fase G1 para a fase S e iniciação da replicação do DNA (DONNELLAN e CHETTY, 1998; HEDBERG; DAVOODI; ROOS;LJUNGBERG *et al.*, 1999;WILLIAMS e STOEBER, 2012).

Ao contrário das CDKs, as ciclinas são instáveis e possuem meia vida curta, sendo degradadas através da via ubiquitina-proteasoma. Seus níveis são variáveis durante o ciclo celular. Diferentes classes de ciclinas têm sido identificadas, algumas delas com subclasses: A1, A2, B1, B2, C, D1, D2, D3, E, F, G e H. De acordo com seu pico de síntese e atividade durante o ciclo celular, estão divididas em 3 classes: ciclinas G1-S, ciclinas S e ciclinas M. Ciclinas C, D1-3 e E e suas respectivas CDKs regulam a transição G1-S, enquanto as Ciclinas A1-2 e B1-2 e suas respectivas CDKs regulam a transição S-G2. Todas as ciclinas contêm uma região conhecida como *cyclin box*, de aproximadamente 150 aminoácidos, que é um domínio relativamente conservado e é o responsável pela união e ativação das CDKs. Mutações nesta região inibem tanto a união como a ativação (DONNELLAN e CHETTY, 1998;WILLIAMS e STOEBER, 2012).

Os inibidores das CDKs (CDKIs) pertencem a duas classes: a família Kip/Cip (p21, p27 e p57) e a família INK4 (p15, p16, p18 e p19). A ativação transcricional de p21 está sob controle de p53, um gene supressor tumoral que sofre mutação numa grande proporção de cânceres. Em geral, a quantidade de CDKIs presente promove um limiar que deve ser superado pelos complexos Ciclinas/CDKs em cada ponto de restrição do ciclo para que este prossiga. As proteínas da família Kip/Cip são capazes de se ligar e inibir a maioria dos complexos Ciclinas/CDKs, enquanto as proteínas da classe INK4 são inibidores específicos de complexos contendo a Ciclina D. As CDKIs atuam nos pontos de restrição do ciclo, especialmente nas transições G1-S e S-G2, suprimindo a atividade das CDKs e, portanto, retardando ou parando o processo de replicação do DNA quando sensores detectam eventos aberrantes ou incompletos ocorridos durante o ciclo até que os mesmos sejam reparados. Se as alterações são intensas, a célula entra em apoptose (DONNELLAN e CHETTY, 1998; ROBBINS, 2005; WILLIAMS e STOEBER, 2012).

Em resposta a um sinal mitogênico, Ciclina D1 recém-sintetizada se associa à molécula de CDK correspondente. O complexo ativado Ciclina D-CDK4/6 inicia uma cascata de eventos começando pela fosforilação sítio-específica da proteína retinoblastoma (pRB), um supressor tumoral, levando à sua inativação durante a fase final de G1. A fosforilação de pRB funciona como um mecanismo molecular “on-off” para o ciclo celular e permanece nesse estado até a fase final da mitose. A pRB desativada se dissocia parcialmente do fator de transcrição E2F permitindo que genes requeridos para a fase S sejam transcritos, dentre eles os da Ciclina E, A e polimerases. A Ciclina E se liga a CDK2 levando à fosforilação de substratos necessários à replicação do DNA, duplicação do centrôssomo e biossíntese de histonas. Além disso, o complexo Ciclina E-CDK2 pode também fosforilar e inativar pRB. A parada do ciclo em G1 pode ser induzida pela ação da família INK4 que inibe CDK4 ou CDK6 ou, alternativamente, via família Kip/Cip que suprime a atividade de CDK2. Por exemplo, durante a ativação do complexo Ciclina E-CDK2, os inibidores p27 e p21 se separam do complexo e são sequestrados pela Ciclina D1 (DONNELLAN e CHETTY, 1998; HEDBERG; LJUNGBERG; ROOS e LANDBERG, 2003; ROBBINS, 2005; STAMATAKOS; PALLA; KARAIKOS; XIROMERITIS *et al.*, 2010; WILLIAMS e STOEBER, 2012).

A transição G2-M se inicia pela transcrição de Ciclina A mediada por E2F que, posteriormente, forma o complexo Ciclina A-CDK2. Este complexo irá regular os eventos da prófase. O principal mediador que impulsiona a célula além da prófase é o complexo Ciclina B-CDK1, que é ativado por uma proteína fosfatase (Cdc 25). A ativação de Ciclina B-CDK1 promove a ruptura da membrana nuclear e inicia a mitose. Os complexos Ciclina A-CDK2

(especialmente a isoforma A2) e Ciclina B-CDK1 regulam alguns eventos críticos da transição G2-M como a redução da estabilidade microtubular, a separação dos centrômeros e a condensação cromossômica. A saída da mitose requer a inativação de Ciclina B-CDK1. Durante a fase M, os grupos fosfato são removidos da proteína RB por fosfatases celulares, regenerando sua forma hipofosforilada, ligada ao fator E2F (DONNELLAN e CHETTY, 1998; HEDBERG; LJUNGBERG *et al.*, 2003; ROBBINS, 2005; STAMATAKOS; PALLA *et al.*, 2010; WILLIAMS e STOEBER, 2012).

O ciclo celular tem seu próprio controle interno, os chamados pontos de checagem ou verificação (do inglês *checkpoints*). Os principais pontos de checagem localizam-se nas transições G1-S e G2-M. A fase S é o ponto de não retorno no ciclo celular. Caso haja dano no DNA, a maquinaria de reparo e mecanismos que param o ciclo entram em ação. Se o dano não é reparado, mecanismos apoptóticos são ativados para destruir a célula. O ponto de checagem da transição G1-S previne, portanto, a replicação de células com defeitos no DNA. O ponto de verificação da transição G2-M monitora a finalização da replicação do DNA e checa se a célula pode seguramente iniciar a mitose com separação das cromátides-irmãs (ROBBINS, 2005).

Para que os pontos de checagem funcionem adequadamente, são necessários sensores de lesão do DNA, transdutores de sinal e moléculas efetoras. Os sensores e transdutores da lesão do DNA são semelhantes para os pontos G1-S e G2-M. Incluem, como sensores, proteínas da família RAD e o gene modificado da ataxia-telangiectasia (ATM) e, como transdutores, as famílias de CHK quinases. Na transição G1-S, a parada no ciclo celular é mediada principalmente pelo p53, como molécula efetora, que induz o inibidor p21. Já a parada do ciclo na transição G2-M envolve mecanismos tanto dependentes como independentes de p53. Defeitos nos componentes dos pontos de verificação do ciclo celular constituem uma das maiores causas de instabilidade genômica nas células tumorais (ROBBINS, 2005).

Desregulação do ciclo celular promove proliferação celular descontrolada que caracteriza o fenótipo maligno. Mitógenos liberam as travas da progressão celular pelo estímulo das atividades de CDKs G1-S que promovem a fosforilação da proteína RB levando à disjunção de sua interação com o fator de transcrição E2F. A fosforilação de pRB é, portanto, um ponto de convergência para os sinais oncogênicos. Além disso, os complexos formados pelas Ciclinas D e suas CDKs correspondentes podem ser vistos como sensores mitogênicos, já que iniciam todo o processo do ciclo celular frente a um estímulo. A inativação do gene RB por mutação ou metilação é uma ocorrência comum em câncer, bem

como a inativação de genes supressores tumorais que codificam as CDKIs (WILLIAMS e STOEBER, 2012).

Ciclina D1 é uma proteína nuclear de 35 KDa, codificada pelo gene CCND1 ou PRAD1, em referência ao achado de frequentes rearranjos desse gene em adenomas da paratireoide, localizado no braço longo do cromossomo 11q13. Aparece no meio de G1 e não é mais detectada na fase S, com meia vida de menos de 20 minutos. A região amino-terminal contém a sequência Leu-X-Cys-X-Glu (X representa qualquer aminoácido) que se liga à pRB. Essa mesma sequência está presente em alguns vírus, explicando em parte seu potencial oncogênico. A região carboxi-terminal inibe a ação da proteína HLH (*Helix Loop Helix*), cuja principal função é remover as células do ciclo celular (parar a proliferação). Essa inibição leva, portanto, à entrada das células em G1, para iniciar o ciclo de divisão celular. A Ciclina D1 foi inicialmente clonada e reconhecida como oncogene no desenvolvimento de tumores da paratireoide. Além de seu papel como protooncogene no ciclo celular, a Ciclina D1, como oncogene, atua na capacidade de invasão e potencial metastático através de interações entre a célula neoplásica e o microambiente tumoral (DONNELLAN e CHETTY, 1998; STAMATAKOS;PALLA *et al.*, 2010).

Proteínas envolvidas na condução do ciclo celular, como as ciclinas, têm expressão frequentemente aumentada em tumores primários, enquanto proteínas que dificultam a divisão celular, como as CDKIs, estão geralmente inativadas. Dos muitos reguladores do ciclo celular envolvidos no desenvolvimento do câncer, a Ciclina D1 é um dos mais prevalentes, inclusive com implicações diagnósticas e prognósticas (DONNELLAN e CHETTY, 1998). Estudos moleculares em tumores humanos demonstraram que sua superexpressão predomina sobre a de Ciclina D2 e Ciclina D3. A Ciclina D1 encontra-se amplificada e/ou superexpressa em muitos diferentes tumores e seu aumento ocorre relativamente cedo durante a tumorigênese. Superexpressão da proteína nem sempre é acompanhada por amplificação de seu gene, indicando a presença de outros mecanismos que levam a essa situação. Translocações cromossômicas, amplificação gênica, interrupções no tráfego intracelular normal e redução de proteólise são os mecanismos que levam ao acúmulo de Ciclina D1 no núcleo de células tumorais (DONNELLAN e CHETTY, 1998;DIEHL, 2002;KIM e DIEHL, 2009; STAMATAKOS;PALLA *et al.*, 2010).

Translocações cromossômicas envolvendo o *locus* de Ciclina D1 são relativamente raras na maioria dos cânceres, mas ocorrem em adenomas da paratireoide, em mielomas múltiplos e em mais de 90% dos linfomas do manto de células B. Neste último caso, a Ciclina D1 auxilia, inclusive, no diagnóstico da neoplasia. Amplificação gênica (11q13) como um

mecanismo de superexpressão aberrante de Ciclina D1 é mais comum e está associado a carcinomas não-pequenas células de pulmão, carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, carcinomas de pâncreas, de bexiga, de esôfago e de mama e adenomas pituitários (DIEHL, 2002;KIM e DIEHL, 2009;STAMATAKOS;PALLA *et al.*, 2010).

O *turnover* normal da Ciclina D1 envolve sua exportação nuclear e degradação citoplasmática pela via da ubiquitina durante a fase S. Para isso a molécula apresenta um resíduo de Treonina na porção C-terminal, que é o local específico de sua fosforilação (GSK-3B). A relação entre as taxas de expressão e de destruição promove um limiar de conteúdo da proteína que permite a progressão do ciclo celular ou a sua parada caso haja dano ao DNA. Alterações no tráfego da Ciclina D1 entre os compartimentos nuclear e citoplasmático, bem como na atividade de proteólise levam à localização subcelular e estabilização mais longa da Ciclina D1 que aumenta sua expressão e, conseqüentemente, seu poder oncogênico (DIEHL, 2002;KIM e DIEHL, 2009).

Evidências recentes sugerem ainda que um polimorfismo de Ciclina D1 (G/A 870), capaz de produzir uma isoforma específica da proteína (Ciclina D1b) pode influenciar o risco de câncer e prognóstico. Essa variante de Ciclina D1 é capaz de formar complexo ativo com a CDK4. No entanto, a diferença estrutural da Ciclina D1b a torna refratária à exportação nuclear para posterior degradação citoplasmática, devido à ausência do resíduo de Treonina na região C-terminal, necessária à fosforilação da molécula. Essa característica aumenta seu potencial oncogênico. Nesses casos, a superexpressão da Ciclina D1 seria resultado da redução de proteólise da ciclina nuclear não-fosforilada (DIEHL, 2002;KIM e DIEHL, 2009).

Estudos têm demonstrado que a superexpressão isolada de Ciclina D1 exerce pouca influência sobre o crescimento celular, sugerindo que essa proteína não é um potente oncogene a não ser que ocorram eventos adicionais, como por exemplo, a coparticipação dos oncogenes *Ras* e *Neu* (c-erbB-2) observada em alguns tecidos. Novas evidências indicam que a Ciclina D1 pode atuar em outras vias que não envolvem sua função de reguladora do ciclo celular e isso pode contribuir para suas propriedades oncogênicas. Dentre essas funções estão sua contribuição para a adesão celular e motilidade, sua atuação no controle transcricional, envolvendo recrutamento de histonas deacetilases e histonas metiltransferases, e como cofator transcricional para receptores de hormônios esteroidais, como o estrogênio e o androgênio (DIEHL, 2002;STAMATAKOS;PALLA *et al.*, 2010).

No carcinoma papilífero da tireoide, a Ciclina D1 encontra-se superexpressa. O nível de sua expressão de acordo com metástase para linfonodos mostrou significância estatística nos estudos ($p < 0,05$), indicando que essa proteína pode servir como um marcador na

avaliação de possíveis metástases linfonodais (STAMATAKOS;PALLA *et al.*, 2010). Também nos cânceres gástrico e colônico verificou-se uma relação entre forte expressão de Ciclina D1 e envolvimento linfonodal (MAEDA;CHUNG;KANG;OGAWA *et al.*, 1998; AALTOMAA;LIPPONEN;ALA-OPAS;ESKELINEN *et al.*, 1999).

Estudos revelaram que a forte expressão de Ciclina D1 em câncer esofágico, colônico e em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço esteve relacionada a prognóstico desfavorável. Além disso, em adenocarcinoma colorretal e carcinoma superficial de bexiga a superexpressão de Ciclina D1 foi capaz de predizer recorrência precoce (DONNELLAN e CHETTY, 1998;AALTOMAA;LIPPONEN *et al.*, 1999).

Comparada à pele normal e lesões benignas, a expressão da proteína Ciclina D1 é significativamente maior em vários tumores malignos da pele, incluindo carcinoma espinocelular, melanomas e fibrohistiocitomas malignos (DONNELLAN e CHETTY, 1998). Um estudo envolvendo 115 pacientes com câncer pulmonar não-pequenas células também revelou associação entre alta marcação de Ciclina D1 e pior prognóstico nos estágios iniciais dessas neoplasias (ZHU;YU;ZHAN;SONG *et al.*, 2010).

A superexpressão de Ciclina D1 não é invariavelmente associada a um pior prognóstico (HEDBERG;DAVOODI *et al.*, 1999). Amplificação de *CCDN1* é encontrada em 5 a 20% dos cânceres primários de mama, enquanto a superexpressão de Ciclina D1 é observada em cerca de 50% dos casos, quando comparados ao tecido normal. A expressão de Ciclina D1 está também relacionada à positividade de receptores esteroidais e a sinais histológicos favoráveis (DONNELLAN e CHETTY, 1998). Gillet *et al.*, 1996, verificaram que a expressão moderada/forte da Ciclina D1 estava relacionada a um prognóstico favorável no câncer de mama, em contraste com a associação entre agressividade de crescimento tumoral e superexpressão de Ciclina D1 observada em vários outros tumores (GILLET;SMITH;GREGORY;RICHARDS *et al.*, 1996;DONNELLAN e CHETTY, 1998; HEDBERG;DAVOODI *et al.*, 1999).

Em patologia renal, especialmente nas neoplasias renais, os estudos sobre o papel patogênico da ciclina D1 são menos comuns e os resultados, discordantes (DONNELLAN e CHETTY, 1998;AALTOMAA;LIPPONEN *et al.*, 1999;HEDBERG;DAVOODI *et al.*, 1999; HEDBERG;LJUNGBERG *et al.*, 2003). Hedberg *et al.*, 1999, analisando uma amostra de 80 pacientes com CCR, observaram que Ciclina D1 estava com expressão aumentada numa grande fração dos tumores e que baixo conteúdo proteico de Ciclina D1 estava associado a menor tempo de sobrevida (HEDBERG;DAVOODI *et al.*, 1999). Em contraste, Aaltomaa *et*

al., 1999, analisando uma amostra de 118 casos de CCR não encontraram correlação entre expressão de Ciclina D1 ou de p21 e sobrevida (AALTOMAA;LIPPONEN *et al.*, 1999).

Em novo estudo envolvendo reguladores do ciclo celular e análise de 218 casos de CCR através da técnica de *tissue microarray*, Hedberg *et al.*, 2003, observaram que baixos níveis de Ciclina D1 e p27 se correlacionaram com prognóstico pobre em CCR de células claras por análise univariada e que apenas p27 continuou significativamente associado a sobrevida em análise multivariada (HEDBERG;LJUNGBERG *et al.*, 2003). Verificaram também que na maioria dos casos o conteúdo proteico de p27 estava inalterado, porém baixo ou indetectável em uma minoria. Baixa expressão de p27 estava associada a pior prognóstico e maior tamanho tumoral em CCR de células claras (HEDBERG;DAVOODI *et al.*, 1999; HEDBERG;LJUNGBERG *et al.*, 2003).

A avaliação imunoistoquímica da proteína Ciclina D1 em casos de CCR permitirá detectar a presença ou não de superexpressão da molécula, bem como o grau de sua marcação em relação ao prognóstico e outras variáveis já classicamente adotadas como fatores preditores de evolução clínica. A técnica imunoistoquímica já é bastante conhecida e difundida entre os laboratórios em geral, o que pode facilitar a inserção futura de várias moléculas atualmente em estudo, dentre elas a Ciclina D1, na prática clínica. Análises posteriores para a verificação da presença ou ausência de amplificação gênica de CCDN1 e de polimorfismo de Ciclina D1 (G/A 870) terão grande valor na orientação sobre o possível mecanismo pelo qual a Ciclina D1 se acumula na célula neoplásica.

3. Hipótese

As ciclinas desempenham papel central e multifuncional na patogênese do câncer. Alterações em sua estrutura, função e quantidade durante o ciclo celular podem representar um evento-chave no processo de transformação neoplásica. Entre as ciclinas G1-S, a proteína Ciclina D1 é a que mais se encontra superexpressa em neoplasias e pode estar superexpressa também no CCR. A quantidade de marcação da proteína deve estar relacionada ao prognóstico da neoplasia.

OBJETIVOS

Primários:

1. Avaliar a expressão da proteína Ciclina D1 no Carcinoma de Células Renais através da técnica de imunoistoquímica.
2. Verificar o papel da Ciclina D1 como marcador prognóstico no Carcinoma de Células Renais.
3. Traçar um perfil clínico e histopatológico dos pacientes da amostra, inclusive em relação aos fatores prognósticos clássicos.

Secundários:

1. Correlacionar a expressão da Ciclina D1 com as variantes histológicas do Carcinoma de Células Renais.
2. Correlacionar a expressão de Ciclina D1 com as características clínicas e histopatológicas da amostra estudada.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Delineamento do estudo

Estudo de corte, histórico.

2. Amostra estudada

Foram selecionados espécimes cirúrgicos de pacientes com diagnóstico de Carcinoma de Células Renais, todos comprovados por diagnóstico anatomopatológico, no Serviço de Patologia (SERPAT) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC FMRP-USP), no intervalo de janeiro de 2005 a dezembro de 2010.

As lâminas dos casos levantados foram revisadas. Incluíram-se novas informações para análise quando algum dado histopatológico não constava no laudo original. A partir da revisão de lâminas, selecionou-se uma lâmina de cada caso, contendo a lesão em estudo, para a posterior realização de imunoistoquímica para Ciclina D1.

Para controle da marcação tecidual foram escolhidos 07 blocos de parafina contendo parênquima renal provenientes de pacientes autopsiados no HC FMRP-USP sem nenhuma alteração desse órgão (conhecida clinicamente ou observada no exame necroscópico). Dentre os casos selecionados, 04 eram do gênero feminino e 03 do masculino, com idade variando de 22 a 38 anos (média de 32,14 anos $\pm$ 5,49).

Realizou-se a revisão de prontuários dos pacientes selecionados nos Arquivos Ativo e Semiativo do HC FMRP-USP para levantamento de dados demográficos, clínicos, laboratoriais e de imagem.

O projeto do trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC FMRP-USP, sob o número 1748/2011, em 11 de abril de 2011 (Anexo D).

3. Critérios de inclusão

Diagnóstico clínico e anatomopatológico de CCR.

4. Critérios de exclusão

Dados incompletos do prontuário médico que impedissem o levantamento de dados demográficos, clínicos, laboratoriais e de imagem; casos correspondentes a recidivas de tumor

renal primário diagnosticado anteriormente ao período de estudo; casos correspondentes a biópsia da lesão renal (não tratados cirurgicamente) e ausência de material adequado disponível para a realização da técnica de imunoistoquímica.

Os casos em que não se realizaram excisão cirúrgica da lesão foram excluídos por comprometerem a análise dos dados histopatológicos, bem como por não haver material suficiente para o reprocessamento histológico necessário à imunoistoquímica.

5. Variáveis demográficas, clínicas, laboratoriais e histopatológicas

As variáveis demográficas avaliadas foram sexo, raça e idade do paciente no momento da apresentação clínica da doença.

As seguintes variáveis clínicas foram avaliadas: história de tabagismo, etilismo, obesidade através do cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, insuficiência renal crônica associada ou não a procedimento de diálise, radioterapia, história pessoal e familiar de neoplasia maligna, desordens urológicas preexistentes, outras condições ou doenças associadas, formas de apresentação clínica da doença, tempo de seguimento, presença de metástases e recidivas durante o intervalo de seguimento, estadiamento clínico, tempo de sobrevida e óbitos.

Dentre as variáveis laboratoriais foram analisados a presença de anemia através de medida de hemoglobina (g/dL), o nível de creatinina sérica pré-operatória (mg/dL) e a presença de hematúria (hemácias/campo) em exame de urina pré-operatório.

Exames de imagem (ultra-sonografia abdominal, tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética) foram utilizados, quando disponíveis, na análise de tamanho tumoral, lateralidade e localização da lesão, presença de multifocalidade, acompanhamento de possíveis recidivas e metástases. Os dados obtidos auxiliaram também na definição do estadiamento clínico da doença.

As variáveis histopatológicas analisadas foram obtidas através dos exames macroscópico e microscópico disponíveis nos laudos do SERPAT e de revisões das lâminas referentes a cada caso. Os seguintes dados foram estudados: diagnóstico do tipo de CCR, tamanho e localização das lesões, grau nuclear de Fuhrman, presença de necrose, diferenciação sarcomatóide, infiltrado inflamatório, invasão microvascular e de grandes vasos, invasão hilar, capsular e de ureter, extensão peri-renal e para glândula supra-renal, comprometimento de margens cirúrgicas e estadiamento anatomopatológico.

6. Análise histopatológica do Carcinoma de Células Renais

6.1. Microscopia de Luz Comum

Após fixação em formalina 10% durante um mínimo de 5 horas, o fragmento de tecido renal foi desidratado em álcool com concentrações crescentes, diafanizado em xilol e incluído em parafina. Vários cortes seriados com 3 µm de espessura foram obtidos em micrótomo e corados com Hematoxilina-Eosina. Quando necessário, outras colorações como PAS, Ferro Coloidal e Sudan Negro B foram utilizadas a fim de melhor definir o diagnóstico.

Os cortes dispostos em lâminas histológicas foram examinados em microscópio universal ZEISS equipado com aparelho fotomicrográfico.

6.2. Análise Imunoistoquímica do Carcinoma de Células Renais

6.2.1. Marcadores utilizados para o diagnóstico do tipo de CCR

Para auxiliar na definição de tipos de CCR, alguns casos necessitaram de estudo imunoistoquímico, realizado pelo SERPAT durante a confecção do laudo histopatológico. Os marcadores utilizados foram: Antígeno de Membrana Epitelial (EMA), Citoqueratina 7 (CK7), Citoqueratina 20 (CK20), Pancitoqueratinas AE1/AE3, Renal Cell Carcinoma (RCC), Vimentina, CD10, CD15, CD34, BRST-2 (GCDFP-15), Actina de Músculo Liso (1A4), proteínas S 100 e HMB-45.

6.2.2. Técnica Imunoistoquímica utilizada para Ciclina D1

O marcador Ciclina D1 foi utilizado nos casos da pesquisa que apresentavam material suficiente e adequado para avaliação de sua expressão. A técnica utilizada baseou-se no método indireto de marcação com Polímeros. Em todas as reações realizadas acrescentou-se um tecido-controle representado por tonsila humana sem alterações histológicas.

Após a escolha do material parafinado de cada caso através da revisão de lâminas, secções histológicas de 3 µm de espessura foram colocadas sobre lâminas previamente banhadas com solução de Poly-L-Lysina a fim de propiciar melhor aderência das mesmas. As lâminas foram dispostas em estufa com temperatura de aproximadamente 65°C na noite anterior ao ensaio imunoistoquímico (“overnight”). Os seguintes passos foram seguidos:

DESPARAFINIZAÇÃO: o tecido estudado proveniente das biópsias de CCR foi desparafinado com imersões em xilol e rehidratado com banhos de álcool com concentrações decrescentes. Depois foi lavado em água corrente e destilada durante 5 minutos.

RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA: as lâminas foram inseridas em cubetas de material resistente acrescidas de solução tampão, a fim de conservar o material durante o processo de recuperação antigênica. O tampão utilizado foi Tris-EDTA pH 9,0, sendo sua escolha proveniente da recomendação sugerida pelo fabricante do anticorpo. As cubetas foram então colocadas em aparelho de aquecimento a vapor (*Steamer*) para realização da recuperação antigênica por calor, sendo que o mesmo foi previamente aquecido e configurado para promover temperatura com variações entre 90°C e 100°C durante 45 minutos. Depois de esperar o resfriamento das cubetas por aproximadamente 20 minutos, as lâminas foram lavadas com solução de PBS (NaCl 0,15M, tampão fosfato 0,01M, pH 7,4).

BLOQUEIO DA PEROXIDASE ENDÓGENA: A seguir, realizou-se o bloqueio da enzima endógena peroxidase com solução previamente preparada de peróxido de hidrogênio (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) a 3% que foi adicionada às cubetas durante 10 minutos. Após o tempo previsto as lâminas foram então duas vezes banhadas em solução de PBS e uma vez em solução TBS-Tween 20 (NaCl, Tris, HCl 1M, Água Destilada, pH 7,4 + Tween 20).

BLOQUEIO DA ENZIMA ENDÓGENA BIOTINA: as lâminas foram dispostas em bandejas específicas para o prosseguimento do experimento, sendo estas previamente umedificadas com papel de filtro embebido em água destilada. Durante o processo de disposição das lâminas na bandeja foi utilizada, quando necessário, solução de TBS-Tween 20 para evitar que os cortes secassem. As lâminas foram enxugadas, com devido cuidado em relação aos cortes histológicos e, em seguida, os mesmos foram delimitados com caneta hidrofóbica a fim de proporcionar melhor exposição aos reagentes aplicados na lâmina evitando a dispersão dos mesmos. Seguiu-se a aplicação de solução de leite em pó desnatado Molico (Nestlé Brasil LTDA, Brasil), devidamente preparado numa diluição de 3% em solução de Tris-HCl (Tris + Água Destilada, pH 7,6), sendo utilizado especificamente para o bloqueio da biotina endógena o sobrenadante desta solução obtido após centrifugação em velocidade de 3000 rpm por 10 minutos. O tempo de exposição ao leite desnatado foi de 10 minutos, com posterior e imediata aplicação dos anticorpos primários.

APLICAÇÃO DO ANTICORPO PRIMÁRIO: aplicou-se quantidade suficiente do Anticorpo Primário Monoclonal de Coelho Cyclin D1 clone SP4 (Cell Marque, Rocklin, CA, USA), diluído numa proporção de 1:200 com diluente BSA (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 0,005% em solução de Tris HCl pH 7,6 com Tween 20. O tempo de incubação foi de 2 horas. Após esse intervalo, as lâminas foram devidamente lavadas com solução de TBS-Tween 20 por três vezes.

APLICAÇÃO DO BLOQUEADOR PÓS-PRIMÁRIO: posteriormente, as lâminas foram incubadas com quantidades adequadas de bloqueador pós-primário (Novocastra, Newcastle, UK) por 30 minutos. Foram então novamente lavadas com solução de TBS-Tween 20 por três vezes.

AMPLIFICAÇÃO: a amplificação da expressão do anticorpo primário foi feita se utilizando de método indireto através do uso de Polímeros (Novocastra, Newcastle, UK), que foram aplicados aos cortes em quantidades suficientes para reagir em todo o material fixado na lâmina, por um tempo de 30 minutos. Seguiram-se então duas lavagens, uma com a solução de TBS-Tween 20 e a outra com a solução de Tris-HCl.

REVELAÇÃO: as reações foram reveladas incubando-se cada corte durante 6 a 10 minutos com quantidade suficiente do cromógeno 3,3' Diaminobenzidina (DAB, Sigma, St Louis, MO, USA, D5637-1G), que foi diluído em Tris-HCl na concentração de 1% para ser congelado e estocado em refrigerador. Apenas no dia do experimento foram feitas diluições da solução de estoque numa proporção de 1:24 também em tampão Tris-HCl, sendo acrescido de 2 a 4 microlitros de peróxido de hidrogênio para ativar as propriedades do cromógeno. Após o tempo de exposição, as lâminas foram lavadas com água destilada e posteriormente com água corrente em abundância. Os resíduos do cromógeno utilizado foram desprezados em recipiente específico para posterior tratamento e encaminhamento ao Laboratório de Resíduos Químicos da instituição.

CONTRACOLORAÇÃO E MONTAGEM: a contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris (MERCK KgaA Darmstadt, Germany). Os cortes foram desidratados em soluções de álcool e xilol e, posteriormente, houve a adição de lamínulas de tamanho 24,0 x 32,0 mm se utilizando de meio de montagem rápida Entellan (MERCK KgaA Darmstadt, Germany).

7. Quantificação da reação imunoistoquímica para Ciclina D1

A Ciclina D1, como componente do ciclo de divisão celular, é marcador nuclear e sua expressão foi considerada positiva quando o núcleo da célula encontrava-se marcado de maneira precisa e homogênea, não deixando dúvida quanto ao resultado. A análise de sua expressão foi realizada por método semi-quantitativo, de duas maneiras:

- ✓ De acordo com o número de células tumorais positivas por campo de grande aumento (cga) e intensidade de marcação, conforme Tabela 1.

- ✓ De acordo com a porcentagem de células tumorais marcadas em toda a lâmina, independente de sua intensidade, conforme Tabela 2.

Tabela 1 – Categorias de expressão da Ciclina D1 pela quantidade e intensidade de marcação

Categoria de Expressão	Definição
1	Ausência de núcleos positivos
2	Baixo número de núcleos positivos (≤ 10 células marcadas/cga)
3	Moderado a alto número de núcleos positivos (> 10 células marcadas/cga) e baixa intensidade de marcação
4	Moderado a alto número de núcleos positivos (> 10 células marcadas/cga) e alta intensidade de marcação

Fonte: Adaptado de Hedberg, *et al*, 2003

Tabela 2 – Categorias de expressão da Ciclina D1 pela porcentagem de marcação na lâmina

Categoria de Expressão	Definição
1	Ausência de núcleos positivos
2	Até 30% de marcação nuclear
3	Acima de 30% e até 60% de marcação nuclear
4	Acima de 60% de marcação nuclear

As categorias 1 e 2 de ambas as formas de classificação foram considerados como tumores com baixa expressão da proteína Ciclina D1, enquanto as categorias 3 e 4 como tumores com alta expressão protéica. Para os tumores multifocais, considerou-se a marcação de Ciclina D1 da lesão de pior histologia (maior grau nuclear) ou da maior lesão, caso todas elas exibissem aspecto semelhante.

8. Análise estatística

Inicialmente, foi elaborado um banco de dados eletrônico no Microsoft Excel®, contendo todas as informações da pesquisa. Seguiu-se uma descrição das variáveis por meio de tabelas de frequências para as variáveis qualitativas e estatísticas descritivas para as variáveis quantitativas.

Para verificar a associação entre as variáveis qualitativas foi proposto o teste Qui-quadrado e para as variáveis quantitativas, o teste t-Student para amostras independentes. A comparação de 3 ou mais grupos independentes foi feita através da análise de variância (ANOVA).

A análise de sobrevida foi realizada através de curvas de Kaplan-Meier. O teste de Log-rank foi utilizado para verificar se existiam diferenças entre as curvas. O tempo de

sobrevida foi medido a partir da realização da cirurgia até a ocorrência de óbito pelo CCR ou até a última análise de prontuários.

Para avaliar a capacidade preditiva de prognóstico da variável Ciclina D1 foi proposta a regressão logística simples e múltipla, a fim de calcular o *Odds Ratio* bruto e ajustado, respectivamente. A curva ROC (*receiver operating characteristic*) também foi utilizada para o mesmo fim, comparando os modelos com e sem esta variável. A área sob a curva ROC (ASC) é uma medida resumo usual do desempenho de um teste. Quanto maior a capacidade do teste em discriminar os indivíduos, mais a curva se aproxima do canto superior esquerdo do gráfico e a área sob a curva se aproxima de 1.

Os resultados foram obtidos com o auxílio do *software* SAS® 9 e para elaboração dos gráficos foi utilizado o *software* R. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Análises estatísticas preliminares foram realizadas através do programa eletrônico GraphPad Prism 5®.

O Centro de Métodos Quantitativos (CEMEQ) do HC FMRP-USP prestou auxílio estatístico ao estudo.

RESULTADOS

1. Descrição geral da amostra

No intervalo de janeiro/2005 a dezembro/2010 foram levantados 119 casos de CCR no SERPAT, correspondendo a 86,23% dos tumores malignos primários do rim encontrados no mesmo período. Destes, 10 foram excluídos da pesquisa: 03 por se tratarem de recidivas de tumor renal primário anterior ao período de estudo, 01 por não possuir registro/prontuário no HC, 05 por corresponderem a biópsia e 01 por ter havido perda do tecido tumoral durante o reprocessamento histológico para realização da reação imunoistoquímica. O número final de casos analisados no trabalho foi, portanto, de 109.

A Tabela 3 resume as características demográficas, laboratoriais e clínicas, bem como os fatores de risco para CCR observados na amostra. Dentre os 109 pacientes, 75 (68,80%) pertenciam ao gênero masculino, numa razão de 2,2 ♂:1 ♀. A idade variou entre 12 e 89 anos, com média de 58,54 ($\pm 13,53$). A distribuição dos casos por décadas demonstrou que a grande maioria ocorreu entre 40 e 79 anos (101; 92,66%), com destaque para o número de casos entre a sexta e sétima décadas (62; 56,88%) (Gráfico 1). Com relação à raça, a maior parte dos pacientes era da raça branca (88; 80,73%).

Gráfico 1 – Distribuição dos casos por faixa etária (em anos)

2. Fatores de risco

História de tabagismo foi verificada em 59 pacientes (54,12%), independente de ser pregressa ou atual, da quantidade e tipo de fumo utilizado ou da duração do hábito. Em 10 prontuários médicos essa informação não era relatada.

Houve dificuldade em analisar história de etilismo. Na maioria dos prontuários, não havia relato do tipo de bebida alcoólica ou quantificação de sua ingestão. Dezoito pacientes

(16,51%) apresentavam consumo leve e 25 (22,93%) apresentavam consumo moderado/severo. Em 26 prontuários médicos essa informação não era relatada.

A presença de obesidade foi verificada a partir do cálculo do IMC com dados de peso (Kg) e altura (cm). A maior parte dos pacientes encontrava-se na categoria Sobrepeso ao diagnóstico do CCR (34; 31,19%), seguido por Peso Normal (32; 29,35%) (dados não mostrados). De um modo geral, 59 pacientes (54,12%) encontravam-se acima do referencial normal. Em 11 prontuários não havia informação quanto ao peso e/ou altura, impossibilitando a classificação do paciente pelo IMC.

Setenta e dois pacientes (66,05%) apresentavam hipertensão arterial. Não foi possível analisar o nível pressórico, tempo de doença e medicamentos utilizados devido à dificuldade em se trabalhar com dados pontuais de prontuário.

Vinte e cinco pacientes (22,93%) apresentavam Diabetes Mellitus (DM). Dentre eles, 07 (28%) faziam uso de insulina.

Pela dificuldade em se definir presença de Doença Renal Crônica Adquirida através da análise dos prontuários, optou-se por estudar casos com IRC. Dezesesseis pacientes (14,67%) apresentavam IRC, 06 destes em estágio terminal: 02 eram transplantados renais e 04 encontravam-se em hemodiálise, com duração variando entre 3 meses e 8 anos.

Apenas 01 paciente relatava história de radioterapia prévia: braquiterapia pélvica para tratamento de rabdomiossarcoma cerca de 10 anos antes do diagnóstico de CCR.

História pessoal de neoplasia maligna em algum momento da vida foi verificada em 19 pacientes (17,43%). Neoplasias malignas de Vias Urinárias foram as mais frequentes (Gráfico 2). Já história familiar de neoplasia maligna foi verificada em 28 pacientes (25,68%). Considerou-se história positiva apenas em parentes de primeiro grau (pai, mãe, irmãos e/ou filhos). Em 20 prontuários médicos essa informação não era relatada. Neoplasias malignas do Trato Gastrointestinal foram as mais frequentes (Gráfico 3). Não houve pacientes com história familiar de CCR.

História de litíase em trato urinário e/ou de Infecção do Trato Urinário (ITU) foi verificada em 30 pacientes (27,52%). Ao se considerar presença de qualquer desordem urológica (litíase, ITU, gota/hiperuricemia, IRC em qualquer estágio, VHL com cistos renais, múltiplos cistos renais simples), 53 pacientes (48,62%) relatavam alguma dessas condições.

Com relação a outras condições/doenças associadas, 04 pacientes (3,66%) apresentavam história clínica de VHL. Em 02 deles, a doença foi confirmada por exame genético. Dois pacientes apresentavam história de Linfoma, ambos Não Hodgkin de Grandes Células Tipo B. Dois casos de CCR surgiram em rim nativo de pacientes pós-transplante renal

(após 1 mês e 11 anos do transplante). Não havia relato de Esclerose Tuberosa, Leiomiomatose Hereditária, Nefroma Multicístico ou Doença Renal Policística do Adulto nos prontuários revisados.

Gráfico 2 - História pessoal de neoplasia maligna Gráfico 3 - História familiar de neoplasia maligna

A profissão dos pacientes foi pesquisada, porém não demonstrou ser um dado fidedigno para a análise indireta de exposição ocupacional a substâncias nocivas ao rim. Atividade física, fatores dietéticos, fatores hormonais e reprodutivos e uso de analgésicos não foram pesquisados devido à escassez de dados nos prontuários médicos.

3. Análise laboratorial

A presença de anemia foi analisada a partir do valor de hemoglobina pré-operatória. Segundo os valores de referência para normalidade do Sistema Operacional do HC FMRP (12,0 a 15,5 g/dL para mulheres e 13,5 a 17,5 g/dL para homens), 48 pacientes (44,03%) apresentavam anemia e em um caso essa informação não era relatada.

De uma maneira geral, o ponto de corte considerado normal para creatinina sérica foi $< 1,5$ mg/dL. Vinte e três pacientes (21,10%) apresentavam creatinina sérica elevada anterior à cirurgia para CCR. Informação não encontrada em um dos casos.

O valor normal para a hematúria detectada em exame de urina foi considerado < 5 hemácias/campo. Vinte e sete pacientes (24,77%) apresentavam hematúria detectada em exame de urina pré-operatório. Ao somarmos o achado de hematúria através do exame ao relato de sangramento urinário pelo paciente como forma de apresentação clínica da doença, esse número passa para 47 (43,11%). Em 10 prontuários não havia essa informação.

Tabela 3 – Descrição de características demográficas, laboratoriais e clínicas e fatores de risco para CCR

Características	Número	Porcentagem
Idade (anos)		
Média $\pm$ DP; mediana (mín-máx)	58,54 $\pm$ 13,53; 59 (12-89)	
Sexo		
Feminino	34	31,19%
Masculino	75	68,8%
Raça		
Branca	88	80,73%
Negra	6	5,5%
Parda	15	13,76%
História de tabagismo	59	54,12%
Não relatado	10	9,17%
História de etilismo	43	39,44%
Não relatado	26	23,85%
IMC acima do referencial normal	59	54,12%
Não relatado	11	10,09%
Hipertensão arterial	72	66,05%
Diabetes Mellitus	25	22,93%
IRC	16	14,67%
Radioterapia prévia	01	0,91%
História pessoal de neoplasia maligna	19	17,43%
História familiar de neoplasia maligna	28	25,68%
Não relatado	20	18,34%
Desordens urológicas	53	48,62%
Doença de Von Hippel-Lindau	04	3,66%
Presença de anemia (análise de Hb)	48	44,03%
Não relatado	01	0,91%
Creatinina sérica elevada	23	21,1%
Não relatado	01	0,91%
Hematúria (macro e/ou microscópica)	47	43,11%
Não relatado	10	9,17%
Pacientes sintomáticos	69	63,3%
Lateralidade (maior lesão)		
Rim esquerdo	56	51,37%
Bilateralidade ao diagnóstico	09	8,25%
Local da maior lesão		
Pólo superior	38	34,86%
Terço médio	17	15,59%
Pólo inferior	50	45,87%
Todo o rim	02	1,83%
Não relatado	02	1,83%
Tipo de Cirurgia		
NT	43	39,44%
NT + A	39	35,77%
NP	24	22,01%
NP + A	03	2,75%
Tamanho tumoral (cm)		
Média $\pm$ DP; mediana (mín-máx)	6,17 $\pm$ 3,19; 5,5 (1,0-15,0)	

DP = Desvio-padrão. Hb = Hemoglobina. NT = Nefrectomia Total; NP = Nefrectomia Parcial; A = Adrenalectomia

4. Formas de Apresentação Clínica

4.1 Sintomatologia

Em 40 casos (36,69%), os pacientes não apresentavam queixas e a presença do tumor foi um achado acidental em exame de imagem (US ou TC). Dentre esses casos, 09 foram evidenciados em seguimento ou estadiamento de outras neoplasias malignas do indivíduo e 04 em investigação de VHL.

Dentre os pacientes sintomáticos (63,30%), as queixas mais comuns eram de dor abdominal (37; 53,62%), hematúria (34; 49,27%), massa abdominal palpável (16; 23,18%) e manifestações paraneoplásicas (37; 53,62%). A tríade clássica composta por hematúria, dor abdominal e massa abdominal palpável foi verificada em apenas 06 casos (Gráfico 4). As manifestações paraneoplásicas incluíram perda de peso (32/37), sintomas causados por depósitos metastáticos (5/37), febre (4/37), anemia (4/37), náuseas e vômitos (4/37), astenia (2/37) e mal estar generalizado (1/37).

Gráfico 4 - Apresentação clínica (Número de casos)

4.2 Lateralidade e Local da Maior Lesão

A lesão, ou a maior lesão no caso de multifocalidade ao diagnóstico, localizava-se no rim esquerdo em 56 casos (51,37%). O restante acometia o rim contralateral. Havia tumores bilaterais ao diagnóstico em 09 casos (8,25%).

Quanto ao local da maior lesão, a maior parte acometia o Pólo Inferior (50; 45,87%), enquanto 02 tumores (1,83%) ocupavam todo o rim. Em 02 casos não havia essa informação, tanto em exames de imagem quanto macroscópico.

4.3 Tipo de Cirurgia para a Maior Lesão

Optou-se por Nefrectomia Total (NT) com ou sem adrenalectomia na maior parte dos casos (82; 75,23%). Nefrectomia Parcial (NP) com ou sem adrenalectomia foi realizada em 27 pacientes (24,77%).

4.4 Tamanho da Maior Lesão

O tamanho da lesão, ou da maior lesão no caso de tumores multifocais, variou de 1,0 cm a 15,0 cm, com média de 6,17 cm ($\pm 3,19$).

Baseando-se no *American Joint Committee on Cancer TNM Staging of Renal Cell Carcinoma* (2002) (GREENE FL, 2002), os dados referentes ao tamanho da maior lesão foram distribuídos em menor ou igual a 4,0 cm (34; 31,19%), maior que 4,0 cm e menor ou igual a 7,0 cm (39; 35,77%) e maior que 7,0 cm (36; 33,02%), conforme o Gráfico 5.

Gráfico 5 - Tamanho da maior lesão (Número de casos)

Analisando-se a relação entre as variáveis laboratoriais e o tamanho tumoral, verificamos que houve associação apenas entre a presença de hematúria macro e/ou microscópica e o tamanho da maior lesão ($p < 0,0001$). A maior parte dos tumores maiores que 4,0 cm estavam associados a aparecimento de hematúria macro e/ou microscópica nos pacientes. O oposto foi observado para tumores menores ou iguais a 4,0 cm. Já com relação à forma de apresentação clínica da doença, observou-se que os pacientes sintomáticos estavam associados a tumores maiores que 4,0 cm (Tabela 4).

De acordo com o Gráfico 6, também a média do tamanho tumoral era maior para os pacientes sintomáticos (7,46 cm $\pm$ 3,14, variando de 1,8 a 15,0 cm) em relação aos assintomáticos (3,95 cm $\pm$ 1,76, variando de 1,0 a 10,0 cm).

Tabela 4 – Relação entre variáveis laboratoriais e apresentação clínica e o tamanho da maior lesão

Variáveis	Categorias	Tamanho		Total	p*
		≤ 4,0cm	> 4,0cm		
Anemia	Não	22 (36,67%)	38 (63,33%)	60	0,19
	Sim	12 (25%)	36 (75%)	48	
	Total	34	74	108	
	Frequência de perdas = 1				
Creatinina sérica	Normal	27 (31,76%)	58 (68,24%)	85	0,90
	Alta	7 (30,43%)	16 (69,57%)	23	
	Total	34	74	108	
	Frequência de perdas = 1				
Hematúria	Não	25 (48,08%)	27 (51,92%)	52	< 0,0001
	Sim	5 (10,64%)	42 (89,36%)	47	
	Total	30	69	99	
	Frequência de perdas = 10				
Apresentação	Assintomático	25 (62,5%)	15 (37,5%)	40	< 0,0001
	Sintomático	9 (13,04%)	60 (86,96%)	69	
	Total	34	75	109	

* Teste Qui-quadrado

Gráfico 6 - Diferença da média do tamanho tumoral entre os pacientes assintomáticos e sintomáticos (valor de p pelo teste t-Student).

5. Dados Histológicos

5.1 Diagnóstico

As características histológicas encontram-se resumidas na Tabela 5. A maior parte dos casos era CCR do tipo células claras (78), seguido por papilífero (12) e cromóforo (7). Dentre os casos de CCR papilífero, 09 pertenciam ao subtipo 1 e 03 ao subtipo 2. Dos 03 casos de CCR inclassificável, 02 exibiam extenso componente sarcomatoso.

Apenas um caso foi diagnosticado como do tipo Carcinoma renal associado à Translocação Xp11.2/Fusões do Gene TFE3, inclusive com confirmação genética. Esse caso corresponde ao único paciente de faixa etária pediátrica da pesquisa (12 anos de idade). Diagnosticado também apenas 01 caso de CCR associado a doença renal cística adquirida em paciente que desenvolveu IRC terminal, em hemodiálise há 8 anos. Os casos classificados como Misto (4) apresentavam associação de mais de uma neoplasia ao diagnóstico, pertencentes a diferentes tipos de CCR.

A maioria dos casos de CCR de células claras acometeu pacientes do sexo masculino, sendo também mais comum entre as mulheres da amostra. Todos os casos de CCR papilífero ocorreram em homens. Já o tipo cromóforo foi mais comum entre os pacientes do sexo feminino (Tabela 6). Não houve associação estatisticamente significativa entre tipo de CCR diagnosticado e idade ou raça ($p > 0,05$, pelo teste Qui-quadrado).

Tabela 6 – Relação entre sexo e tipo de CCR diagnosticado

Variável	Categorias	Tipo de CCR				Total	p*
		Células claras	Papilífero	Cromóforo	Outros		
Sexo	F	26 (76,47%)	0	5 (14,71%)	3 (8,82%)	34	0,011
	M	52 (69,33%)	12 (16%)	2 (2,67%)	9 (12%)	75	
	Total	78	12	7	12	109	

* Teste Qui-quadrado

De acordo com o Gráfico 7, o CCR de células claras apresentou maior média de tamanho tumoral ($6,47 \text{ cm} \pm 3,16$; 1,4 -15,0 cm) em relação ao cromóforo ($5,33 \text{ cm} \pm 2,42$; 2,5- 9,5 cm) e ao papilífero ($5,03 \text{ cm} \pm 3,32$; 1,3 -14,0 cm). No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

5.2 Grau Nuclear de Fuhrman

A distribuição dos casos pelo grau nuclear seguiu a classificação de Fuhrman (Tabela 7) (FUHRMAN;LASKY e LIMAS, 1982). Conforme Tabela 5, a maior parte dos tumores

exibia grau nuclear 2 (56), seguido pelo grau 3 (28). Para fins estatísticos, os casos foram divididos entre grau de Fuhrman baixo (1 ou 2) e alto (3 ou 4).

Gráfico 7 - Média do tamanho tumoral para os 3 tipos de CCR mais prevalentes da amostra (valor de p pelo teste ANOVA)

Tabela 7 – Grau nuclear de Fuhrman

Grau 1	Núcleo arredondado e uniforme, com cerca de 10 µm de diâmetro e nucléolo ausente/pequeno
Grau 2	Núcleo levemente irregular, com diâmetro de 15 µm e nucléolo visível, mas pequeno
Grau 3	Núcleo moderadamente irregular, com diâmetro de 20 µm e nucléolo grande
Grau 4	Núcleo acentuadamente irregular/pleomórfico e formas multilobulares, com cromatina agrupada e diâmetro maior que 20 µm

A maior parte dos casos de grau nuclear alto ocorreu entre os homens, enquanto a maior parte dos pacientes do sexo feminino apresentou grau nuclear baixo (Tabela 8). Não houve associação entre grau nuclear de Fuhrman e idade (≤ 50 , > 50 e ≤ 70 , > 70 anos), raça ou tipo de CCR (células claras *versus* não células claras; $p > 0,05$, pelo teste Qui-quadrado).

5.3 Demais características histológicas

As demais características histológicas encontram-se resumidas na Tabela 5. Apenas 02 casos apresentavam invasão da Veia Cava Inferior, além dos vasos hilares. De um modo

geral, 22 casos apresentavam invasão vascular (microvascular e/ou de grandes vasos). Considerando-se extensão peri-renal com ou sem invasão da adrenal eram 19 casos.

Tabela 8 – Relação entre sexo e grau nuclear de Fuhrman

Variável	Categorias	Fuhrman		Total	p*
		Baixo	Alto		
Sexo	F	28 (82,35%)	6 (17,65%)	34	0,002
	M	39 (52%)	36 (48%)	75	
	Total	67	42	109	

* Teste Qui-quadrado

Tabela 5 – Descrição de características histológicas e estadiamento clínico

Características	Número	Percentagem
Tipo Histológico		
Células Claras	78	71,55%
Papilífero	12	11%
Cromóforo	7	6,42%
Cístico Multilocular	3	2,75%
CCR associado à Translocação Xp11.2/Fusões do Gene TFE3	1	0,91%
CCR associado a doença renal terminal	1	0,91%
Inclassificável	3	2,75%
Misto	4	3,66%
Grau nuclear		
1	11	10,09%
2	56	51,37%
3	28	25,68%
4	14	12,84%
Necrose	62	56,88%
Diferenciação Sarcomatóide	12	11%
Invasão de Grandes Vasos (hiliares)	14	12,84%
Invasão Microvascular	14	12,84%
Invasão Hilar	19	17,43%
Invasão de Ureter	2	1,83%
Invasão Capsular	39	35,77%
Extensão Peri-renal	17	15,59%
Extensão para Adrenal	4	3,66%
Infiltrado Linfocitário	55	50,45%
Margens Cirúrgicas Comprometidas	8	7,33%
Grupo de Estágio (TNM)		
I	62	56,88%
II	13	11,92%
III	18	16,51%
IV	16	14,67%
Extensão da Doença ao Diagnóstico		
Localizada	75	68,8%
Localmente Avançada	17	15,59%
Metastática	17	15,59%

5.4 Estadiamento Anatomopatológico e Clínico

A avaliação do estadiamento anatomopatológico e clínico se baseou no *American Joint Committee on Cancer TNM Staging of Renal Cell Carcinoma* (2002) (GREENE FL, 2002) (Anexo B). A Tabela 9 mostra a distribuição dos casos de acordo com esses itens.

Pela análise do tumor primário (T), a maioria dos casos pertencia ao estágio T1 (64). Nenhum caso classificava-se como T4. Com relação à presença de metástase em linfonodos regionais (N), apenas 01 caso apresentava metástase em um linfonodo e 05 casos em mais de um linfonodo. Metástase à distância no momento do diagnóstico (M) foi observada em 13 casos. Uma análise mais aprofundada será realizada em tópico pertinente. O grupo de estágio clínico mais prevalente na amostra foi I (62), seguido por III (18). Para fins estatísticos, os casos foram divididos entre grupo de estágio baixo (I ou II) e alto (III ou IV).

Tabela 9 – Distribuição dos casos segundo Estadiamento Anatomopatológico e Clínico

pT				pN		pM		Grupos	
pT1	64 (58,71%)	pT1a	34 (53,12%)	pN0	103 (94,49%)	pM0	96 (88,07%)	I	62 (56,88%)
		pT1b	30 (46,87%)	pN1	01 (0,91%)	pM1	13 (11,92%)	II	13 (11,92%)
pT2	14 (12,84%)			pN2	05 (4,58%)			III	18 (16,51%)
pT3	31 (28,44%)	pT3a	17 (54,83%)					IV	16 (14,67%)
		pT3b	13 (41,93%)						
		pT3c	01 (3,22%)						
pT4	0								

De acordo com a Tabela 10, os casos com grau nuclear de Fuhrman baixo, em geral, correspondiam a grupos de estágio baixo, enquanto os casos com grau nuclear alto pertenciam a grupos de estágio alto. Relação semelhante foi verificada para os casos de CCR de células claras ($p = 0,0002$, teste Qui-quadrado). Também se observou associação entre presença de diferenciação sarcomatóide e grupo de estágio clínico alto, o oposto sendo notado para os casos que não apresentavam essa característica.

Tabela 10 – Relação entre Grau nuclear e Diferenciação Sarcomatóide e o Grupo de estágio clínico

Variáveis	Categorias	Grupo de Estágio		Total	p*
		Baixo	Alto		
Fuhrman	Baixo	56 (83,58%)	11 (16,42%)	67	< 0,0001
	Alto	19 (45,24%)	23 (54,76%)	42	
Diferenciação Sarcomatóide	Não	71 (73,2%)	26 (26,8%)	97	0,004
	Sim	4 (33,33%)	8 (66,67%)	12	
Total		75	34	109	

* Teste Qui-quadrado

Com relação à extensão da doença no momento do diagnóstico, 75 casos (68,8%) apresentavam-se de forma Localizada (T1-2 N0 M0), 17 de forma Localmente Avançada (T3-4 N0 M0) e 17 como Doença Metastática (T1-4 N1-2 M0; T1-4 N0-N2 M1). De maneira geral, os casos localizados exibiam baixo grau nuclear, enquanto os casos já metastáticos ao diagnóstico exibiam Fuhrman alto, tanto para o total de casos quanto para o CCR de células claras isoladamente (Tabela 11).

Tabela 11 – Relação entre extensão da doença no momento do diagnóstico e grau nuclear de Fuhrman

Variável	Categorias	CCR				CCR de Células Claras			
		Fuhrman		Total	p*	Fuhrman		Total	p*
		Baixo	Alto			Baixo	Alto		
Extensão da doença ao diagnóstico	L	56 (74,67%)	19 (25,33%)	75	<0,0001	38 (77,55%)	11 (22,45%)	49	<0,0001
	LA	9 (52,94%)	8 (47,06%)	17		8 (57,14%)	6 (42,86%)	14	
	M	2 (11,76%)	15 (88,24%)	17		2 (13,33%)	13 (86,67%)	15	
	Total	67	42	109		48	30	78	

L = Localizada; LA = Localmente Avançada; M = Metastática. * Teste Qui-quadrado.

6. Seguimento Clínico

O intervalo do seguimento variou de 01 dia a 79 meses, com média de 23,23 meses $\pm$ 18,03 (IC 19,81-26,66). Vinte e cinco casos (22,93%) perderam seguimento no Hospital das Clínicas/FMRP. Destes, apenas 12 (11% do total) perderam seguimento com menos de 12 meses de avaliação.

6.1 Multifocalidade e Recidiva

Foram considerados multifocais os tumores múltiplos que acometiam o mesmo rim ou rim contralateral no momento do diagnóstico. Podiam exibir histologia semelhante ou não, nesse último caso, considerados mistos ao diagnóstico. Catorze pacientes (12,84%) apresentavam lesões multifocais ao diagnóstico, sendo 09 (8,25%) bilaterais. O número de lesões variou de 02 a 04.

Recidiva/recorrência foi considerada quando nova lesão de mesma histologia da lesão primária surgia no mesmo rim ou no rim contralateral na ausência de metástase à distância, independente do tempo transcorrido desde a cirurgia. Para fins do estudo, foram consideradas recidivas todas as lesões que surgiram em exames de imagem após o tratamento cirúrgico com características compatíveis com tumor. Havendo dúvida quanto à sua natureza, um

especialista em radiologia foi consultado. Seis casos (5,5%) apresentaram recidiva tumoral, sendo apenas 01 em rim contralateral. Dentre os casos de recidiva, apenas 02 exibiam grau nuclear alto (Fuhrman 3) na lesão inicial. Houve associação estatisticamente significativa entre os casos que apresentavam multifocalidade e recidiva tumoral (Tabela 12).

Tabela 12 – Relação entre multifocalidade e recidiva tumoral

Variável	Categorias	Recidiva		Total	p*
		Não	Sim		
Multifocalidade	Não	93 (97,89%)	2 (2,11%)	95	< 0,0001
	Sim	10 (71,43%)	4 (28,57%)	14	
	Total	103	6	109	

* Teste Qui-quadrado

Com relação aos portadores da Doença de Von Hippel Lindau, 03 deles apresentavam multifocalidade. A Tabela 13 mostra as características desses tumores.

Tabela 13 – Análise das lesões tumorais dos portadores de Doença VHL

Casos VHL	Multifocalidade	Lateralidade	Tipo de CCR	Número de lesões	Fuhrman	Recidiva
1	Multifocal	Bilateral	Células claras	03	1	-
2	Multifocal	Bilateral	Células claras	02	2	45 meses, D
3	Multifocal	Unilateral, E	Células claras	03	2	12 meses, E
4	Lesão Única	E	Células claras	01	1	7 meses, D

6.2 Metástase

Metástase para rim foi considerada quando a lesão acometia rim o contralateral, possuía a mesma histologia da lesão primária e ocorria na presença de metástase para outros órgãos. Não houve metástase para rim contralateral na amostra.

Ao final do seguimento clínico, observou-se metástase à distância em 15 casos. Considerando-se metástases para outros órgãos e/ou para linfonodos regionais eram 20 casos (18,34%) com lesões disseminadas após o tempo de seguimento. O tempo decorrido entre o diagnóstico e o surgimento da primeira metástase variou de 2 a 4 meses. Os locais mais acometidos por metástases foram pulmão/pleura (13; 11,92%), osso (10; 9,17%) e SNC (7; 6,42%), conforme Gráfico 8.

A maior parte dos casos metastáticos era do tipo células claras (17/20), seguido por inclassificável (02/20) e misto (01/20). Os casos metastáticos apresentaram boa concordância com o alto grau nuclear observado no tumor primário tanto para o total de casos, quanto para CCR de células claras (Tabela 14).

Gráfico 8 – Local de metástases entre casos disseminados ao final do seguimento (Número de casos)

Tabela 14 – Relação entre metástase e grau nuclear de Fuhrman

		CCR				CCR de Células Claras			
Variável	Categorias	Fuhrman		Total	p*	Fuhrman		Total	p*
		Baixo	Alto			Baixo	Alto		
Metástase	Não	65 (73,03%)	24 (26,97%)	89	<0,0001	46 (75,41%)	15 (24,59%)	61	<0,0001
	Sim	2 (10%)	18 (90%)	20		2 (11,76%)	15 (88,24%)	17	
	Total	67	42	109		48	30	78	

* Teste Qui-quadrado

6.3 Óbito

De modo geral, ocorreram 21 óbitos (19,26%). No entanto, a mortalidade específica da doença foi de 13,76% (15 casos). As demais causas de óbito contribuíram com apenas um caso para cada, conforme Gráfico 9. O tempo decorrido entre o tratamento cirúrgico e a ocorrência do óbito provocado pela doença variou de 03 dias (complicações transoperatórias) a 47 meses. CCR de células claras foi o tipo mais frequente entre os óbitos (12/15), seguido por inclassificável (02/15) e misto (01/15).

Dentre os óbitos ocasionados pelo CCR, havia metástase à distância e/ou para linfonodos regionais em 11 pacientes. Não havia metástase de CCR nos casos de óbito por outras causas. Houve boa associação entre ocorrência de óbito por CCR e metástase (Tabela 15). Entre os pacientes vivos após o seguimento, a maioria não apresentava metástase, o oposto ocorreu entre os pacientes que morreram pela doença, tanto para o total de casos, quanto para CCR de células claras isoladamente. Somente 01 caso de óbito por CCR apresentou recidiva tumoral, sendo também multifocal ao diagnóstico.

Gráfico 9 - Causas de óbito

Tabela 15 – Relação entre metástase e óbito por CCR

Variável	Categorias	CCR				CCR de Células Claras			
		Metástase		Total	p*	Metástase		Total	p*
		Não	Sim			Não	Sim		
Óbito	Não	85 (90,43%)	9 (9,57%)	94	<0,0001	58 (87,88%)	8 (12,12%)	66	<0,0001
	Sim	4 (26,67%)	11 (73,33%)	15		3 (25%)	9 (75%)	12	
	Total	89	20	109		61	17	78	

* Teste Qui-quadrado

O Gráfico 10 mostra a curva de sobrevivência (Kaplan-Meier) de acordo com a extensão da doença ao diagnóstico para o total de casos. Apenas 02 casos de óbito ocorreram entre pacientes com doença Localizada e 03 com doença Localmente Avançada ao diagnóstico. Houve diferença estatística entre as curvas pelo teste de Log-Rank ($p < 0,0001$).

6.4 Evolução Clínica

Os casos de má evolução clínica incluíram aqueles em que ocorreram óbito pelo CCR e/ou metástase para linfonodos regionais e/ou à distância em qualquer momento do seguimento do paciente. Para o total de casos, 24 pacientes (22,01%) apresentaram má evolução e 85 (77,98%) boa evolução clínica. Para CCR de células claras, 20 pacientes (25,64%) apresentaram má evolução e o restante (58; 74,35%), boa evolução clínica.

Não houve associação estatisticamente significativa entre evolução clínica e tipo de CCR (células claras x não células claras), idade (≤ 50 , > 50 e ≤ 70 , > 70 anos) ou raça pelo teste Qui-quadrado ($p > 0,05$). As mulheres, em geral, exibiram boa evolução clínica, enquanto a maior parte dos casos de má evolução era do sexo masculino (Tabela 16). Ainda de acordo com a Tabela 16, os pacientes assintomáticos apresentaram boa evolução, enquanto

a maioria dos pacientes que apresentou má evolução exibia sintomas ao diagnóstico. O mesmo foi observado para os casos de CCR de células claras isoladamente. Também houve associação entre tamanho da maior lesão e evolução clínica. Todos os tumores pequenos ($\leq 4,0$ cm) apresentaram boa evolução clínica.

Gráfico 10 - Curva de sobrevida de acordo com a extensão da doença ao diagnóstico (valor de p pelo teste Log-Rank). L = Localizada; LA = Localmente Avançada; M = Metastática

Tabela 16 – Relação entre variáveis clínico-epidemiológicas e evolução clínica

Variáveis	Categorias	CCR				CCR de Células Claras			
		Evolução		Total	p*	Evolução		Total	p*
		Boa	Má			Boa	Má		
Sexo	F	31 (91,18%)	3 (8,82%)	34	0,025	23 (88,46%)	3 (11,54%)	26	0,043
	M	54 (72%)	21 (28%)	75		35 (67,31%)	17 (32,69%)	52	
Apresentação	Assintomático	39 (97,5%)	1 (2,5%)	40	0,0002	26 (96,3%)	1 (3,7%)	27	0,0012
	Sintomático	46 (66,67%)	23 (33,33%)	69		32 (62,75%)	19 (37,25%)	51	
Tamanho tumoral	$\leq 4,0$ cm	34 (100%)	0	34	0,0002	21 (100%)	0	21	0,0016
	$> 4,0$ cm	51 (68%)	24 (32%)	75		37 (64,91%)	20 (35,09%)	57	
Total		85	24	109		58	20	78	

* Teste Qui-quadrado

Analisando-se os fatores de prognósticos bem estabelecidos na literatura (grupo de estágio clínico, grau nuclear de Fuhrman, diferenciação sarcomatóide e necrose), observou-se associação bastante significativa com a evolução clínica em todos eles, tanto para o total de casos quanto para o CCR de células claras isoladamente (Tabela 17). De um modo geral, grupo de estágio clínico baixo, grau nuclear baixo, ausência de diferenciação sarcomatóide e de necrose ao exame histológico estiveram associados a boa evolução clínica, ou seja, melhor prognóstico. O oposto foi verificado para os casos de má evolução clínica.

Tabela 17 – Relação entre fatores prognósticos clássicos e evolução clínica

Variáveis	Categorias	CCR				CCR de Células Claras			
		Evolução		Total	p*	Evolução		Total	p*
		Boa	Má			Boa	Má		
Grupo de Estágio	Baixo	72 (96%)	3 (4%)	75	<0,0001	46 (93,88%)	3 (6,12%)	49	<0,0001
	Alto	13 (38,24%)	21 (61,76%)	34		12 (41,38%)	17 (58,62%)	29	
Fuhrman	Baixo	63 (94,03%)	4 (5,97%)	67	<0,0001	44 (91,67%)	4 (8,33%)	48	<0,0001
	Alto	22 (52,38%)	20 (47,62%)	42		14 (46,67%)	16 (53,33%)	30	
Diferenciação Sarcomatóide	Não	82 (84,54%)	15 (15,46%)	97	<0,0001	56 (80%)	14 (20%)	70	0,0007
	Sim	3 (25%)	9 (75%)	12		2 (25%)	6 (75%)	8	
Necrose	Não	45 (95,74%)	2 (4,26%)	47	<0,0001	32 (94,12%)	2 (5,88%)	34	0,0004
	Sim	40 (64,52%)	22 (35,48%)	62		26 (59,09%)	18 (40,91%)	44	
Total		85	24	109		58	20	78	

* Teste Qui-quadrado

Não foi possível analisar a relação entre evolução clínica e os fatores prognósticos para os casos de CCR papilífero e cromóforo isoladamente, pois não havia casos de má evolução para ambos os tipos de CCR na amostra.

Com relação aos demais aspectos histológicos analisados, a maioria dos casos que não exibiu essas variáveis apresentou boa evolução clínica (Tabela 18). A variável Invasão Vascular incluiu invasão de grandes vasos e/ou de microvasculatura tumoral.

Não se observou associação estatisticamente significativa entre evolução clínica e multifocalidade ao diagnóstico ou recorrência tumoral ($p > 0,05$, teste Qui-quadrado).

Tabela 18 – Relação entre demais aspectos histológicos e evolução clínica para o total de casos

Variáveis	Categorias	Evolução		Total	p*
		Boa	Má		
Invasão Vascular	Não	75 (86,21%)	12 (13,79%)	87	< 0,0001
	Sim	10 (45,45%)	12 (54,55%)	22	
Invasão hilar e/ou ureter	Não	77 (85,56%)	13 (14,44%)	90	< 0,0001
	Sim	8 (42,11%)	11 (57,89%)	19	
Extensão peri-renal e/ou adrenal	Não	81 (90%)	9 (10%)	90	< 0,0001
	Sim	4 (21,05%)	15 (78,95%)	19	
Invasão capsular	Não	65 (92,86%)	5 (7,14%)	70	< 0,0001
	Sim	20 (51,28%)	19 (48,72%)	39	
Infiltrado linfocitário	Não	49 (90,74%)	5 (9,26%)	54	0,0014
	Sim	36 (65,45%)	19 (34,55%)	55	
Total		85	24	109	

* Teste Qui-quadrado

7. Expressão de Ciclina D1 pela Técnica de Imunoistoquímica

A escolha da melhor classificação em grupos de expressão para a Ciclina D1 foi direcionada pela comparação de cálculos estatísticos preliminares da associação entre expressão da proteína e os seguintes parâmetros: evolução clínica (boa x má), grupo de estágio clínico (baixo x alto), grau nuclear de Fuhrman (baixo x alto), tamanho do tumor ($\leq 4,0$ cm x $> 4,0$ cm) e diferenciação sarcomatóide (não x sim).

A classificação baseada no número de células marcadas por campo de grande aumento e intensidade de marcação nuclear (Tabela 1) não demonstrou associação estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre expressão de Ciclina D1 e nenhum dos parâmetros iniciais avaliados, mesmo alterando o ponto de corte de 10 para 5 ou 15 células marcadas/cga.

A classificação baseada na porcentagem de células tumorais marcadas em toda a lâmina (Tabela 2) demonstrou associação entre a expressão de Ciclina D1 e o parâmetro evolução clínica a partir de 30% de células marcadas em toda a lâmina, tanto para o total de casos quanto para CCR de células claras isoladamente. O Gráfico 11 mostra a distribuição dos casos de acordo com essa classificação. Dividindo-se os casos em baixa (1 ou 2) e alta (3 ou 4) expressão de Ciclina D1, a distribuição passa a ser 52 e 57 casos, respectivamente, para CCR e 26 e 52 casos, respectivamente, para CCR de células claras.

Todos os casos-controle (07) provenientes de necropsia (ausência de lesão renal) exibiram categoria 1 de marcação, ou seja, não expressaram a proteína. O inverso ocorreu com os casos analisados da pesquisa: todos eles expressaram a proteína Ciclina D1 em algum

grau. A fração média de células positivas para ciclina D1 foi 41,13% (variando de 1-98%) em todos os casos, 49,64% (variando de 2-98%) para CCR de células claras, 13,83% (variando de 1-45%) para CCR papilífero e 19,43 % (variando de 1-85%) para CCR cromóforo. A Figura 1 apresenta exemplos de expressão de Ciclina D1 em alguns tipos de CCR.

Gráfico 11 - Expressão de Ciclina D1 em (A) total de casos e (B) CCR de Células Claras

A expressão de Ciclina D1 apresentou boa distribuição de casos de alta e baixa marcação para o CCR de células claras, porém o predomínio foi de baixo percentual de marcação para os demais tipos (Gráfico 12). A Tabela 19 mostra que houve associação estatística entre expressão de Ciclina D1 e tipo de CCR.

Gráfico 12 – Diferença de expressão de Ciclina D1 entre os tipos de CCR da amostra

Figura 1 – Expressão imunoistoquímica de Ciclina D1 em (A) tecido renal normal: 1 (ausência de núcleos positivos); (B) Células Claras, Fuhrman 1: 4 (> 60% de células positivas); (C) Células Claras, Fuhrman 3: 2 (até 30% de células positivas); (D) Inclassificável, Fuhrman 4: 2 (até 30% de células positivas); (E) Papilífero tipo 1, Fuhrman 1: 2 (até 30% de células positivas). As células maiores de marcação intensa são macrófagos; (F) Cromófobo, Fuhrman 1: 2 (até 30% de células positivas). Notar marcação mais fraca para CCR papilífero e cromófobo.

Tabela 19 – Relação entre os tipos de CCR mais prevalentes e a expressão de Ciclina D1

Variável	Categorias	Ciclina D1		Total	p*
		Baixa	Alta		
Tipo de CCR	Células claras	26 (33,33%)	52 (66,67%)	78	< 0,0001
	Papilífero	11 (91,67%)	1 (8,33%)	12	
	Cromóforo	6 (85,71%)	1 (14,29%)	7	
	Outros	9 (75%)	3 (25%)	12	
	Total	52	57	109	

* Teste Qui-quadrado

De acordo com a Tabela 20, houve associação estatisticamente significativa entre Ciclina D1 (baixa x alta) e evolução clínica, tanto para o total de casos quanto para o CCR de células claras. Os pacientes que apresentaram má evolução clínica tiveram baixa expressão da proteína, enquanto os que apresentaram boa evolução, em geral, tiveram alta expressão de Ciclina D1. Distribuindo-se os casos entre as categorias da classificação utilizada para a expressão de Ciclina D1 (1, 2, 3, 4), observou-se uma associação ainda mais significativa, com $p = 0,021$ para o total de casos e $p = 0,002$ para CCR de células claras.

Tabela 20– Relação entre evolução clínica e expressão de Ciclina D1

Variável	Categorias	CCR				CCR de Células Claras			
		Ciclina D1		Total	p*	Ciclina D1		Total	p*
		Baixa	Alta			Baixa	Alta		
Evolução	Boa	36 (42,35%)	49 (57,65%)	85	0,035	14 (24,14%)	44 (75,86%)	58	0,003
	Má	16 (66,67%)	8 (33,33%)	24		12 (60%)	8 (40%)	20	
Total		52	57	109		26	52	78	

* Teste Qui-quadrado

A diferença entre boa e má evolução clínica e expressão de Ciclina D1 também pode ser observada pelas curvas de sobrevida sem metástase e/ou óbito por CCR para o total de casos e para CCR de células claras isoladamente (Gráficos 13A e 13B, respectivamente). Ao final do tempo de seguimento, havia mais casos de má evolução no grupo que exibia baixa expressão da proteína em comparação ao grupo que exibia alta marcação. Interessante notar que os eventos ocorriam em geral no início do seguimento, com posterior estabilização das curvas. O teste de Log-Rank revelou diferença estatisticamente significativa entre as curvas para ambos os gráficos, com $p = 0,032$ para o total de casos e $p = 0,002$ para CCR de células claras.

A diferença das médias do tempo de sobrevida livre de metástase e/ou óbito por CCR entre os casos de baixa e alta marcação de Ciclina D1 é vista na Tabela 21.

Gráfico 13 - Curva de sobrevida sem metástase e/ou óbito por CCR para o total de casos (**A**) e para CCR de Células Claras isoladamente (**B**) (valor de p pelo teste Log-Rank).

Tabela 21 – Média de tempo até ocorrência de metástase e/ou óbito por CCR (meses)

CCR					
Ciclina D1	Total	Censurados (%)	Média do tempo de sobrevida	Erro Padrão	p*
Baixa	52	36 (69,23%)	2,9523	0,2442	0,032
Alta	57	49 (85,96%)	13,1736	0,6913	
Total	109	85 (77,98%)			
CCR de Células Claras					
Ciclina D1	Total	Censurados (%)	Média do tempo de sobrevida	Erro Padrão	p*
Baixa	26	14 (53,85%)	2,4151	0,3954	0,002
Alta	52	44 (84,62%)	13,0018	0,7513	
Total	78	58 (74,36%)			

* Teste de Log-Rank

Não foi possível verificar a relação entre evolução clínica e expressão de Ciclina D1 para os casos de CCR papilífero e cromóforo, pois nenhum deles apresentou metástase e/ou óbito durante o seguimento clínico.

Todos os casos de doença de VHL (04) apresentaram boa evolução clínica e alta expressão de Ciclina D1 (categorias 3 ou 4). Todos os casos de CCR cístico multilocular (03) apresentaram boa evolução, sendo que dois deles exibiram alta marcação de Ciclina D1 e um deles, baixa marcação. Todos os casos de CCR inclassificável (03) apresentaram má evolução clínica e baixa expressão de Ciclina D1. O único caso de CCR associado a Doença Renal Cística Adquirida (Terminal) exibiu boa evolução clínica e baixo conteúdo de Ciclina D1. Já o único caso de CCR associado a translocação Xp11.2/fusão do gene TFE3 exibiu boa evolução e alta expressão da proteína (categoria 4). Os casos classificados como misto (04) exibiram baixa expressão proteica. Por sua heterogeneidade e limitado número de casos não entraram nas análises específicas dos tipos de CCR.

Não houve associação estatisticamente significativa entre a expressão de Ciclina D1 e as variáveis epidemiológicas sexo, idade e raça tanto para o total de casos quanto para CCR de células claras isoladamente ($p > 0,05$, teste Qui-quadrado). Também não se observou associação entre os fatores de risco para CCR observados na amostra e expressão de Ciclina D1 ($p > 0,05$, teste Qui-quadrado). Casos em que tal informação era desconhecida foram excluídos da análise. História pessoal e/ou familiar de neoplasia maligna foi tratada como uma só variável para comparação com expressão da proteína.

Os pacientes assintomáticos exibiram tumores com alta expressão de Ciclina D1, enquanto os casos que exibiram baixa marcação da proteína pertenciam a pacientes com algum tipo de sintoma (Tabela 22). Também houve associação estatisticamente significativa

entre tamanho tumoral e expressão de Ciclina D1. Tumores pequenos ($\leq 4,0$ cm) apresentavam, em geral, expressão alta da proteína, o oposto sendo observado entre os casos com tamanho tumoral maior que 4,0 cm. Distribuindo-se os casos em 3 categorias de tamanho tumoral ($\leq 4,0$ cm, $> 4,0$ cm e $\leq 7,0$ cm, $> 7,0$ cm), essa associação foi ainda maior ($p = 0,003$ para o total de casos e $p = 0,0001$ para CCR de células claras, teste Qui-quadrado. Tumores maiores que 7,0 cm, em geral, exibiam menor conteúdo de Ciclina D1.

Tabela 22 – Relação entre apresentação clínica e tamanho tumoral e a expressão de Ciclina D1

Variáveis	Categorias	CCR				CCR de Células Claras			
		Ciclina D1		Total	p*	Ciclina D1		Total	p*
		Baixa	Alta			Baixa	Alta		
Apresentação	Assintomático	14 (35%)	26 (65%)	40	0,043	3 (11,11%)	24 (88,89%)	27	0,002
	Sintomático	38 (55,07%)	31 (44,93%)	69		23 (45,1%)	28 (54,9%)	51	
Tamanho tumoral	$\leq 4,0$ cm	10 (29,41%)	24 (70,59%)	34	0,01	2 (9,52%)	19 (90,48%)	21	0,006
	$> 4,0$ cm	42 (56%)	33 (44%)	75		24 (42,11%)	33 (57,89%)	57	
Total		52	57	109		26	52	78	

* Teste Qui-quadrado

De acordo com a Tabela 23 e os Gráficos 14A e 14B, também a média de tamanho tumoral era maior entre os casos com baixa expressão de Ciclina D1, tanto para o total de casos quanto para CCR de células claras isoladamente.

Tabela 23 – Análise do tamanho tumoral (cm) de acordo com a expressão de Ciclina D1

CCR							
Ciclina D1	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p*
Baixa	52	7,2	3,53	1	7	15	< 0,01
Alta	57	5,23	2,54	1,4	4,7	14	
Diferença (Baixa - Alta)		1,9705	3,0546				
CCR de Células Claras							
Ciclina D1	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p*
Baixa	26	8,56	3,22	2	8,75	15	< 0,01
Alta	52	5,43	2,58	1,4	4,9	14	
Diferença (Baixa - Alta)		3,1365	2,8081				

Legenda: N = Número de casos. * Teste t-Student

Utilizando-se as categorias de classificação da expressão de Ciclina D1 (2, 3 e 4), as médias tumorais dos casos apresentaram uma progressão descendente de valores: 7,2 cm, 6,56 cm e 4,34 cm, respectivamente, para o total de casos ($p < 0,01$) e 8,56 cm, 6,86 cm e 4,45 cm, respectivamente, para CCR de células claras isoladamente com diferença estatística ainda mais significativa ($p < 0,0001$). Os Gráficos 15A e 15B mostram essa comparação.

Gráfico 14 - Diferença de média tumoral de acordo com a expressão de Ciclina D1 para **(A)** Total de casos e **(B)** CCR de Células Claras (valor de p pelo teste t-Student).

Gráfico 15 - Diferença de média tumoral de acordo com as categorias de expressão de Ciclina D1 para **(A)** CCR e **(B)** CCR de Células Claras (valor de p pelo teste ANOVA e pós-teste de Tukey).

Não se observou associação entre tamanho tumoral ($\leq 4,0$ cm e $> 4,0$ cm) e expressão de Ciclina D1 (baixa e alta) para os casos de CCR papilífero e cromóforo ($p = 0,21$ para ambos, teste Qui-quadrado).

A Tabela 24 mostra a relação entre os fatores prognósticos clássicos da literatura e a expressão de Ciclina D1 tanto para o total de casos quanto para CCR de células claras. De um modo geral, a expressão alta da proteína esteve relacionada a baixo grau nuclear e ausência de

necrose tumoral. Já a presença de diferenciação sarcomatóide esteve associada à baixa expressão proteica somente no total de casos, apesar de haver uma leve tendência à associação para os CCR de células claras isoladamente. Não se observou associação entre grupo de estágio clínico e expressão baixa ou alta de Ciclina D1. No entanto, ao se separar a expressão de Ciclina D1 em suas categorias originais, verificou-se associação estatística tanto para o total de casos quanto para CCR de células claras (Tabela 25): a maior parte dos casos de grupo de estágio alto apresentava expressão de Ciclina D1 categoria 2. Isso revela a presença de uma relação de progressão entre as porcentagens de marcação tecidual da proteína.

Tabela 24 – Relação entre fatores prognósticos clássicos e expressão de Ciclina D1

Variáveis	Categorias	CCR				CCR de Células Claras			
		Ciclina D1		Total	p*	Ciclina D1		Total	p*
		Baixa	Alta			Baixa	Alta		
Grupo de Estágio	Baixo	34 (45,33%)	41 (54,67%)	75	0,461	13 (26,53%)	36 (73,47%)	49	0,097
	Alto	18 (52,94%)	16 (47,06%)	34		13 (44,83%)	16 (55,17%)	29	
Fuhrman	Baixo	24 (35,82%)	43 (64,18%)	67	0,001	8 (16,67%)	40 (83,33%)	48	<0,0001
	Alto	28 (66,67%)	14 (33,33%)	42		18 (60%)	12 (40%)	30	
Diferenciação Sarcomatóide	Não	43 (44,33%)	54 (55,67%)	97	0,044	21 (30%)	49 (70%)	70	0,064
	Sim	9 (75%)	3 (25%)	12		5 (62,5%)	3 (37,5%)	8	
Necrose	Não	15 (31,91%)	32 (68,09%)	47	0,004	5 (14,71%)	29 (85,29%)	34	0,002
	Sim	37 (59,68%)	25 (40,32%)	62		21 (47,73%)	23 (52,27%)	44	
Total		52	57	109		26	52	78	

* Teste Qui-quadrado

Tabela 25 – Relação entre grupo de estágio e expressão de Ciclina D1 em suas categorias originais

		CCR					CCR de Células Claras				
Variável	Categorias	Ciclina D1 30%/60%			Total	p*	Ciclina D1 30%/60%			Total	p*
		2	3	4			2	3	4		
Grupo de Estágio	Baixo	34 (45,33%)	12 (16%)	29 (38,67%)	75	0,022	13 (26,53%)	10 (20,41%)	26 (53,06%)	49	0,007
	Alto	18 (52,94%)	11 (32,35%)	5 (14,71%)	34		13 (44,83%)	11 (37,93%)	5 (17,24%)	29	
Total		52	23	34	109		26	21	31	78	

* Teste Qui-quadrado

Para os casos de CCR papilífero e CCR cromóforo não houve associação estatisticamente significativa entre o grau nuclear e a expressão baixa ou alta de Ciclina D1 ($p = 0,21$ e $p = 0,08$, respectivamente, teste Qui-quadrado).

Os demais aspectos histológicos não apresentaram associação estatística com a expressão de Ciclina D1 (total de casos), apesar de haver uma leve tendência à associação entre baixa expressão de Ciclina D1 e presença de infiltrado linfocitário (Tabela 26). A variável Invasão Vascular incluiu invasão de grandes vasos e/ou de microvasculatura tumoral.

Tabela 26 – Relação entre demais aspectos histológicos e expressão de Ciclina D1 para o total de casos

Variáveis	Categorias	Ciclina D1		Total	p*
		Baixa	Alta		
Invasão Vascular	Não	41 (47,13%)	46 (52,87%)	87	0,809
	Sim	11 (50%)	11 (50%)	22	
Invasão hilar e/ou de ureter	Não	40 (44,44%)	50 (55,56%)	90	0,137
	Sim	12 (63,16%)	7 (36,84%)	19	
Extensão peri-renal e/ou adrenal	Não	41 (45,56%)	49 (54,44%)	90	0,327
	Sim	11 (57,89%)	8 (42,11%)	19	
Invasão capsular	Não	29 (41,43%)	41 (58,57%)	70	0,078
	Sim	23 (58,97%)	16 (41,03%)	39	
Infiltrado linfocitário	Não	21 (38,89%)	33 (61,11%)	54	0,067
	Sim	31 (56,36%)	24 (43,64%)	55	
Total		52	57	109	

* Teste Qui-quadrado

Não houve associação estatisticamente significativa entre extensão da doença no momento do diagnóstico e expressão de Ciclina D1 para o total de casos ($p > 0,05$), notando-se apenas uma tendência à associação para os CCR de células claras ($p = 0,0507$, teste Qui-quadrado). Apesar de não haver associação, percebeu-se que a maior parte dos casos com doença Localizada exibia alta expressão de Ciclina D1, enquanto a maior parte dos casos com doença Metastática ao diagnóstico exibia baixa expressão da proteína (dados não mostrados).

De forma semelhante para com a evolução clínica, não se verificou associação estatística entre expressão de Ciclina D1 e multifocalidade de tumores ao diagnóstico ou recidiva tumoral ($p > 0,05$, teste Qui-quadrado). As características dos casos que apresentaram recidiva encontram-se resumidas na Tabela 27.

Tabela 27 – Análise da expressão de Ciclina D1 entre os casos de recorrência tumoral

Casos de Recidiva	Tempo até recidiva	Multifocalidade	Fuhrman	Ciclina D1
1	4 meses	Multifocal, bilateral	3	2
2	2 meses	Multifocal, bilateral	3	2
3	45 meses	Multifocal bilateral	2	4
4	12 meses	Multifocal à E	2	4
5	7 meses	Lesão única	1	4
6	6 meses	Lesão única	2	2

Interessante notar que ao se dividir a variável evolução clínica em Metástase e Óbito por CCR, somente a variável Metástase revelou associação estatisticamente significativa com a expressão de Ciclina D1, tanto para o total de casos quanto para CCR de células claras (Tabela 28). Os casos metastáticos apresentavam uma razão de chances (*Odds Ratio*) de 3,13 (IC 1,102 – 8,896) em exibir baixa expressão de Ciclina D1 em relação aos casos não metastáticos para o total de casos e de 5,62 (IC 1,775 - 17,806) para CCR de células claras.

Tabela 28 – Relação entre expressão de Ciclina D1 e as variáveis Metástase e Óbito por CCR

Variáveis	Categorias	CCR				CCR de Células Claras			
		Ciclina D1		Total	p*	Ciclina D1		Total	p*
		Baixa	Alta			Baixa	Alta		
Metástase	Não	38 (42,7%)	51 (57,3%)	89	0,027	15 (24,59%)	46 (75,41%)	61	0,001
	Sim	14 (70%)	6 (30%)	20		11 (64,71%)	6 (35,29%)	17	
Óbito (CCR)	Não	43 (45,74%)	51 (54,26%)	94	0,304	20 (30,3%)	46 (69,7%)	66	0,183
	Sim	9 (60%)	6 (40%)	15		6 (50%)	6 (50%)	12	
Total		52	57	109		26	52	78	

* Teste Qui-quadrado

Ao final dos cálculos de verificação de associação entre a expressão de Ciclina D1 e demais variáveis, aplicou-se a Regressão Logística simples e múltipla com cálculo de *Odds Ratio* (OR) bruto e ajustado, respectivamente, para avaliar o valor prognóstico independente de Ciclina D1 na presença de outras variáveis. A curva ROC também foi utilizada para o mesmo fim, comparando os modelos com e sem esta variável.

A Tabela 29 apresenta os cálculos de Regressão Logística para o total de casos e para CCR de células claras. É possível comparar os resultados do Modelo 1 (sem a Ciclina D1) com os do Modelo 2 (com adição de Ciclina D1), notando a contribuição independente de cada uma das variáveis em prever a evolução clínica.

À exceção do Tipo de CCR (células claras x não células claras), todas as variáveis mostraram significância estatística no Modelo Bruto, tanto para o total de casos quanto para CCR de células claras isoladamente (tendência à significância para a variável Sexo). Após a realização da regressão logística múltipla (Modelo 1), verificou-se que apenas as variáveis diferenciação sarcomatóide e grupo de estágio constituíram fatores prognósticos independentes ($p = 0,02$ e $p < 0,01$, respectivamente). A adição da expressão de Ciclina D1 à análise (Modelo 2) não alterou o resultado. Em relação aos casos de CCR de células claras, apenas a variável grupo de estágio constituiu fator prognóstico independente em ambos os modelos ($p = 0,01$), enquanto a variável diferenciação sarcomatóide apresentou uma

tendência à significância. A expressão de Ciclina D1 também não constituiu fator prognóstico independente.

Tabela 29 – Associação entre expressão de ciclina D1 e má evolução clínica, descrito por *Odds Ratio* (OR) para modelos de regressão logística: ajuste sequencial para as variáveis em cada modelo.

CCR						
Variáveis	Modelo Bruto		Modelo 1 (ajustado)		Modelo 2 (ajustado)	
	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P
Sexo (M x F)	4,02 (1,11-14,57)	0,03	3,73 (0,54-26,04)	0,18	3,68 (0,52-26,30)	0,19
Tipo de CCR (células claras x não células claras)	2,33 (0,73-7,47)	0,16	2,76 (0,29-26,80)	0,38	3,52 (0,34-36,04)	0,29
Necrose (sim x não)	12,37 (2,74-55,94)	<0,01	1,70 (0,18-16,03)	0,64	1,54 (0,16-14,89)	0,71
Apresentação Clínica (sintomáticos x assintomáticos)	19,50 (2,52-151,03)	<0,01	17,24 (0,54-552,64)	0,11	16,41 (0,45-594,28)	0,13
Diferenciação Sarcomatóide (sim x não)	16,40 (3,97-67,70)	<0,01	18,52 (1,57-218,42)	0,02 *	15,26 (1,30-178,98)	0,03 *
Fuhrman (alto x baixo)	14,32 (4,41-46,51)	<0,01	2,45 (0,36-16,68)	0,36	2,05 (0,29-14,31)	0,47
Grupo de Estágio (alto x baixo)	38,76 (10,09-148,91)	<0,01	17,74 (3,08-102,09)	<0,01 *	19,00 (3,20-112,90)	<0,01 *
Ciclina D1 (baixa x alta)	2,72 (1,05-7,05)	0,04	–		2,31 (0,44-12,20)	0,32

CCR de Células Claras						
Variáveis	Modelo Bruto		Modelo 1 (ajustado)		Modelo 2 (ajustado)	
	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P
Sexo (M x F)	3,72 (0,98-14,15)	0,05	3,06 (0,44-21,07)	0,26	3,06 (0,44-21,44)	0,26
Necrose (sim x não)	11,08 (2,35-52,18)	<0,01	1,80 (0,21-15,59)	0,59	1,66 (0,19-14,70)	0,65
Apresentação Clínica (sintomáticos x assintomáticos)	15,44 (1,94-123,13)	<0,01	14,62 (0,46-467,75)	0,13	12,96 (0,36-468,57)	0,16
Diferenciação Sarcomatóide (sim x não)	12,00 (2,18-65,96)	<0,01	15,59 (0,96-252,94)	0,05	12,77 (0,81-202,13)	0,07
Fuhrman (alto x baixo)	12,57 (3,60-43,87)	<0,01	2,32 (0,35-15,32)	0,38	1,95 (0,29-13,30)	0,49
Grupo de Estágio (alto x baixo)	21,72 (5,45-86,52)	<0,01	10,93 (1,87-63,77)	0,01 *	11,71 (1,95-70,39)	0,01 *
Ciclina D1 (baixa x alta)	4,71 (1,60-13,85)	<0,01	–		2,10 (0,42-10,45)	0,36

Modelo 1: Regressão logística múltipla sem ciclina D1. Modelo 2: Regressão logística múltipla com a adição de ciclina D1. IC = Intervalo de Confiança. *p < 0,05

Interessante notar que, apesar de o grau nuclear de Fuhrman alto apresentar boa associação com má evolução clínica no modelo bruto (OR 14,32), ao ser analisado em conjunto com as demais variáveis, sua contribuição cai bastante, tanto no Modelo 1 (OR 2,45), quanto no Modelo 2 (OR 2,05). A presença de necrose tumoral apresentou comportamento semelhante, com diminuição importante de seu valor prognóstico após a análise multivariada, tanto no Modelo 1 (OR 1,70), quanto no Modelo 2 (OR 1,54). Já a

variável apresentação clínica manteve-se importante contribuidora para a avaliação do prognóstico após a análise multivariada, embora não tenha apresentado significância estatística. Relações semelhantes foram observadas para CCR de células claras isoladamente.

A contribuição independente da Ciclina D1 foi pequena na amostra, tanto no modelo bruto quanto no ajustado, para o total de casos e CCR de células claras isoladamente. O Gráfico 16 mostra a contribuição da adição da análise de Ciclina D1 (Modelo 2) ao sistema de avaliação de prognóstico adotado (Modelo 1). Nota-se que a área sob a curva é bastante semelhante entre os modelos, com leve aumento após a adição de Ciclina D1.

Resumidamente, a expressão de Ciclina D1 esteve associada à evolução clínica dos pacientes e à maioria dos fatores prognósticos já utilizados nessa avaliação de uma maneira inversa apenas em análises univariadas, tanto para o total de casos quanto para CCR de células claras isoladamente. A baixa expressão da proteína associou-se à má evolução clínica, maior tamanho tumoral, presença de sintomas ao diagnóstico, maior grau nuclear de Fuhrman, presença de diferenciação sarcomatóide e de necrose. No entanto, de acordo com a análise multivariada, o acréscimo de mais essa variável aos sistemas de avaliação de prognóstico parece contribuir pouco para esse fim.

Gráfico 16 - Comparação de Curvas ROC entre os Modelos 1 (sem Ciclina D1) e 2 (com adição de ciclina D1) para o total de casos (A) e para CCR de Células Claras (B). ASC = Área Sob a Curva

DISCUSSÃO

O principal objetivo do nosso trabalho foi avaliar a expressão do regulador de ciclo celular Ciclina D1 em Carcinoma de Células Renais e como essa expressão estaria associada ao prognóstico da neoplasia. Antes disso, entretanto, traçamos um perfil clínico e histopatológico da amostra estudada e verificamos se os fatores prognósticos considerados clássicos pela literatura mundial também serviriam ao mesmo fim para os nossos casos.

Nossos resultados epidemiológicos são importantes por não haver informação nacional constantemente atualizada sobre o CCR, já que não se encontra entre os tumores bianualmente reportados pelo INCA. Apenas escassas pesquisas regionais e o artigo de Nardi *et al*, 2010, numa tentativa de maior abrangência, relatam algumas características da neoplasia (MIRRA AP, 2001;NARDI;ZEQUI SDE *et al.*, 2010;BRASIL, 2012). Apesar de também ser uma pesquisa regional, nossos dados podem contribuir para futuras comparações, especialmente por ter sido realizada numa instituição de saúde pública importante, de nível terciário, que frequentemente recebe pacientes de várias partes do país.

As características epidemiológicas de nossa amostra foram similares às descritas na literatura mundial (BANNAYAN e LAMM, 1980;WHANG e GODLEY, 2003;EBLE J.N., 2004;LINDBLAD, 2004;LIPWORTH;TARONE *et al.*, 2006;BOSTWICK, 2008), já que a maior parte dos casos era do gênero masculino, numa razão de 2 a 3:1, pertencia à raça branca e a média de idade foi próxima a 60 anos.

A incidência de CCR vem aumentando mundialmente. Isto é devido, em parte, ao avanço dos métodos de imagem com aumento na detecção incidental de tumores pequenos e localizados. No entanto, esse aumento também é observado para tumores em estágios mais avançados, o que poderia explicar a ainda alta taxa de mortalidade (LINDBLAD, 2004; LIPWORTH;TARONE *et al.*, 2006). Nesse caso, o aumento na prevalência de fatores de risco para CCR, como tabagismo, obesidade e hipertensão arterial, assume especial importância. Já que a maior parte dos casos de CCR ocorre de forma esporádica (mais de 95%), numa interação entre suscetibilidade genética e exposição a fatores ambientais, não associado a síndromes genéticas (CHOW;DONG *et al.*, 2010), é essencial combatê-los.

Dentre os fatores de risco mais prevalentes em nossa amostra, destacaram-se: hipertensão arterial, história de tabagismo e IMC acima do referencial normal. Vale a ressalva de que muitos dados referentes a hábitos alimentares e comportamentais são pouco fidedignos, já que dependem do relato dos pacientes e envolvem subjetividade na avaliação baseada em prontuários médicos. Além disso, a associação entre consumo de bebidas alcoólicas e risco de CCR é apenas hipotética, podendo inclusive haver uma relação inversa (MCLAUGHLIN e LIPWORTH, 2000;LEE;HUNTER *et al.*, 2007).

Nardi, *et al*, 2010, num estudo brasileiro sobre características epidemiológicas do CCR, obteve uma amostra de 508 pacientes diagnosticados com CCR provenientes de diferentes instituições num período de 01 ano. A maioria dos casos era do sexo masculino, porém numa frequência menor que a observada em nosso estudo (58,9%). A maioria pertencia à raça branca (78,9%), a média de idade foi próxima a 60 anos e o fator de risco mais prevalente também foi a hipertensão arterial. A tríade clássica (hematúria, dor em flanco e massa abdominal palpável) esteve presente em apenas 4,5% dos pacientes. Hematúria (42,9%) e dor abdominal (41,3%) foram os sintomas mais frequentes (NARDI;ZEQUI SDE *et al.*, 2010). Em nosso estudo, somente 5,5% dos pacientes apresentavam a tríade clássica ao diagnóstico, confirmando a baixa sensibilidade dessa característica relatada na literatura mundial (CORGNA;BETTI *et al.*, 2007;POMPEO, 2007;BOSTWICK, 2008). Dor abdominal e hematúria também foram os sintomas mais comuns. O tumor foi um achado em exames de imagem em 36,69% dos pacientes de nossa amostra, concordando com a prevalência de 30-40% de pacientes em fase assintomática observada na literatura (DALL'OGGIO;SROUGI *et al.*, 2004;HEIDENREICH e RAVERY, 2004;VOLPE e JEWETT, 2005).

Dentre as variáveis laboratoriais analisadas, destacaram-se a presença de anemia (44,03%) e de hematúria micro e/ou macroscópica (43,11%) ao diagnóstico do CCR. A presença de hematúria ao diagnóstico do CCR é relatada com uma frequência de cerca de 60% na literatura (MOTZER;RUSSO *et al.*, 1997;POMPEO, 2007). Essa diferença observada pode ser relacionada a diferentes pontos de corte utilizados na definição de sua presença. Apenas a presença de hematúria micro e/ou macroscópica se associou ao tamanho tumoral > 4,0 cm, podendo sugerir doença em estágio mais avançado ao diagnóstico.

Nardi *et al*, 2010, verificaram em sua amostra que a neoplasia apresentou-se de forma localizada em cerca de 75% dos casos (TNM I e II), enquanto a proporção de pacientes com doença metastática era de 9,5%. (NARDI;ZEQUI SDE *et al.*, 2010). Em nosso estudo, a neoplasia apresentou-se de forma localizada numa frequência pouco menor (68,80%) e de forma metastática em 15,59% dos pacientes. A maior prevalência de casos metastáticos no presente estudo pode ser devido à instituição onde a pesquisa se realizou: um hospital terciário, referência de outros serviços e instituições com tendência a abranger casos mais avançados ou de difícil tratamento, em comparação à diversidade de tipos institucionais do trabalho anterior. No entanto, achados da literatura mundial indicam que 45% dos CCR apresentam-se de forma localizada e 30% são metastáticos ao diagnóstico (MILOWSKY e NANUS, 2001;RUSSO, 2001;CORGNA;BETTI *et al.*, 2007). Isso pode refletir diferenças na prevalência de fatores de risco para CCR entre países desenvolvidos (ou áreas mais

industrializadas) e subdesenvolvidos e/ou variações genéticas entre as populações, em menor grau. Os locais mais comuns de metástases ao diagnóstico e/ou durante o seguimento clínico em nosso estudo foram pulmões e ossos, conforme também indica a literatura mundial. No entanto, não houve metástase para rim contralateral, cujo relato é de 10-15% (MILOWSKY e NANUS, 2001; RUSSO, 2001; FLANIGAN; CAMPBELL *et al.*, 2003).

Com relação aos tipos histológicos, observamos a seguinte sequência de prevalência dos principais tipos de CCR: células claras (71,55%), papilífero (11%) e cromóforo (6,42%), enquanto apenas 2,75% dos casos foram caracterizados como do tipo inclassificável. Dados de literatura internacional concordam que o CCR de células claras corresponde à grande maioria dos casos, seguido por papilífero e cromóforo, enquanto o tipo inclassificável contribui com 4 a 5% dos casos, com tendência à redução, à medida que surgem novas entidades bem caracterizadas (EBLE J.N., 2004; LOPEZ-BELTRAN; SCARPELLI *et al.*, 2006; BOSTWICK, 2008; SRIGLEY e DELAHUNT, 2009). Já Nardi *et al.*, 2010, observaram que o CCR de células claras era o tipo mais prevalente na amostra (73,6%), seguido por inclassificável (10,2%), cromóforo (9,1%) e papilífero (6,5%) (NARDI; ZEQUI SDE *et al.*, 2010). Essa divergência na sequência de tipos de CCR mais prevalentes pode ser decorrente de reais diferenças nas amostras ou pode ser relacionada à falta de um centro de revisão anatomopatológico com padronização dos laudos para os casos do artigo em questão.

Interessante notar que apesar de a distribuição por sexo do CCR papilífero ser similar ao de células claras (2 a 3 ♂: 1 ♀), em nossa casuística todos os casos acometeram homens. Além disso, a distribuição por sexo costuma ser semelhante entre homens e mulheres para o CCR cromóforo e, em nossa amostra, esse tipo acometeu mais os pacientes do gênero feminino (EBLE J.N., 2004; LOPEZ-BELTRAN; SCARPELLI *et al.*, 2006; BOSTWICK, 2008).

Tamanho tumoral é um componente-chave no sistema de estadiamento TNM, além de ser um dos mais importantes indicadores de prognóstico, devendo ser bem analisado (VOLPE e JEWETT, 2005; FLANIGAN; POLCARI *et al.*, 2011). Definimos os pontos de corte para análise do tamanho tumoral ($\leq 4,0$ cm, $> 4,0$ e $\leq 7,0$ cm, $> 7,0$ cm) com base no estadiamento TNM (Anexo B). Apesar de tumores $> 7,0$ cm ainda poderem estar confinados ao rim, essa divisão dá um sentido de progressão da lesão, já que aumento no tamanho do tumor está associado a maior frequência de metástases (EBLE J.N., 2004; BOSTWICK, 2008). Em nosso estudo, pacientes sintomáticos estavam associados a tumores $> 4,0$ cm e apresentavam maior média do tamanho tumoral em relação aos assintomáticos (7,46 cm x 3,95 cm). Essa diferença sugere que pacientes sintomáticos possam ter doença mais avançada já no momento do

diagnóstico. De acordo com a literatura, o tamanho tumoral dos CCR apresenta grande variabilidade, sendo que a média para o CCR de células claras é de 7,0 cm. Valores semelhantes são observados para o CCR papilífero e cromóforo (EBLE J.N., 2004; BOSTWICK, 2008). A média do tamanho tumoral em nossa amostra foi de 6,17cm. Apesar de o CCR de células claras ter apresentado maior média de tamanho tumoral em relação ao cromóforo e papilífero, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

O estágio patológico (TNM) é um dos fatores prognósticos isolados mais importantes para o CCR (KONTAK e CAMPBELL, 2003; LINDBLAD, 2004; POMPEO, 2007; VOLPE e PATARD, 2010). Segundo a OMS, 2004, cerca de 50% dos CCR de células claras pertencem aos grupos I e II de estadiamento e menos de 5% são estágio IV (EBLE J.N., 2004). Já o CCR papilífero costuma se apresentar em estágios menores que o CCR de células claras (WAXMAN, 2005). Não conseguimos encontrar referências para CCR como um todo. Em nossa amostra, a grande maioria dos casos apresentava grupo de estadiamento baixo (56,88% era grupo I e 11,92%, grupo II), enquanto 16,51% pertenciam ao grupo III e 14,67%, ao grupo IV. De forma semelhante, a maioria dos casos da amostra de Nardi *et al*, 2010, também pertencia a grupos de estadiamento baixo (37,2% ao grupo I e 24,4% ao grupo II), enquanto 12% eram grupo III, 9,5%, grupo IV e 16,9% desconhecidos. Eles observaram ainda que havia uma maior proporção de pacientes com grupo de estágio baixo (I ou II) em instituições de saúde públicas, enquanto pacientes acompanhados em instituições de saúde privadas eram mais prováveis de ter doença metastática ($p = 0,033$).

Depois do estadiamento (TNM), a graduação histológica feita pelo grau nuclear de Fuhrman é a mais aceita mundialmente como tendo valor prognóstico, embora haja críticas sobre sua reprodutibilidade e falta de uniformidade (FUHRMAN; LASKY *et al.*, 1982; KONTAK e CAMPBELL, 2003; EBLE J.N., 2004). Apesar dos questionamentos, observamos que houve boa associação estatística entre baixo grau nuclear e baixo grupo de estágio, o oposto sendo verificado para os pacientes com alto grau de Fuhrman, tanto para o total de casos quanto para CCR de células claras isoladamente. Também houve boa associação entre alto grau nuclear e casos metastáticos ao diagnóstico (forma de apresentação da doença) e presença de metástase ao final do seguimento clínico, indicando um bom valor prognóstico do grau nuclear de Fuhrman para nossa amostra. Os pacientes do gênero masculino apresentaram grau nuclear de Fuhrman mais alto em relação às mulheres, podendo sugerir uma maior agressividade da neoplasia nos homens. O valor preditivo do grau histológico é bem estabelecido para o CCR de células claras, sendo consistentemente validado, porém em outros

tipos de CCR ainda é motivo de discussão (BOSTWICK, 2008; FURNISS; HARNDEN *et al.*, 2008; VOLPE e PATARD, 2010).

Áreas de diferenciação sarcomatóide estão presentes em cerca de 5% dos CCR. Sua presença se relaciona a um pior prognóstico (BOSTWICK, 2008; FURNISS; HARNDEN *et al.*, 2008; VOLPE e PATARD, 2010; FLANIGAN; POLCARI *et al.*, 2011). Um estudo comparou 101 pacientes com áreas de diferenciação sarcomatóide e uma coorte de 851 pacientes sem essa característica. Aqueles com a alteração sarcomatóide apresentaram estágio mais alto e pior prognóstico. A sobrevida específica da doença em 5 anos daqueles com e sem a alteração foi de 22% e 79%, respectivamente (DE PERALTA-VENTURINA; MOCH; AMIN; TAMBOLI *et al.*, 2001). Em nossa amostra, 11% dos casos apresentaram diferenciação sarcomatóide, a maioria em CCR de células claras (8/12). Similarmente ao observado na literatura, a maioria dos tumores que exibia áreas de diferenciação sarcomatóide pertencia a grupos de estágio alto.

Presença de necrose tumoral é também um indicador independente de pior prognóstico bem estabelecido para CCR de células claras, porém controverso para CCR papilífero e cromóforo (EBLE J.N., 2004; BOSTWICK, 2008). Em nossa amostra, 56,88% do total de casos apresentaram focos ou áreas de necrose: 56,41% (44) dos CCR de células claras, 75% (09) dos papilíferos e 14,28% (01) dos cromóforos (dados não mostrados). Comparativamente, um estudo da Clínica Mayo avaliou a importância de necrose tumoral entre os tipos de CCR. Necrose estava presente em 28% dos CCR de células claras, 47% dos papilíferos e 20% dos cromóforos. Mesmo após ajuste para estágio tumoral, tamanho e grau nuclear, a presença de necrose foi associada a um risco de morte de quatro a cinco vezes maior entre os pacientes com CCR de células claras e cromóforo, mas não para o papilífero (SENGUPTA; LOHSE; LEIBOVICH; FRANK *et al.*, 2005).

A incidência de multifocalidade no CCR esporádico é variável, podendo chegar a 15% (TSIVIAN; MOREIRA; CASO; MOURAVIEV *et al.*, 2010). Entretanto, as taxas de recorrência local após nefrectomia parcial são bastante baixas: 0,8% para tumores em T1a e 3,6% para T1b (PATARD; SHVARTS; LAM; PANTUCK *et al.*, 2004). Similarmente, multifocalidade em nosso estudo foi observada em 14 casos (12,84%), enquanto apenas 06 casos (5,5%) apresentaram recidiva tumoral. Ainda assim, 03 casos de multifocalidade e de recidiva ocorreram em pacientes com VHL (CCR não esporádico). Como era de se esperar, houve boa concordância entre casos de recidiva e multifocalidade ao diagnóstico.

Assim como a incidência, as taxas de mortalidade da neoplasia vêm aumentando, embora menos rapidamente, devido ao maior número de tumores pequenos diagnosticados e a

avanços no tratamento da neoplasia (LINDBLAD, 2004; CORGNA; BETTI *et al.*, 2007). Em nosso estudo, a mortalidade específica da doença foi de 13,76% (15 casos). A média do tempo de seguimento do nosso estudo foi de 23,23 meses (01 dia – 79 meses), considerada pequena ao compararmos com a maioria dos grandes estudos, que é de 35 meses a mais de 9 anos (AALTOMAA; LIPPONEN *et al.*, 1999; HEDBERG; DAVOODI *et al.*, 1999; MIGITA; ODA *et al.*, 2002; HEDBERG; LJUNGBERG *et al.*, 2003; DRUCKER, 2005; CORGNA; BETTI *et al.*, 2007). Talvez tivéssemos observado maior número de recidivas, metástases ou mesmo óbito pela neoplasia se o tempo de seguimento fosse maior.

Após traçarmos o perfil clínico e histopatológico de nossa amostra, analisamos a influência de fatores prognósticos clássicos para o CCR sobre a evolução clínica dos pacientes. De acordo com a literatura, dentre os tipos mais prevalentes de CCR, o de células claras apresenta pior prognóstico seguido por papilífero e cromóforo. Em análises multivariadas, entretanto, esse valor prognóstico parece desaparecer, sugerindo que o estadiamento clínico e grau nuclear tenham um maior impacto sobre o prognóstico do que o tipo histológico (BOSTWICK e MURPHY, 1998; EBLE J.N., 2004; LOPEZ-BELTRAN; SCARPELLI *et al.*, 2006; BOSTWICK, 2008; VOLPE e PATARD, 2010). Não foi possível avaliar a influência do tipo histológico sobre a evolução clínica dos pacientes, já que não foram observados metástase e/ou óbito por CCR papilífero e cromóforo na amostra. Também não avaliamos se a escolha do tratamento cirúrgico, nefrectomia parcial ou total, influenciaria a evolução clínica, pois para todos os pacientes que apresentaram má evolução clínica, a nefrectomia total com ou sem adrenalectomia foi o tratamento escolhido (dados não mostrados). Estudos têm demonstrado que a evolução dos pacientes com tumores entre 4,0 cm e 7,0 cm é semelhante quando nefrectomia parcial ou total é realizada (PATARD; SHVARTS *et al.*, 2004; FLANIGAN; POLCARI *et al.*, 2011).

Com relação às variáveis epidemiológicas, apenas o sexo pareceu influenciar a evolução clínica. A maior parte dos pacientes que apresentou má evolução era do sexo masculino. Aron *et al.*, 2008, analisando uma amostra de 35.336 casos de CCR também reportaram que o gênero masculino estava associado a um estágio maior ao diagnóstico e pior sobrevida em relação ao feminino (ARON; NGUYEN; STEIN e GILL, 2008). Também houve associação estatística entre má evolução clínica e a presença de sintomas ao diagnóstico. Schips *et al.*, 2003, avaliando 683 pacientes tratados por CCR relataram um aumento de 1,8 vezes no risco de morrer de câncer entre os pacientes sintomáticos em relação aos assintomáticos. A presença de sintomas associados ao CCR continuou a ser fator prognóstico independente após análise multivariada (SCHIPS; LIPSKY *et al.*, 2003).

Nossa amostra exibiu boa associação estatística com todos os outros fatores prognósticos descritos na literatura anteriormente analisados: tamanho tumoral, grupo de estágio clínico, grau nuclear de Fuhrman, diferenciação sarcomatóide, necrose, invasão vascular, invasão hilar e/ou de ureter, extensão peri-renal e/ou para adrenal, invasão capsular e presença de infiltrado linfocitário no tumor. Em todas as análises realizadas para o CCR de células claras isoladamente, observou-se significância estatística semelhante ao do total de casos (CCR). Isso indica que as variáveis utilizadas na avaliação de prognóstico em países desenvolvidos podem ser aplicadas aos nossos pacientes. Multifocalidade ao diagnóstico e recorrência tumoral não influenciaram a evolução clínica dos pacientes da amostra.

A análise da marcação imunoistoquímica para Ciclina D1 mostrou, em geral, irregularidade na quantidade de núcleos positivos e na intensidade de marcação. Notamos uma maior tendência à marcação da periferia do tumor em detrimento da região central. Essa marcação nuclear heterogênea foi também observada por outros autores (AALTOMAA; LIPPONEN *et al.*, 1999; HEDBERG; DAVOODI *et al.*, 1999; MIGITA; ODA; NAITO e TSUNEYOSHI, 2002; ZHU; YU *et al.*, 2010). Na maioria dos casos, percebemos uma diminuição da intensidade e do número de células marcadas em áreas de pior histologia (ex: focos de diferenciação sarcomatóide, focos contendo núcleos mais atípicos) dentro de um mesmo tumor. Por esse motivo, optamos por classificar a qualidade da marcação de Ciclina D1 de acordo com a área de pior histologia do tumor. Mais uma vez, destaca-se a importância da realização de ampla amostragem dos tumores renais recebidos para análise histopatológica, não só para melhor avaliação dos parâmetros histológicos já consagrados, mas, nesse caso, também para a escolha de lâminas contendo áreas de pior histologia para a aplicação e análise do marcador Ciclina D1.

Hedberg *et al.*, 2003, analisando a expressão imunoistoquímica de Ciclina D1 através da técnica de *tissue microarray* em 218 casos de CCR, utilizaram a forma de classificação baseada no número de células tumorais positivas por campo de grande aumento (cga) e intensidade de marcação, a qual adaptamos ao nosso estudo de acordo com a Tabela 1 (HEDBERG; LJUNGBERG *et al.*, 2003). Eles utilizaram o número de células positivas de 5 como ponto de corte, enquanto nós verificamos as associações estatísticas entre a expressão de Ciclina D1 e as variáveis evolução clínica, grupo de estágio clínico, grau nuclear de Fuhrman, tamanho do tumor e diferenciação sarcomatóide, utilizando os números de células marcadas de 5, 10 e 15 como pontos de corte, mas não obtivemos resultados significativos. Definimos, então, nova forma de classificação: baseada na porcentagem de células marcadas em toda a lâmina (Tabela 2). A escolha do ponto de corte para expressão baixa e alta da

Ciclina D1 também foi baseada em cálculos estatísticos preliminares, nos quais observamos associação estatisticamente significativa entre a expressão da proteína e a variável evolução clínica a partir de 30% de células marcadas em toda a lâmina, tanto para o total de casos quanto para CCR de células claras isoladamente.

CCR não é uma doença única. Representa uma família heterogênea de tumores, com diferentes origens histológicas, características citogenéticas, clínicas e comportamento biológico, apresentando também diferenças em prognóstico e resposta terapêutica (EBLE J.N., 2004;LOPEZ-BELTRAN;SCARPELLI *et al.*, 2006;FLANIGAN;POLCARI *et al.*, 2011). Além disso, novos tipos de CCR vêm sendo descritos (LOPEZ-BELTRAN; SCARPELLI *et al.*, 2006;SRIGLEY e DELAHUNT, 2009). Com essa heterogeneidade de entidades, é de se esperar que diferentes graus de expressão imunoistoquímica da proteína Ciclina D1 sejam observados entre eles. Nossos resultados mostraram que houve diferença estatisticamente significativa de expressão da proteína entre os tipos de CCR. Os casos de CCR papilífero e cromóforo exibiram menor quantidade de células marcadas e, na maioria das vezes, menor intensidade de marcação em relação ao CCR de células claras. Talvez o ponto de corte de classificação da Ciclina D1 para o CCR papilífero e cromóforo tivesse que ser menor que 30%/60% de células positivas como usado em nosso estudo.

Donnellan e Chetty, 1998, em um artigo de revisão, descreveram que a Ciclina D1, um dos mais prevalentes reguladores do ciclo celular implicados no desenvolvimento do câncer, encontra-se frequentemente superexpressa em vários tumores primários, enquanto proteínas que retardam a divisão celular, como as CDKIs, estão frequentemente inativadas. Relatam que muitos pesquisadores encontraram que níveis intratumorais de Ciclina D1 estavam associados ao prognóstico em diferentes tumores malignos (DONNELLAN e CHETTY, 1998). Na maioria deles, alta expressão da proteína parece estar relacionada a pior prognóstico, apesar de controvérsias existirem. Zhu *et al*, 2010, num estudo envolvendo 115 pacientes com câncer pulmonar não-pequenas células verificaram uma menor sobrevida entre os pacientes com tumores contendo Ciclina D1^{alta} do que naqueles com Ciclina D1^{baixa} ($p = 0,023$). Além disso, alta expressão da proteína estava associada a um pior prognóstico nos estágios iniciais (I, II) do carcinoma de pulmão não pequenas células, mesmo após análise multivariada (ZHU;YU *et al.*, 2010). Maeda *et al*, 1998, analisando uma amostra de 123 tumores de pacientes com adenocarcinoma colorretal, também verificaram menor sobrevida, além de maior taxa de recorrência, entre os pacientes contendo tumores com Ciclina D1^{alta} (MAEDA;CHUNG *et al.*, 1998).

Em contraste, a expressão alta de Ciclina D1 parece estar relacionada a sinais histológicos favoráveis e bom prognóstico no câncer de mama. Gillet *et al*, 1996, analisando uma amostra de 345 carcinomas mamários, observaram que cerca de 50% deles apresentavam marcação nuclear excessiva para Ciclina D1 em comparação com o epitélio normal. Marcação moderada/forte de Ciclina D1 estava associada a maior sobrevida e menor recorrência tumoral em relação aos casos com marcação fraca ou negativa. Funções da Ciclina D1 independentes de CDKs como atuação como co-fator para receptores de estrógeno e mutações em outros genes como da pRB poderiam explicar esses achados (GILLET;SMITH *et al.*, 1996;DIEHL, 2002).

Em relação ao CCR, os estudos sobre o papel patogenético da ciclina D1 são menos comuns e os resultados, um pouco discordantes (DONNELLAN e CHETTY, 1998; AALTOMAA;LIPPONEN *et al.*, 1999;HEDBERG;DAVOODI *et al.*, 1999;MIGITA;ODA *et al.*, 2002;HEDBERG;LJUNGBERG *et al.*, 2003;PHUOC; EHARA; GOTOH;NAKANO *et al.*, 2007). Em nosso estudo, a proteína Ciclina D1 estava presente nas células epiteliais renais de todos os casos de CCR e ausente nos controles. Esta superexpressão foi estatisticamente associada de uma maneira inversa à evolução clínica, para o total de casos e para CCR de células claras: pacientes com tumores contendo Ciclina D1^{baixa} apresentaram má evolução clínica, enquanto aqueles com tumores contendo Ciclina D1^{alta} apresentaram boa evolução. A sobrevida sem metástase e/ou óbito por CCR também foi menor entre os primeiros. A expressão de Ciclina D1 esteve também inversamente associada a vários fatores prognósticos bem estabelecidos na literatura. Casos contendo tumores com Ciclina D1^{baixa} exibiram presença de sintomas ao diagnóstico, tamanho tumoral > 4,0 cm, além de maior média de tamanho tumoral (7,2 cm x 5,23 cm para tumores com Ciclina D1^{alta}), alto grau nuclear de Fuhrman, presença de necrose tumoral e de diferenciação sarcomatóide. Para o grupo de estágio clínico, observamos associação estatística apenas ao separarmos a expressão de Ciclina D1 em suas categorias de classificação (2, 3, 4). Talvez pudesse ter havido associação significativa entre essa variável e expressão baixa ou alta de Ciclina D1 se a amostra fosse maior ou se o ponto de corte da porcentagem de marcação tecidual da proteína considerado baixa expressão fosse alterado de 30% para 40%.

Os demais aspectos clínicos e histológicos não exibiram associação estatística com a expressão de Ciclina D1. Não foi possível verificar a relação entre a expressão de Ciclina D1 e a evolução clínica ou fatores prognósticos para os casos de CCR papilífero e cromóforo, pois nenhum deles apresentou metástase e/ou óbito pela neoplasia durante o seguimento clínico, além de contarem com limitado número de casos. Apesar de não ter havido

associação entre a expressão de Ciclina D1 e a extensão da doença no momento do diagnóstico, percebemos que a maior parte dos casos com doença Localizada exibia tumores com Ciclina D1^{alta}, enquanto a maior parte dos casos de doença Metastática ao diagnóstico exibia tumores com Ciclina D1^{baixa}, reforçando a idéia de maior agressividade tumoral entre os casos com expressão mais baixa da proteína.

Hedberg *et al*, 1999, analisaram a expressão de Ciclina D1 numa amostra de 80 pacientes com CCR, utilizando as técnicas de Western-blot e imunoistoquímica (34 casos analisados). A classificação imunoistoquímica da expressão proteica foi dividida em 3 categorias: ausência de células positivas (I), baixo a intermediário nível de células positivas (II) e maioria de células positivas (III). 25% dos tumores exibiram Ciclina D1^{baixa} e 75% Ciclina D1^{alta}. Eles observaram que não houve correlação entre expressão de Ciclina D1 e grupo de estágio, grau nuclear, sexo ou tamanho tumoral para o total de casos. No entanto, houve associação estatística entre tumores com alta expressão da proteína e maior tempo de sobrevida, além de menor tamanho tumoral para o grupo de CCR não papilares (células claras), como também verificamos em nosso estudo. A análise de sobrevida não foi realizada para o total de casos. Após análise multivariada para o grupo de CCR de células claras, apenas grupo de estágio e expressão de Ciclina D1 constituíram fatores prognósticos independentes. Outro dado interessante desse estudo é que os autores não encontraram associação entre expressão de Ciclina D1 e porcentagem de células positivas para Ki-67 (marcador de proliferação celular), sugerindo que expressão alta da proteína não é equivalente a alta proliferação celular, como poderia se imaginar devido a seu papel de indutor de aumento da atividade de CDKs e, conseqüentemente, do ciclo celular (HEDBERG; DAVOODI *et al.*, 1999). Pelo menos no que diz respeito ao carcinoma renal, outras alterações em proteínas e/ou genes do ciclo celular como, por exemplo, as CDKIs, devem estar presentes.

Em novo estudo envolvendo reguladores do ciclo celular, Hedberg *et al*, 2003 analisaram 218 casos de CCR através da técnica de *tissue microarray*, utilizando critérios de classificação da expressão imunoistoquímica de Ciclina D1 anteriormente discutidos. Os resultados obtidos com essa técnica corresponderam aos verificados por Western-blot ($p < 0,001$), validando a primeira. Eles observaram que o padrão de expressão das proteínas avaliadas variava entre os diferentes tipos de CCR, concordando com achados da literatura de que alterações genéticas específicas caracterizam os diferentes tipos (KOVACS; AKHTAR *et al.*, 1997; HEDBERG; LJUNGBERG *et al.*, 2003). De forma semelhante à nossa amostra (Tabela 19), a maioria dos casos de CCR convencional (células claras) apresentava alta

expressão de Ciclina D1 (92/175 - 53%), enquanto a grande maioria dos casos de CCR papilífero e cromóforo exibia baixa expressão da proteína (26/29 - 90% e 11/14 - 79%, respectivamente). Para o CCR de células claras, os autores verificaram que baixos níveis de Ciclina D1 e p27 se associaram a alto grau nuclear, maior tamanho tumoral e menor sobrevida, enquanto não houve associação com sexo, idade ou grupo de estágio. Observamos resultados bastante semelhantes (para Ciclina D1) em nosso estudo. Já a expressão de Ciclina D3 e E não estava associada a nenhuma dessas variáveis. A análise multivariada utilizando os parâmetros Ciclina D1, D3, E, p27, grau nuclear e grupo de estágio demonstrou que apenas os três últimos constituíram fatores prognósticos independentes. Entre os tumores com expressão alta de p27 (80%), Ciclina D1 foi a ciclina mais frequentemente expressa, sozinha ou em combinação com Ciclina E e/ou D3. Para o CCR papilífero, não houve correlação entre a expressão das proteínas do ciclo celular e parâmetros clínico-patológicos. A maior parte dos casos apresentava baixos níveis das três ciclinas (52%), enquanto 30% dos tumores exibiam apenas níveis de p27 e Ciclina E altos. Para o CCR cromóforo, também não houve correlação entre a expressão das proteínas do ciclo celular e parâmetros clínico-patológicos. O padrão de expressão era diferente dos anteriores: 46% dos tumores exibiam baixos níveis das três ciclinas e do p27, enquanto num segundo padrão, Ciclina E exibia alta expressão, sozinha ou em combinação com altos níveis de Ciclina D1 e/ou D3 (HEDBERG; LJUNGBERG *et al.*, 2003).

Aaltomaa *et al.*, 1999, analisaram a expressão imunoistoquímica de Ciclinas A e D1 e p21 em 118 pacientes com CCR, considerando a fração de células positivas em toda a lâmina. As três proteínas não foram expressas no tecido renal normal adjacente aos tumores. Houve variação de marcação intra e intertumoral. A média (variação) das frações de núcleos positivos foi de 2,2% (0 a 20%), 23,3% (0 a 90%) e 6,8% (0 a 70%), respectivamente. A fração média de células positivas para Ciclina D1 foi menor do que a que observamos em nosso estudo (41,13%). Uma possibilidade é que esses autores tenham obtido maior número de casos de CCR papilífero e cromóforo em sua amostra. Ainda no artigo em questão, alta fração de células positivas para Ciclina D1 esteve associada à baixa proliferação celular (análise de Ki-67, PCNA e taxa de mitose) e tumores bem diferenciados, mas não à sobrevida ou grupo de estágio. Diferentemente, em nosso estudo a expressão de Ciclina D1 esteve relacionada à sobrevida. A expressão de p21 foi totalmente independente de outros fatores prognósticos e também não esteve relacionada à sobrevida. Já a expressão alta de Ciclina A (> 1%) esteve associada à presença de invasão venosa, maior grau nuclear, maior índice de proliferação celular e menor sobrevida. Não houve associação entre expressão de Ciclina A e

grupo de estágio. Dentre as proteínas analisadas, apenas a expressão de Ciclina A demonstrou ter valor prognóstico independente após análise multivariada, além de grupo de estágio, presença de metástase e Ki-67 alto (AALTOMAA;LIPPONEN *et al.*, 1999). Um dado interessante do artigo é que houve correlação positiva entre a expressão de p21 e Ciclina D1, sugerindo que p21 não se encontra alterado no CCR, mas acompanha as variações de Ciclina D1 com suas ações inibitórias sobre o ciclo celular.

Migita *et al.*, 2002, escolheram analisar a expressão imunoistoquímica das ciclinas A e D1 e do inibidor p27 apenas no grupo de CCR de células claras (67 casos). Não avaliaram a Ciclina E por ter havido baixa expressão nuclear ($< 1\%$ das células) nos tumores. O critério de classificação da expressão foi baseado na porcentagem de células positivas em toda a lâmina, com diferentes pontos de corte para baixa ou alta expressão para as diferentes proteínas. O tecido renal não neoplásico foi negativo para as ciclinas A, D1 e E, além do Ki-67, porém houve marcação para p27. De forma semelhante ao nosso estudo, notou-se heterogeneidade de marcação imunoistoquímica no tecido tumoral: p27 e Ciclina D1 foram expressas mais intensamente na periferia, enquanto Ciclina A esteve presente tanto na periferia quanto no centro dos tumores. Houve associação entre baixa expressão de p27 ($< 50\%$ de células tumorais positivas) e alto grupo de estágio (III ou IV) e maior tamanho tumoral ($\geq 7,0$ cm). A alta expressão de Ciclina A ($\geq 1\%$) esteve associada a alto grupo de estágio. Já a Ciclina D1 (ponto de corte de 10% de células positivas), diferentemente do que observamos em nosso estudo, não esteve associada a nenhum dos parâmetros clínico-patológicos avaliados (idade, sexo, tamanho tumoral, grau histológico e grupo de estágio). Houve correlação positiva entre expressão de p27 e ciclinas A e D1 e entre expressão de Ciclina A e Ciclina D1. Ciclina D1 não se correlacionou com o Ki-67. Em relação à sobrevida, Ciclina A^{alta}, Ciclina D1^{baixa} e Ki-67^{alto} tenderam a diminuir a sobrevida, porém sem significância estatística. Já o p27^{baixo} se relacionou a menor sobrevida. Após análise multivariada, apenas grupo de estágio e expressão de p27 constituíram fatores prognósticos independentes. Os autores também avaliaram a expressão de p27 em 06 CCR cromóforo e 04 CCR papilífero, notando que esses tipos raramente o expressam, independentemente do prognóstico (MIGITA;ODA *et al.*, 2002).

Phuoc *et al.*, 2007, avaliaram a expressão imunoistoquímica de diversos biomarcadores (Ki-67, p53, bcl-2, Ciclina D1, caveolina-1, VEGF e HER-2) em 119 casos de CCR de células claras. O critério de classificação de expressão das proteínas também foi baseado na porcentagem de células marcadas em toda a lâmina, com ponto de corte $\geq 50\%$ de células marcadas para caveolina-1^{alta} e $\geq 10\%$ para alta marcação das demais proteínas. Alta expressão de Ciclina D1 ocorreu em 64% dos casos, semelhante ao que observamos em nossa

amostra para CCR de células claras (66,67%). Em análise univariada, alta expressão de Ki-67, p53 (indutor de apoptose), VEGF (fator angiogênico) e caveolina-1 esteve associada a menor sobrevida, enquanto alta expressão de bcl-2 (inibidor de apoptose) e Ciclina D1 esteve associada a maior sobrevida, conforme também verificamos. Não houve associação entre expressão de HER-2 (tirosina-quinase transmembrana) e sobrevida. Já a análise multivariada, utilizando diversos parâmetros clínico-patológicos além das proteínas estudadas, revelou que apenas a presença de metástase, alta expressão de p53 e baixa de bcl-2 foram fatores prognósticos independentes. Para os casos metastáticos ao diagnóstico, apenas a alta expressão de p53 apresentou valor prognóstico em análise multivariada (PHUOC; EHARA; GOTOH; NAKANO *et al.*, 2007). Zigeuner *et al.*, 2004, analisando uma amostra de 188 pacientes com CCR também observaram que a alta expressão de p53 estava associada a pior prognóstico (baseado na ocorrência de metástase) para CCR de células claras (134 casos), inclusive após análise multivariada. Além disso, a superexpressão de p53 era mais frequente em CCR não células claras, principalmente no papilífero (ZIGEUNER; RATSCHKE; REHAK; SCHIPS *et al.*, 2004).

Em nosso estudo, realizamos a análise multivariada através da Regressão Logística para o total de casos e CCR de células claras isoladamente e comparamos os resultados dos modelos sem Ciclina D1 e com sua adição. Utilizamos os parâmetros que influenciaram estatisticamente a evolução clínica em nossa amostra: sexo, necrose, apresentação clínica, diferenciação sarcomatóide, grau nuclear de Fuhrman e grupo de estágio, além da Ciclina D1 no Modelo 2. Utilizamos também a variável diagnóstico (exceto para CCR de células claras) por haver diferenças no prognóstico entre os tipos de CCR relatadas na literatura. A variável tamanho tumoral não foi analisada em conjunto com as demais por já estar incluída na avaliação do grupo de estágio. Após o cálculo, verificamos que a expressão da Ciclina D1 não foi um fator prognóstico independente, tanto para o total de casos quanto para CCR de células claras, embora tenha melhorado levemente a acurácia do modelo adotado conforme observado pelas curvas ROC. Na maioria dos trabalhos que analisamos, a expressão de Ciclina D1 esteve associada à sobrevida também apenas em análise univariada (à exceção do estudo de Aaltomaa *et al.*, 1999) (AALTOMAA; LIPPONEN *et al.*, 1999; MIGITA; ODA *et al.*, 2002; HEDBERG; LJUNGBERG *et al.*, 2003; PHUOC; EHARA *et al.*, 2007). No primeiro artigo de Hedberg *et al.*, no entanto, ela representou um fator prognóstico independente após análise multivariada (HEDBERG; DAVOODI *et al.*, 1999). Em relação à associação entre expressão de Ciclina D1 e parâmetros clínico-patológicos, conforme relatamos, os resultados são ainda mais discordantes. Essas discrepâncias podem ter resultado de diferenças no número de casos

da amostra, tempo de seguimento (levando a menor ou maior número de óbitos e metástases), métodos de análise adotados (embora a maioria tenha optado pela técnica de imunoistoquímica), pontos de corte definidores de alta ou baixa expressão para a Ciclina D1 e demais proteínas do ciclo celular e parâmetros utilizados na análise multivariada. Além disso, observamos em nosso estudo e nos demais que o padrão de expressão da Ciclina D1 é diferente entre os tipos de CCR. Pelo exposto, diferentes padrões de expressão entre os diferentes tipos de CCR também foram notados para outras proteínas reguladoras do ciclo celular (MIGITA;ODA *et al.*, 2002;HEDBERG;LJUNGBERG *et al.*, 2003;ZIGEUNER;RATSCHEK;REHAK;SCHIPS *et al.*, 2004). Daí a importância de se analisar separadamente os tipos de CCR como diferentes neoplasias, homogeneizando os grupos.

Para nossa amostra, as variáveis clínico-patológicas grupo de estágio e diferenciação sarcomatóide foram os fatores prognósticos independentes para o total de casos e apenas o grupo de estágio para CCR de células claras. De forma semelhante a Hedberg *et al.*, 1999 e 2003, aplicamos uma outra análise multivariada nos casos de CCR de células claras, de modo a ter um grupo mais homogêneo, utilizando apenas grau nuclear de Fuhrman e grupo de estágio como parâmetros clínico-patológicos (sistema mais simplificado), além da expressão de Ciclina D1. Para esse sistema, a contribuição preditiva da Ciclina D1 também foi pequena na amostra (OR 2,88) e não se configurou num fator prognóstico independente para CCR de células claras. Apenas os dois parâmetros clínico-patológicos constituíram fatores independentes em prever má evolução clínica. No entanto, a área sob a curva ROC passou de 0,885 no modelo sem a Ciclina D1 para 0,907 no modelo com a adição da proteína (dados não mostrados). Não pudemos avaliar a influência da Ciclina D1 sobre a evolução nos casos de CCR papilífero e cromóforo por razões já discutidas. De acordo com os trabalhos analisados, entretanto, a Ciclina D1 parece ter um papel menor no prognóstico desses tipos de CCR, com expressão baixa na maioria dos casos (HEDBERG;LJUNGBERG *et al.*, 2003).

Notamos que houve associação estatisticamente significativa entre baixa expressão de Ciclina D1 e presença de metástase ao final do seguimento clínico. Essa relação pode indicar um possível papel da Ciclina D1 como marcador precoce de metástase para CCR, especialmente para CCR de células claras. Conforme já mencionado, a Ciclina D1 pode atuar em outras vias além de sua função como reguladora do ciclo celular. Dentre elas encontram-se sua contribuição para adesão celular e motilidade, através de interações entre a célula neoplásica e o microambiente tumoral, aumentando a capacidade de invasão e de metástase do tumor (STAMATAKOS;PALLA *et al.*, 2010). Seria lógico presumir então que alta expressão intratumoral de Ciclina D1 estaria relacionada a uma maior capacidade para

metástase e ocorrência precoce de micrometástases do que tumores onde expressão da proteína é baixa. Em estudos envolvendo carcinoma papilífero da tireóide e adenocarcinoma colorretal, verificou-se uma relação entre forte expressão de Ciclina D1 e metástase para linfonodos (MAEDA;CHUNG *et al.*, 1998;STAMATAKOS;PALLA *et al.*, 2010). Em nosso estudo, no entanto, não foi o que observamos. Em muitos trabalhos é discutida a hipótese de que a Ciclina D1 parece estar envolvida nas fases iniciais de transformação neoplásica, enquanto sua importância diminui à medida que o tumor progride (MUELLER;ODZE;JENKINS;SHAHSESFAEI *et al.*, 1997;DONNELLAN e CHETTY, 1998;HEDBERG;DAVOODI *et al.*, 1999). Isso poderia explicar a relação observada em nosso estudo entre tumores com Ciclina D1^{alta} e menor ocorrência de metástases, além de menor tamanho tumoral, indicativos de tumores menos avançados. Com a progressão da tumorigênese, a expressão de Ciclina D1 poderia ser normalizada ou até mesmo reduzida, enquanto eventos secundários, tais como desregulação da proteína pRB e inativações compensatórias de inibidores do complexo Ciclina D1/CDK4 (ex: p16, p27), assumiriam maior importância na definição do comportamento agressivo da neoplasia (MUELLER;ODZE *et al.*, 1997;HEDBERG;DAVOODI *et al.*, 1999;DIEHL, 2002; HEDBERG; LJUNGBERG; ROOS e LANDBERG, 2004). Hedberg *et al.*, 1999, fizeram inferências semelhantes para seus achados em CCR (HEDBERG;DAVOODI *et al.*, 1999).

Conforme previamente abordado, alguns mecanismos genéticos poderiam levar ao acúmulo da proteína Ciclina D1 na célula, aumentando seu poder oncogênico. Enquanto translocações cromossômicas envolvendo o *locus* de Ciclina D1 são relativamente raras na maioria dos cânceres, amplificações gênicas são mais comuns (DIEHL, 2002;KIM e DIEHL, 2009;STAMATAKOS;PALLA *et al.*, 2010). Hedberg *et al.*, 2004, avaliaram a frequência de amplificação gênica de CCND1 através da técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) em 133 casos de CCR para verificar se esta poderia ser a causa da superexpressão de Ciclina D1 na neoplasia. Nenhum dos casos exibiu amplificação gênica (HEDBERG;LJUNGBERG *et al.*, 2004). Outro mecanismo que poderia levar ao acúmulo de Ciclina D1 na célula seria a presença de polimorfismo G/A 870 com produção de uma variante da proteína, Ciclina D1b. Essa isoforma mantém a capacidade de formar o complexo ativo com CDK4, mas, por não conter o resíduo C-terminal de treonina, não é exportada para o citoplasma para posterior degradação (DIEHL, 2002;KNUDSEN;DIEHL;HAIMAN e KNUDSEN, 2006;KIM e DIEHL, 2009). Novos estudos devem ser realizados na tentativa de verificar se essa alteração está presente no câncer renal e em que frequência.

As funções das diferentes proteínas do ciclo celular estão altamente interligadas. Uma das funções da Ciclina D1, por exemplo, é o sequestro de p27 e p21 (família Kip/Cip), influenciando indiretamente a ativação de Ciclina E/CDK2 por alterar a disponibilidade desses inibidores. A ligação com esses inibidores parece ainda estabilizar a associação Ciclina D1-CDK4/6, garantindo a localização nuclear da Ciclina D1 durante a fase G1 por inibir sua exportação para o citoplasma onde seria degradada. Essas proteínas (p27 e p21) são reguladores negativos da transição G1-S e, entre outras funções, ligam-se e inibem o complexo Ciclina E-CDK2. Por sua vez, uma das ações do complexo Ciclina E-CDK2, e também do complexo Ciclina A-CDK2, é fosforilar a proteína pRb, levando à sua inativação. Já o p53, supressor tumoral que promove parada do ciclo celular e indução de apoptose, está em íntima relação com o inibidor p21, aumentando sua expressão quando necessário. A ativação de pRb seria, a princípio, a ação predominante da Ciclina D1 no ciclo celular através do complexo Ciclina D1-CDK4/6 (DIEHL, 2002;ROBBINS, 2005;KIM e DIEHL, 2009; STAMATAKOS;PALLA *et al.*, 2010).

A fosforilação da proteína pRb parece ser um ponto de convergência das várias vias de sinalização oncogênica, inclusive das que não são diretamente relacionadas ao ciclo celular. A perda da função de pRb pode ocorrer por alteração gênica ou proteica e é uma ocorrência comum em câncer, bem como a inativação de genes supressores tumorais que codificam as CDKs (WILLIAMS e STOEBER, 2012). Alta expressão de p16 (família INK4) é indicativo de inativação de pRb e pode servir como marcador indireto da função de pRb, já que p16 se liga às CDKs 4/6, impedindo a ação da Ciclina D1. Disfunções no eixo p16-Ciclina D1-pRb ocorrem em muitos tumores (KNUDSEN;DIEHL *et al.*, 2006). Hedberg *et al.*, 2004, avaliaram a expressão imunoistoquímica de pRb em 217 pacientes com CCR. 95% dos casos exibiram marcação nuclear, enquanto nenhum tumor exibiu expressão nuclear forte e frequente do inibidor p16, sugerindo que a proteína pRb era funcional. Não houve associação entre expressão de pRb e parâmetros clínicos para o CCR de células claras e o CCR papilífero (HEDBERG;LJUNGBERG *et al.*, 2004).

De um modo geral, pudemos observar em nosso estudo e nos demais avaliados, que o pior prognóstico em CCR parece estar relacionado à baixa expressão de Ciclina D1 e de p27 e alta expressão de Ciclina A e p53, enquanto a proteína pRb parece ser funcional. No entanto, os diferentes tipos de CCR apresentam diferentes perfis de expressão das proteínas do ciclo celular e devem ser analisados separadamente. Esse perfil parece se enquadrar bem para o CCR de células claras. Os demais tipos necessitam de novos estudos com maior número de

casos e maior tempo de seguimento, já que o padrão de agressividade tumoral com ocorrência de maior ou menor número de óbitos e metástases é diferente do CCR de células claras.

O mecanismo regulatório do ciclo celular é bastante complexo e envolve diversas proteínas com funções principais e secundárias dentro do próprio ciclo ou com outras atuações no organismo. Dificilmente alterações em uma única proteína serão responsáveis pelo complexo mecanismo de carcinogênese. Vale salientar que outros mecanismos como a coparticipação dos oncogenes *Ras* e *Neu* (c-erbB-2) estão também implicados nesse processo. Pelo que observamos, alterações nas proteínas regulatórias da transição G1-S são comuns em CCR e estão associadas ao comportamento tumoral. A importância da Ciclina D1 reside no fato de ela estar com expressão alterada na maioria dos tumores primários e de constituir um elo entre sinais mitogênicos e desencadeamento da proliferação celular. Na ausência de marcadores tumorais mais específicos para o prognóstico de CCR, sistemas integrados de estadiamento tendem a se tornar mais amplamente utilizados para avaliação clínica e definição de tratamento (DRUCKER, 2005). Se a quantificação da proteína e/ou gene da Ciclina D1 será incorporada a esses sistemas, especialmente para o tipo CCR de células claras, ainda é cedo para afirmar.

CONCLUSÕES

A maior parte das características epidemiológicas e clínicas de nossa amostra foi similar àquelas descritas na literatura mundial. A prevalência de doença metastática ao diagnóstico, no entanto, foi menor que o relatado na literatura. Os casos que exibiram má evolução clínica estiveram associados aos principais fatores prognósticos descritos na literatura, como presença de sintomas ao diagnóstico, maior tamanho tumoral, grupo de estágio alto, grau nuclear de Fuhrman alto, presença de necrose e de diferenciação sarcomatóide no tumor, além de outros. Isso indica que as variáveis utilizadas na avaliação de prognóstico em países desenvolvidos podem ser aplicadas aos nossos pacientes.

Nosso estudo demonstrou que a proteína Ciclina D1 encontra-se superexpressa no CCR. Seu padrão de expressão é diferente entre os tipos de CCR, exibindo menor nível de marcação imunoistoquímica entre os CCR papilífero e cromóforo. Para o total de casos e para CCR de células claras, em particular, sua baixa expressão esteve associada à má evolução clínica, maior tamanho tumoral, presença de sintomas ao diagnóstico, maior grau nuclear de Fuhrman, presença de necrose e de diferenciação sarcomatóide no tumor, além de menor sobrevida sem metástase e/ou óbito por CCR. No entanto, à semelhança do observado na maioria dos estudos, a expressão de Ciclina D1 não apresentou valor prognóstico independente após análise multivariada, embora tenha aumentado levemente a acurácia prognóstica do modelo adotado para análise. O principal fator prognóstico independente para nossa amostra foi o grupo de estágio.

Nosso estudo mostrou ainda uma possível utilização da Ciclina D1 como marcador precoce de metástase, já que observamos associação entre baixa expressão da proteína e ocorrência desse fenômeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALTOMAA, S. et al. Expression of cyclins A and D and p21(waf1/cip1) proteins in renal cell cancer and their relation to clinicopathological variables and patient survival. **Br J Cancer**, v. 80, n. 12, p. 2001-7, Aug 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471053> >.
- ALLEN, N. E. et al. A prospective analysis of the association between macronutrient intake and renal cell carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. **Int J Cancer**, v. 125, n. 4, p. 982-7, Aug 15 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19415751> >.
- ARON, M. et al. Impact of gender in renal cell carcinoma: an analysis of the SEER database. **Eur Urol**, v. 54, n. 1, p. 133-40, Jul 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18160207> >.
- BANNAYAN, G. A.; LAMM, D. L. Renal cell tumors. **Pathol Annu**, v. 15, n. Pt 2, p. 271-308, 1980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7005842> >.
- BARONTINI, M.; DAHIA, P. L. VHL disease. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 24, n. 3, p. 401-13, Jun 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20833332> >.
- BERGSTROM, A. et al. Obesity and renal cell cancer--a quantitative review. **Br J Cancer**, v. 85, n. 7, p. 984-90, Sep 28 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11592770> >.
- BERNSTEIN, J.; EVAN, A. P.; GARDNER, K. D., JR. Epithelial hyperplasia in human polycystic kidney diseases. Its role in pathogenesis and risk of neoplasia. **Am J Pathol**, v. 129, n. 1, p. 92-101, Oct 1987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3310652> >.
- BOSTWICK, D. G., CHENG, L. **Urological Surgical Pathology**. 2^o ed. Mosby-Elsevier, 2008.
- BOSTWICK, D. G.; MURPHY, G. P. Diagnosis and prognosis of renal cell carcinoma: highlights from an international consensus workshop. **Semin Urol Oncol**, v. 16, n. 1, p. 46-52, Feb 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9508083> >.
- BRASIL. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. 2012. Disponível em: < www.inca.gov.br >.
- BRUNING, T. et al. Renal cell cancer risk and occupational exposure to trichloroethylene: results of a consecutive case-control study in Arnsberg, Germany. **Am J Ind Med**, v. 43, n. 3, p. 274-85, Mar 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12594774> >.

- BUI, M. H. et al. Prognostic factors and molecular markers for renal cell carcinoma. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 1, n. 4, p. 565-75, Dec 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12113089> >.
- CALLE, E. E.; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 8, p. 579-91, Aug 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286738> >.
- CANU, I. G.; ELLIS, E. D.; TIRMARCHE, M. Cancer risk in nuclear workers occupationally exposed to uranium-emphasis on internal exposure. **Health Phys**, v. 94, n. 1, p. 1-17, Jan 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18091147> >.
- CHOW, W. H.; DEVESA, S. S. Contemporary epidemiology of renal cell cancer. **Cancer J**, v. 14, n. 5, p. 288-301, Sep-Oct 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18836333> >.
- CHOW, W. H. et al. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. **JAMA**, v. 281, n. 17, p. 1628-31, May 5 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10235157> >.
- CHOW, W. H.; DONG, L. M.; DEVESA, S. S. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. **Nat Rev Urol**, v. 7, n. 5, p. 245-57, May 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20448658> >.
- CONCOLINO, G. et al. Acquired cystic kidney disease: the hormonal hypothesis. **Urology**, v. 41, n. 2, p. 170-5, Feb 1993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8497993> >.
- CORGNA, E. et al. Renal cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 64, n. 3, p. 247-62, Dec 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17662611> >.
- CURRY, N. S.; COCHRAN, S. T.; BISSADA, N. K. Cystic renal masses: accurate Bosniak classification requires adequate renal CT. **AJR Am J Roentgenol**, v. 175, n. 2, p. 339-42, Aug 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10915671> >.
- DALL'OGGIO, M. et al. [Incidental and symptomatic kidney cancer: pathological features and survival]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 50, n. 1, p. 27-31, Jan-Mar 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15253022> >.
- DE PERALTA-VENTURINA, M. et al. Sarcomatoid differentiation in renal cell carcinoma: a study of 101 cases. **Am J Surg Pathol**, v. 25, n. 3, p. 275-84, Mar 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11224597> >.

- DHOTE, R. et al. Risk factors for adult renal cell carcinoma. **Urol Clin North Am**, v. 31, n. 2, p. 237-47, May 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15123404> >.
- DICKMAN, P. W. et al. Survival of cancer patients in Finland 1955-1994. **Acta Oncol**, v. 38 Suppl 12, p. 1-103, 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10225326> >.
- DIEHL, J. A. Cycling to cancer with cyclin D1. **Cancer Biol Ther**, v. 1, n. 3, p. 226-31, May-Jun 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12432268> >.
- DONNELLAN, R.; CHETTY, R. Cyclin D1 and human neoplasia. **Mol Pathol**, v. 51, n. 1, p. 1-7, Feb 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9624412> >.
- DOUBLET, J. D. et al. Renal cell carcinoma of native kidneys: prospective study of 129 renal transplant patients. **J Urol**, v. 158, n. 1, p. 42-4, Jul 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9186319> >.
- DRUCKER, B. J. Renal cell carcinoma: current status and future prospects. **Cancer Treat Rev**, v. 31, n. 7, p. 536-45, Nov 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16236454> >.
- EBLE J.N., SAUTER G., EPSTEIN J.I., SESTERHENN I.A. (EDS.). **Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. World Health Organization Classification of Tumours**. Lyon, France: IARC Press, International Agency for Research on Cancer, 2004.
- FLANIGAN, R. C. et al. Metastatic renal cell carcinoma. **Curr Treat Options Oncol**, v. 4, n. 5, p. 385-90, Oct 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941198> >.
- FLANIGAN, R. C.; POLCARI, A. J.; HUGEN, C. M. Prognostic variables and nomograms for renal cell carcinoma. **Int J Urol**, v. 18, n. 1, p. 20-31, Jan 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21077960> >.
- FLEMING, S. Genetics of kidney tumours. **Forum (Genova)**, v. 8, n. 2, p. 176-84, Apr-Jun 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9666053> >.
- FUHRMAN, S. A.; LASKY, L. C.; LIMAS, C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. **Am J Surg Pathol**, v. 6, n. 7, p. 655-63, Oct 1982. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7180965> >.
- FURNISS, D. et al. Prognostic factors for renal cell carcinoma. **Cancer Treat Rev**, v. 34, n. 5, p. 407-26, Aug 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18440705> >.

- GILLETT, C. et al. Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer. **Int J Cancer**, v. 69, n. 2, p. 92-9, Apr 22 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608989> >.
- GODLEY, P. A.; ATAGA, K. I. Renal cell carcinoma. **Curr Opin Oncol**, v. 12, n. 3, p. 260-4, May 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10841199> >.
- GREENE FL, PAGE D., MORROW M., BALCH C., HALLER D., FRITZ A., FLEMING I., EDS. **AJCC Cancer Staging Manual**. 6th. New York: Springer, 2002.
- HEDBERG, Y. et al. Cyclin-D1 expression in human renal-cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 84, n. 3, p. 268-72, Jun 21 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10371345> >.
- HEDBERG, Y. et al. Expression of cyclin D1, D3, E, and p27 in human renal cell carcinoma analysed by tissue microarray. **Br J Cancer**, v. 88, n. 9, p. 1417-23, May 6 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778072> >.
- HEDBERG, Y. et al. Retinoblastoma protein in human renal cell carcinoma in relation to alterations in G1/S regulatory proteins. **Int J Cancer**, v. 109, n. 2, p. 189-93, Mar 20 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14750168> >.
- HEIDENREICH, A.; RAVERY, V. Preoperative imaging in renal cell cancer. **World J Urol**, v. 22, n. 5, p. 307-15, Nov 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15290202> >.
- HEIDENREICH, A.; SCHRADER, A. J.; VARGA, Z. Basic science and research in renal cell carcinoma: from workbench to bedside. **Curr Opin Urol**, v. 13, n. 6, p. 457-62, Nov 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14560138> >.
- HOPENHAYN-RICH, C.; BIGGS, M. L.; SMITH, A. H. Lung and kidney cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Cordoba, Argentina. **Int J Epidemiol**, v. 27, n. 4, p. 561-9, Aug 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9758107> >.
- HU, J.; MAO, Y.; WHITE, K. Renal cell carcinoma and occupational exposure to chemicals in Canada. **Occup Med (Lond)**, v. 52, n. 3, p. 157-64, May 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12063361> >.
- HU, J.; UGNAT, A. M. Active and passive smoking and risk of renal cell carcinoma in Canada. **Eur J Cancer**, v. 41, n. 5, p. 770-8, Mar 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15763654> >.

- HUNT, J. D. et al. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. **Int J Cancer**, v. 114, n. 1, p. 101-8, Mar 10 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15523697> >.
- IL'YASOVA, D.; SCHWARTZ, G. G. Cadmium and renal cancer. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 207, n. 2, p. 179-86, Sep 1 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102569> >.
- KIM, J. K.; DIEHL, J. A. Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. **J Cell Physiol**, v. 220, n. 2, p. 292-6, Aug 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19415697> >.
- KIRKALI, Z.; LEKILI, M. Renal cell carcinoma: new prognostic factors? **Curr Opin Urol**, v. 13, n. 6, p. 433-8, Nov 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14560134> >.
- KNUDSEN, K. E. et al. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. **Oncogene**, v. 25, n. 11, p. 1620-8, Mar 13 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16550162> >.
- KONTAK, J. A.; CAMPBELL, S. C. Prognostic factors in renal cell carcinoma. **Urol Clin North Am**, v. 30, n. 3, p. 467-80, Aug 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12953749> >.
- KOVACS, G. et al. The Heidelberg classification of renal cell tumours. **J Pathol**, v. 183, n. 2, p. 131-3, Oct 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9390023> >.
- LAMBE, M. et al. Pregnancy and risk of renal cell cancer: a population-based study in Sweden. **Br J Cancer**, v. 86, n. 9, p. 1425-9, May 6 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11986775> >.
- LARSSON, P. et al. Tumor-cell proliferation and prognosis in renal-cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 55, n. 4, p. 566-70, Oct 21 1993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8406982> >.
- LEE, J. E.; HANKINSON, S. E.; CHO, E. Reproductive factors and risk of renal cell cancer: the Nurses' Health Study. **Am J Epidemiol**, v. 169, n. 10, p. 1243-50, May 15 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19329527> >.
- LEE, J. E. et al. Alcohol intake and renal cell cancer in a pooled analysis of 12 prospective studies. **J Natl Cancer Inst**, v. 99, n. 10, p. 801-10, May 16 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17505075> >.

- LEWIS, R. J. et al. Mortality and cancer morbidity in a cohort of Canadian petroleum workers. **Occup Environ Med**, v. 60, n. 12, p. 918-28, Dec 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14634182> >.
- LINDBLAD, P. Epidemiology of renal cell carcinoma. **Scand J Surg**, v. 93, n. 2, p. 88-96, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15285559> >.
- LINDBLAD, P. et al. The role of diabetes mellitus in the aetiology of renal cell cancer. **Diabetologia**, v. 42, n. 1, p. 107-12, Jan 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10027588> >.
- LIPWORTH, L.; TARONE, R. E.; MCLAUGHLIN, J. K. The epidemiology of renal cell carcinoma. **J Urol**, v. 176, n. 6 Pt 1, p. 2353-8, Dec 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17085101> >.
- LOPEZ-BELTRAN, A. et al. 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults. **Eur Urol**, v. 49, n. 5, p. 798-805, May 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16442207> >.
- MAEDA, K. et al. Cyclin D1 overexpression and prognosis in colorectal adenocarcinoma. **Oncology**, v. 55, n. 2, p. 145-51, Mar-Apr 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9499189> >.
- MAGYARLAKI, T. et al. Prognostic histological and immune markers of renal cell carcinoma. **Pathol Oncol Res**, v. 7, n. 2, p. 118-24, 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11458274> >.
- MANDEL, J. S. et al. International renal-cell cancer study. IV. Occupation. **Int J Cancer**, v. 61, n. 5, p. 601-5, May 29 1995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7768630> >.
- MARPLE, J. T.; MACDOUGALL, M.; CHONKO, A. M. Renal cancer complicating acquired cystic kidney disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 4, n. 12, p. 1951-6, Jun 1994. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7919148> >.
- MCCREDIE, M. et al. International renal-cell cancer study. II. Analgesics. **Int J Cancer**, v. 60, n. 3, p. 345-9, Jan 27 1995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7829242> >.
- MCLAUGHLIN, J. K. Renal cell cancer and exposure to gasoline: a review. **Environ Health Perspect**, v. 101 Suppl 6, p. 111-4, Dec 1993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8020434> >.

- MCLAUGHLIN, J. K. et al. International renal-cell cancer study. I. Tobacco use. **Int J Cancer**, v. 60, n. 2, p. 194-8, Jan 17 1995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7829215> >.
- MCLAUGHLIN, J. K.; LIPWORTH, L. Epidemiologic aspects of renal cell cancer. **Semin Oncol**, v. 27, n. 2, p. 115-23, Apr 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10768591> >.
- MCLAUGHLIN, J. K. et al. A population--based case--control study of renal cell carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, v. 72, n. 2, p. 275-84, Feb 1984. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6582315> >.
- MICKISCH, G. et al. Guidelines on renal cell cancer. **Eur Urol**, v. 40, n. 3, p. 252-5, Sep 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684839> >.
- MIGITA, T. et al. Low expression of p27(Kip1) is associated with tumor size and poor prognosis in patients with renal cell carcinoma. **Cancer**, v. 94, n. 4, p. 973-9, Feb 15 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11920465> >.
- MILOWSKY, M. I.; NANUS, D. M. Advanced renal cell carcinoma. **Curr Treat Options Oncol**, v. 2, n. 5, p. 437-45, Oct 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12057107> >.
- MIRRA AP, L. M., VENEZIANO DB. (ED.). **Incidência de Câncer no Município de São Paulo, Brasil 1997-1998: mortalidade de Câncer no Município de São Paulo, Brasil: tendência no Período de 1969-1998**. Ministério da Saúde. Brasília, DF 2001.
- MOTZER, R. J. et al. Renal cell carcinoma. **Curr Probl Cancer**, v. 21, n. 4, p. 185-232, Jul-Aug 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9285186> >.
- MUELLER, A. et al. A transgenic mouse model with cyclin D1 overexpression results in cell cycle, epidermal growth factor receptor, and p53 abnormalities. **Cancer Res**, v. 57, n. 24, p. 5542-9, Dec 15 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9407965> >.
- NARDI, A. C. et al. Epidemiologic characteristics of renal cell carcinoma in Brazil. **Int Braz J Urol**, v. 36, n. 2, p. 151-7; discussion 158, Mar-Apr 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20450499> >.
- NEUZILLET, Y. et al. De novo renal cell carcinoma of native kidney in renal transplant recipients. **Cancer**, v. 103, n. 2, p. 251-7, Jan 15 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15593084> >.

- NOORDZIJ, M. A.; MICKISCH, G. H. The genetic make-up of renal cell tumors. **Urol Res**, v. 32, n. 4, p. 251-4, Aug 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15497212> >.
- PANTUCK, A. J.; ZISMAN, A.; BELLDEGRUN, A. Biology of renal cell carcinoma: changing concepts in classification and staging. **Semin Urol Oncol**, v. 19, n. 2, p. 72-9, May 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11354536> >.
- PARKER, A. S. et al. History of urinary tract infection and risk of renal cell carcinoma. **Am J Epidemiol**, v. 159, n. 1, p. 42-8, Jan 1 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14693658> >.
- PATARD, J. J. et al. Safety and efficacy of partial nephrectomy for all T1 tumors based on an international multicenter experience. **J Urol**, v. 171, n. 6 Pt 1, p. 2181-5, quiz 2435, Jun 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15126781> >.
- PHUOC, N. B. et al. Immunohistochemical analysis with multiple antibodies in search of prognostic markers for clear cell renal cell carcinoma. **Urology**, v. 69, n. 5, p. 843-8, May 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17482919> >.
- POMPEO ACL, M. A., SOUZA JR AEP, ABRANTES et al. **Câncer Renal: Diagnóstico e Estadiamento. Projeto Diretrizes - Associação Médica Brasileira e Conselho Federal e Medicina**. Sociedade Brasileira de Urologia. 2006.
- POMPEO, A. C. L., WROCLAWSKI, E.R., SADI, M. V. **Algoritmos em Uro-Oncologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- RASHIDKHANI, B.; LINDBLAD, P.; WOLK, A. Fruits, vegetables and risk of renal cell carcinoma: a prospective study of Swedish women. **Int J Cancer**, v. 113, n. 3, p. 451-5, Jan 20 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15455348> >.
- REIS, M.; GUIMARAES, M. [Renal-cell carcinoma. The basic concepts]. **Acta Med Port**, v. 12, n. 1-3, p. 81-5, Jan-Mar 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10423878> >.
- RENEHAN, A. G. et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. **Lancet**, v. 371, n. 9612, p. 569-78, Feb 16 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18280327> >.
- REUTER, V. E.; PRESTI, J. C., JR. Contemporary approach to the classification of renal epithelial tumors. **Semin Oncol**, v. 27, n. 2, p. 124-37, Apr 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10768592> >.

- ROBBINS, S. L., COTRAN, R.S. **Bases Patológicas das Doenças**. 7º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- ROFSKY, N. M.; BOSNIAK, M. A. MR imaging in the evaluation of small ($< \text{or} = 3.0 \text{ cm}$) renal masses. **Magn Reson Imaging Clin N Am**, v. 5, n. 1, p. 67-81, Feb 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8995125> >.
- ROSENBERG, L. et al. Transitional cell cancer of the urinary tract and renal cell cancer in relation to acetaminophen use (United States). **Cancer Causes Control**, v. 9, n. 1, p. 83-8, Jan 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486467> >.
- RUSSO, P. Renal cell carcinoma: presentation, staging, and surgical treatment. **Semin Oncol**, v. 27, n. 2, p. 160-76, Apr 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10768595> >.
- RUSSO, P. Localized renal cell carcinoma. **Curr Treat Options Oncol**, v. 2, n. 5, p. 447-55, Oct 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12057108> >.
- SALI, D.; BOFFETTA, P. Kidney cancer and occupational exposure to asbestos: a meta-analysis of occupational cohort studies. **Cancer Causes Control**, v. 11, n. 1, p. 37-47, Jan 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10680728> >.
- SATOH, S. et al. Renal cell and transitional cell carcinoma in a Japanese population undergoing maintenance dialysis. **J Urol**, v. 174, n. 5, p. 1749-53, Nov 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16217276> >.
- SCHIPS, L. et al. Impact of tumor-associated symptoms on the prognosis of patients with renal cell carcinoma: a single-center experience of 683 patients. **Urology**, v. 62, n. 6, p. 1024-8, Dec 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14665348> >.
- SCHMID, H. P.; SZABO, J. [Renal cell carcinoma--a current review]. **Praxis (Bern 1994)**, v. 86, n. 20, p. 837-43, May 14 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9312811> >.
- SCOTT, C. S.; CHIU, W. A. Trichloroethylene cancer epidemiology: a consideration of select issues. **Environ Health Perspect**, v. 114, n. 9, p. 1471-8, Sep 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16966107> >.
- SENGUPTA, S. et al. Histologic coagulative tumor necrosis as a prognostic indicator of renal cell carcinoma aggressiveness. **Cancer**, v. 104, n. 3, p. 511-20, Aug 1 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15973740> >.

- SETIAWAN, V. W. et al. Risk factors for renal cell cancer: the multiethnic cohort. **Am J Epidemiol**, v. 166, n. 8, p. 932-40, Oct 15 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17656615> >.
- SRIGLEY, J. R.; DELAHUNT, B. Uncommon and recently described renal carcinomas. **Mod Pathol**, v. 22 Suppl 2, p. S2-S23, Jun 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19494850> >.
- STAMATAKOS, M. et al. Cell cyclins: triggering elements of cancer or not? **World J Surg Oncol**, v. 8, p. 111, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21176227> >.
- STEWART, J. H. et al. Cancers of the kidney and urinary tract in patients on dialysis for end-stage renal disease: analysis of data from the United States, Europe, and Australia and New Zealand. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, n. 1, p. 197-207, Jan 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12506152> >.
- TICKOO, S. K. et al. Spectrum of epithelial neoplasms in end-stage renal disease: an experience from 66 tumor-bearing kidneys with emphasis on histologic patterns distinct from those in sporadic adult renal neoplasia. **Am J Surg Pathol**, v. 30, n. 2, p. 141-53, Feb 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16434887> >.
- TIHAN, T.; FILIPPA, D. A. Coexistence of renal cell carcinoma and malignant lymphoma. A causal relationship or coincidental occurrence? **Cancer**, v. 77, n. 11, p. 2325-31, Jun 1 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8635103> >.
- TSIVIAN, M. et al. Predicting occult multifocality of renal cell carcinoma. **Eur Urol**, v. 58, n. 1, p. 118-26, Jul 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20346577> >.
- VOGELZANG, N. J.; STADLER, W. M. Kidney cancer. **Lancet**, v. 352, n. 9141, p. 1691-6, Nov 21 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9853456> >.
- VOLPE, A.; JEWETT, M. A. The natural history of small renal masses. **Nat Clin Pract Urol**, v. 2, n. 8, p. 384-90, Aug 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16474735> >.
- VOLPE, A.; PATARD, J. J. Prognostic factors in renal cell carcinoma. **World J Urol**, v. 28, n. 3, p. 319-27, Jun 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20364259> >.
- WAXMAN, J. **Urological Cancers**. Singapore:Springer, 2005.

- WEIKERT, S. et al. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. **Am J Epidemiol**, v. 167, n. 4, p. 438-46, Feb 15 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18048375> >.
- WHANG, Y. E.; GODLEY, P. A. Renal cell carcinoma. **Curr Opin Oncol**, v. 15, n. 3, p. 213-6, May 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778014> >.
- WILLIAMS, G. H.; STOEGER, K. The cell cycle and cancer. **J Pathol**, v. 226, n. 2, p. 352-64, Jan 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21990031> >.
- WOLK, A. et al. International renal cell cancer study. VII. Role of diet. **Int J Cancer**, v. 65, n. 1, p. 67-73, Jan 3 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8543399> >.
- WOLK, A.; LINDBLAD, P.; ADAMI, H. O. Nutrition and renal cell cancer. **Cancer Causes Control**, v. 7, n. 1, p. 5-18, Jan 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8850431> >.
- WROCLAWSKI, E. R., ET AL **Reunião de Diretrizes em Câncer Renal da Sociedade Brasileira de Urologia**. POMPEO, A. C. L., DAMIÃO, R., KOFT, W. (EDS) 2005.
- YUAN, J. M. et al. Tobacco use in relation to renal cell carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 7, n. 5, p. 429-33, May 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9610793> >.
- ZHU, J. et al. The relationships between cyclin D1 expression and prognosis of non-small cell lung cancer. **Chin J Lung Cancer**, v. 13, n. 8, p. 803-8, Aug 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20704822> >.
- ZIGEUNER, R. et al. Value of p53 as a prognostic marker in histologic subtypes of renal cell carcinoma: a systematic analysis of primary and metastatic tumor tissue. **Urology**, v. 63, n. 4, p. 651-5, Apr 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15072872> >.

ANEXOS

ANEXO A – Classificação de BOSNIAK para cistos renais (POMPEO, 2007) (adaptado)
(CURRY; COCHRAN e BISSADA, 2000)

Tipo	Descrição	Significado	Risco de Câncer (%)
I	Paredes finas, sem septos ou calcificações, densidade 0-20 unidades Hounsfield, contornos regulares, não capta contraste	É com certeza cisto simples	Zero
II	Semelhante ao tipo I, mas com septações ou calcificações finas da parede (< 1 mm)	É provavelmente cisto simples	Próximo a zero
IIIF (de “follow-up”)	Semelhante ao tipo II, mas sem características bem definidas (maior número de septações)	É cisto complexo	≤ 10
III	Paredes espessas, septações múltiplas e finas, irregulares, calcificações periféricas, densidade 0-20 unidades Hounsfield e septos que captam contraste	Pode ser cisto complexo ou tumor maligno	45
IV	Paredes espessas, septos espessos, calcificações difusas, densidade maior que 20 unidades Hounsfield, capta contraste	É provavelmente tumor maligno	90

ANEXO B – Estadiamento anatomopatológico e clínico segundo *American Joint Committee on Cancer TNM Staging of Renal Cell Carcinoma (2002)*

Tumor Primário (T)	
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Ausência de tumor primário
T1	Tumor < 7,0cm confinado ao rim
T1a	Tumor ≤ 4,0cm confinado ao rim
T1b	Tumor > 4,0cm e ≤ 7,0cm confinado ao rim
T2	Tumor > 7,0cm confinado ao rim
T3	Tumor se estende aos vasos hilares ou invade a supra-renal ou o tecido peri-renal, não ultrapassando a fáscia de Gerota
T3a	Invasão da supra-renal, gordura peri-renal, seio renal
T3b	Extensão macroscópica a Veia Renal e Veia Cava abaixo do diafragma
T3c	Extensão tumoral para a Veia Cava, acima do diafragma, ou invasão da parede da Veia Cava
T4	Tumor se estende além da fáscia de Gerota
Linfonodos Regionais (N)	
Nx	Linfonodos não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em um único linfonodo regional
N2	Metástase em mais de um linfonodo regional
Metástases à Distância (M)	
Mx	Metástases não podem ser avaliadas
M0	Ausência de metástase
M1	Presença de metástase

Grupos de Estádio	
I	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0
III	T1 N1 M0
	T2 N1 M0
IV	T3 N0/N1 M0
	T4 N0/N1 M0
	Qualquer T N2 M0
	Qualquer T ou N M1

ANEXO C – Classificação de Robson para estadiamento do CCR (CORGNA;BETTI *et al.*, 2007;POMPEO, 2007)

Estádio I	Tumor confinado ao rim, sem invasão da cápsula renal
Estádio II	Invasão da gordura renal
Estádio III	Invasão da Veia Renal ou Veia Cava Inferior (IIIa) ou dos linfonodos regionais (IIIb) ou ambos (IIIc)
Estádio IV	Invasão dos órgãos adjacentes (IVa) ou órgãos a distância (IVb)

ANEXO D – Aprovação pelo Comitê de Ética

Ribeirão Preto, 12 de abril de 2011

Ofício nº 1328/2011
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“EXPRESSÃO DE CICLINA D1 EM CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS UTILIZANDO A TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 321ª Reunião Ordinária realizada em 11/04/2011 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 1748/2011.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
MARCELA SAMPAIO LIMA
PROF. DR. ROBERTO SILVA COSTA (Orientador)
Depto. de Patologia e Medicina Legal

ANEXO E – Artigo a ser enviado para publicação**THE PROGNOSTIC VALUE OF CYCLIN D1 IN RENAL CELL CARCINOMA****ABSTRACT**

Introduction: Renal cell carcinoma (RCC) is a family of distinct tumors, and a variety of molecules have been evaluated as prognostic markers for RCC. Cyclin D1, a cell cycle regulator, is overexpressed in several primary tumors. **Objective:** To evaluate cyclin D1 expression as a prognostic marker in RCC. **Method:** In total, 109 tumor specimens from patients with RCC were obtained from 2005 to 2010 at Hospital das Clínicas - Ribeirão Preto School of Medicine – USP, Brazil, and submitted to immunohistochemical analysis along with 7 normal kidney tissue samples. **Results:** All of the normal kidney samples lacked cyclin D1 immunohistochemical staining. In addition, there was lower protein expression in the papillary and chromophobe RCC samples. Patients with cyclin D1^{low} tumors ($\leq 30\%$ positive cells) showed worse clinical outcome ($p = 0.03$), lower survival without metastasis and/or death by RCC ($p = 0.03$), high nuclear grade ($p = 0.001$), larger tumor size ($p = 0.01$), presence of symptoms at diagnosis ($p = 0.04$), necrosis ($p = 0.004$) and sarcomatoid differentiation ($p = 0.04$). After multivariate analysis, cyclin D1 was not an independent significant factor for worse outcome; however, it improved the accuracy of the adopted prognostic system. The analysis performed for clear cell RCC alone showed similar statistical significance to that of the total cases. **Conclusions:** Cyclin D1 protein was overexpressed in RCC. The types of RCC appear to exhibit different immunohistochemical staining patterns for cyclin D1; high protein expression was related to good clinical outcome and to most known favorable prognostic factors. Further investigations are necessary to reveal which mechanisms lead to cyclin D1 accumulation in neoplastic cells.

Keywords: Renal cell carcinoma, clear cell renal cell carcinoma, cyclin D1, prognostic factors.

INTRODUCTION

Renal cell carcinoma (RCC) accounts for 1 to 3% of all visceral cancers and for 85 to 90% of all kidney cancers in both sexes of adults, representing 2% of cancer deaths within the population [1,2]. Its incidence rate has been steadily increasing in almost all areas of the world [2,3]. RCC is a family of tubular epithelium-derived carcinomas that display distinct clinical, morphological and immunohistochemical aspects, resulting from different genetic abnormalities. [1,4]. Currently, tumor stage and nuclear grade are considered to be the most reliable prognostic markers for RCC. Although a variety of molecular markers have been evaluated for that purpose, none have yet been incorporated into clinical practice [5,6].

The orderly progression of cells through the cell cycle phases is orchestrated by cyclins, cyclin dependent-kinases (CDKs) and their inhibitors (CDKis). In response to a mitogenic signal, cyclin D1 forms an active complex with CDK4 or CDK6, which phosphorylates the retinoblastoma protein (pRB). This phosphorylation results in the release of E2F complexes from pRb-dependent repression, allowing the transcriptional activation of genes required for both G1/S transition and S-phase as well as for DNA replication [7-9]. The CCND1 gene, located on the long arm of chromosome 11q13, encodes cyclin D1, a 35 kDa nuclear protein. Cyclin D1 is a G1/S transition and unstable protein that represents a key-element in cell proliferation [7,8,10].

Cyclin D1 is one of the most prevalent cell cycle regulators involved in cancer development. The association between the aggressiveness of tumor growth and the overexpression of cyclin D1 has been observed in various tumors, such as non-small cell lung cancer, esophageal cancer and head and neck carcinomas [7,11]. However, its overexpression is not invariably associated with an unfavorable outcome. Studies on breast cancer have shown that cyclin D1 overexpression was associated with a good prognosis [12]. To date, only a few studies have evaluated the pathogenetic role of cyclin D1 in RCC with discordant results [7,13-16].

This study evaluates the expression of the cell cycle regulatory protein, cyclin D1, in RCC using immunohistochemistry. It also compares cyclin D1 expression with clinicopathological and prognostic factors for RCC and clear cell RCC alone.

MATERIALS AND METHODS

Patients and tissue samples

A total of 109 tumor specimens were obtained from patients histologically diagnosed with RCC who had undergone partial or total nephrectomy at Hospital das Clínicas - Ribeirão Preto School of Medicine – USP, Brazil from January 2005 to December 2010. None of the patients received chemotherapy or radiotherapy before their surgeries. The procedures involved were approved by the local University Ethics Committee (number 1748/2011).

There were 75 (68.8%) men and 34 (31.19%) women with a mean age of 58.54 years (range 12-89 years). According to the World Health Organization (WHO), the specimens were classified into 78 (71.55%) clear cell RCC, 12 (11%) papillary RCC, 7 (6.42%) chromophobe RCC and 12 (11%) others (multilocular cystic RCC, renal carcinoma associated with Xp11.2 translocations/TFE3 gene fusions, renal carcinoma associated with end-stage renal disease, and unclassified RCC and mixed – when more than one type of RCC was present). Clinical staging was performed according to the 2002 TNM classification system [17] and nuclear grading according to the Fuhrman classification [18]. The tumor size was measured on the surgical specimens. The patient's clinical records and histopathological features were fully documented. The follow-up period was defined as the time from surgery to the time of death or the time of last recorded clinical data. For statistical analysis, the patients were classified as having a better or worse clinical outcome (occurrence of metastasis and/or death by RCC).

Normal kidney-cortex tissue samples from 7 autopsied patients who died from other causes were included in the analysis. Among the selected cases, 4 were female and 3 were male with ages ranging from 22 to 38 years (mean of 32.14 years $\pm$ 5.49 SD).

Immunohistochemistry (IHC)

Paraffin-embedded blocks that contained representative parts of the tumor were selected (one for each specimen) by a pathologist (M.S.L.). If heterogeneity (regarding differentiation) was observed, then the areas with the lowest differentiation grade were chosen.

Paraffin sections (3 μ m) were placed on slides coated with poly-L-lysine, deparaffinised with xylene and rehydrated in decreasing concentrations of alcohol. To increase the reaction of primary antibodies, antigen retrieval was done by heating the sections in Tris-EDTA buffer (pH 9.0) in a steamer at 90-100°C for 45 minutes. After blocking of endogenous peroxidase activity by hydrogen peroxide, 3% (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) for 10 minutes, endogenous biotin enzyme was also blocked, with milk powder solution Molico (Nestlé Brazil LTDA, Brazil), properly prepared at 3% solution of Tris-HCl

(Tris + distilled water, pH 7.6) for 10 minutes and immediate application of the primary antibody. Cyclin D1 was detected by rabbit monoclonal antibody clone SP4 (Cell Marque, Rocklin, CA, USA), diluted 1:200 with 0.005% BSA (Bovine serum albumin) (Sigma, St. Louis, MO, USA) in Tris HCl (pH 7.6) solution with Tween 20. The incubation time was 2 hours. Next, the sections were properly washed with TBS-Tween 20 solution. Subsequently, the sections were incubated with adequate amounts of post primary blocker (Novocastra, Newcastle, UK) for 30 minutes and then washed with TBS-Tween 20. The indirect method using Polymers (Novocastra, Newcastle, UK) for 30 minutes was employed as the detection system. Chromogen development was performed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma, St Louis, MO, USA) and the material was counterstained with Harris hematoxylin (Merck), dehydrated in increasing concentrations of alcohol and mounted.

Normal human tonsil was used as a positive control in each reaction performed.

Immunohistochemical staining evaluation

The slides were independently examined by two authors (M.S.L. and G.E.B.S.). If any discrepancies existed between the reviewers, a consensus judgment was reached through discussion. The immunohistochemical expression of cyclin D1 was classified into 4 groups defined by the fraction of positive cells in the tumor section as follows: no positive cells (1), up to 30% positive cells (2), over 30% and up to 60% positive cells (3) and over 60% positive cells (4). Only nuclear cyclin D1 expression was evaluated. To simplify the analysis, groups 1 and 2 were considered tumors exhibiting low expression of the cyclin D1 protein, whereas groups 3 and 4 were tumors showing high protein expression.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SAS®9 software, and R software was used for the preparation of graphics. To verify the association between categorical variables, the Chi-square test was performed, and Student's t test for independent samples was utilized for continuous variables. A comparison of 3 or more independent groups was performed using analysis of variance (ANOVA).

The survival-time calculations were illustrated by Kaplan-Meier curves, and the log-rank test was used to determine if there were differences between the curves. The end-point for survival probability was defined by the occurrence of metastasis and/or death by RCC. To assess the independent value of different variables on worse clinical outcome in the presence of other variables, a multiple logistic regression was carried out to calculate the adjusted *Odds*

Ratio (OR). The ROC (receiver operating characteristic) curve was also used for the same purpose. A value of $p < 0.05$ was accepted as statistically significant.

RESULTS

Clinicopathologic findings

Most of the patients were male with the ratio being 2.2: 1, and the majority of cases occurred between the sixth and seventh decades (62; 56.88%). In total, 72 patients (66.05%) were hypertensives; 59 (54.12%) were smokers and the same number was above the normal weight, calculated by Body-Mass Index (BMI). Only 4 patients presented with hereditary cancer syndrome (von Hippel-Lindau disease). There were no patients with a family history of RCC. The presence of the tumor was an accidental finding upon imaging examination in 40 patients (36.69%), whereas 69 patients (63.3%) had some symptoms related to the disease. The size of the tumor ranged from 1.0 cm to 15.0 cm, with an average of 6.17 cm (± 3.19 SD). Clear cell RCC showed a greater tumor average (6.47 cm), followed by chromophobe RCC (5.33 cm). However, there was no statistically significant difference among tumor size averages for the three types of RCC most prevalent in the sample ($p = 0.25$, ANOVA).

At diagnosis, 62 (56.88%) patients were stage I, 13 (11.92%) patients were stage II, 18 (16.51%) patients were stage III and 16 (14.67%) patients were stage IV. Regarding nuclear grade, 11 (10.09%) patients, 56 (51.37%) patients, 28 (25.68%) patients and 14 (12.84%) patients were Fuhrman 1, 2, 3 and 4, respectively. At histological examination, 62 (56.88%) cases showed necrosis and only 12 (11%) cases showed foci or areas of sarcomatoid differentiation.

The mean follow-up time was 23.23 months ± 18.03 SD (95% CI 19.81-26.66). During the follow-up period, 20 patients (18.34%) presented with metastasis (local or distant metastasis) and 15 (13.76%) died of RCC. Clear cell RCC was the most common type among the obits (12/15) and metastatic cases (17/20). There were no deaths or metastasis due to papillary or chromophobe RCC.

Immunostaining and outcome evaluation

Most patients (85; 77.98%) showed good clinical outcome, and 24 (22.01%) patients exhibited a worse outcome. Cyclin D1 was not expressed in normal kidney-cortex tissue samples from the 7 autopsied patients, whereas all RCC cases expressed the protein (Figure 1). The tumors were classified as described in the “Materials and Methods”, and the results

were as follows: 52 tumors in group 2 (47.7%), 23 tumors in group 3 (21.1%) and 34 tumors in group 4 (31.19%). The mean fraction of cyclin D1 positive cells was 41.13% (range 1-98%) for all cases, 49.64% (range 2-98%) for clear cell RCC, 13.83% (range 1-45%) for papillary RCC and 19.43% (range 1-85%) for chromophobe RCC. According to Figure 2, it is evident that both papillary and chromophobe RCC showed, in general, fewer positive cells for cyclin D1 when compared with clear cell RCC ($p < 0.0001$, Chi-square test).

Cyclin D1^{low} tumors were associated with a worse clinical outcome, both for the total number of cases as to clear cell RCC alone (Tables 1 and 2). Kaplan-Meier curves showed that patients with cyclin D1^{low} tumors had lower survival without metastasis and/or death by RCC compared with those having cyclin D1^{high} tumors ($p = 0.03$ for RCC and $p = 0.002$ for clear cell RCC, log-rank test). Interestingly, the events occurred at the beginning of the follow-up, with subsequent stabilization of the curves (Figures 3A and B).

Association with clinicopathological parameters

Clinical outcome was related to all the clinicopathological parameters shown in Table 1 and 2, except age. The expression of cyclin D1 was not related to sex, age or stage group, although after splitting cyclin D1 expression in its original groups, the high stage group (III or IV) was related to group 2 (low expression) ($p = 0.02$ for RCC and $p = 0.0075$ for cell clear RCC). Cyclin D1^{low} tumors were associated with the presence of symptoms at diagnosis, larger tumor size, high nuclear grade (Fuhrman 3 or 4), presence of sarcomatoid differentiation (a tendency for clear cell RCC) and necrosis (Tables 1 and 2). Cyclin D1 was not related to any risk factors or to other histological findings, such as vascular, hilar or capsular invasion and peri-renal or adrenal extension for RCC ($p > 0.05$).

As shown in Figure 4, patients with cyclin D1^{low} tumors had a higher average tumor size (7.2 cm for RCC and 8.56 cm for clear cell RCC) than patients with cyclin D1^{high} tumors (5.23 cm for RCC and 5.43 cm for clear cell RCC). There was no association between tumor recurrence during follow-up (6 cases) and clinical outcome ($p = 0.74$) or expression of cyclin D1 ($p = 0.90$). All cases of von Hippel-Lindau disease (4) showed good clinical outcome and high expression of cyclin D1 (3 or 4), whereas all cases of unclassified RCC (3) showed worse clinical outcome and low expression of cyclin D1.

Multiple logistic regression was performed in all cases as well as clear cell RCC alone using the parameters shown in Table 3, without cyclin D1 (model 1) and with the addition of cyclin D1 (model 2). The independent significant factors for a worse clinical outcome were stage group and sarcomatoid differentiation for RCC and only stage group for clear cell RCC

alone. The ROC curves show the impact on outcome by adding cyclin D1 expression to the system adopted above (Figure 5A and B).

Interestingly, after splitting the outcome of metastatic disease and death by RCC, only the variable metastasis revealed a statistically significant association with cyclin D1 for all cases as well as clear cell RCC alone ($p = 0.02$ and $p = 0.001$, respectively).

DISCUSSION

The epidemiological profile of our sample was similar to that observed in the literature [1,2,3]. In our study, however, the prevalence of metastatic cases at diagnosis was lower (15.59%) than previously reported in the literature. This may reflect differences in the prevalence of risk factors for RCC among developed countries (or most industrialized areas) and developing ones and/or, to a lesser degree, genetic variations between populations. Hypertension, history of smoking and BMI above the normal reference values were the main risk factors for RCC. Furthermore, classical prognostic factors, such as stage group, nuclear grade, clinical presentation, tumor size, sarcomatoid differentiation and necrosis, were statistically related to the clinical outcome of our sample. This result indicates that the variables used in the assessment of prognosis in developed countries can be applied to our patients.

The immunohistochemical analysis of cyclin D1 revealed, in general, irregular staining in intensity and in the number of positive nuclei. Typically, tumor periphery was better marked. This heterogeneous nuclear staining was also observed by other authors [11,13,15,16]. We also observed a decrease in the intensity and number of stained cells in areas of worse histology. Hence, this result reveals the importance of conducting extensive sampling of renal tumors, not only for better assessment of histological parameters but also for choosing the most aggressive areas.

RCC is not a single disease. It is a very heterogeneous and complex neoplasia with a widely varying prognosis [1,4]. With this heterogeneity, it is expected that different patterns of immunohistochemical staining for cyclin D1 be observed among RCC subtypes. Both papillary and chromophobe RCC showed fewer positive cells compared with clear cell RCC. Perhaps the qualifying cutoff point for these tumor types needed to be less than 30/60% of positive cells.

Cyclin D1 was overexpressed in RCC samples and negative in controls. This overexpression was associated with clinical outcome and with most prognostic factors for

RCC in an inverse manner. Patients with cyclin D1^{low} tumors exhibited a worse clinical outcome, larger tumor size, presence of symptoms at diagnosis, higher Fuhrman nuclear grade, presence of necrosis and sarcomatoid differentiation in the tumor, as well as lower survival without metastasis and/or death by RCC. Analysis performed for clear cell RCC alone showed similar statistical significance to that of the total cases. Donnellan and Chetty, 1998, in a review article, showed that many researchers found that intratumoral cyclin D1 levels were correlated with the outcome of prognosis for different malignancies [7]. In most cases, higher expression of cyclin D1 was correlated with poor prognosis. In breast cancer, however, the expression of cyclin D1 was related to sex steroid receptor positivity, favorable histological signs and good prognosis [7,12]. Other functions of cyclin D1 independent of CDKs, such as acting as a cofactor for estrogen receptors and mutations in additional genes (e.g. pRB), could explain these findings [9,12].

After multivariate analysis, cyclin D1 protein was not an independent significant factor for worse clinical outcome; however, it slightly improved the accuracy of the system adopted as noted by ROC curves. Hedberg *et al.*, 1999, analyzed a sample of 80 patients with RCC and showed that increased levels of cyclin D1 were found in a large fraction of tumors and that low protein content of cyclin D1 was associated with shorter survival. After multivariate analysis, cyclin D1 was an independent significant factor for clear cell RCC [13]. In contrast, Aaltomaa *et al.*, 1999, using a sample of 118 cases, found no correlation between the expression of cyclin D1 and survival [15]. Additionally, Migita *et al.*, 2002, using a sample of 67 clear cell RCCs, found no correlation between the expression of cyclin D1 and survival or clinicopathological parameters, although cyclin D1^{low} tumors tended to decrease survival, but without statistical significance [16].

In a new study, Hedberg *et al.*, 2003, analyzed the expression of cyclins D1, D3 and E and p27 (a CDKi) in a larger sample (218 cases) and showed that low levels of cyclin D1 correlated with poor prognosis in clear cell RCC only by univariate analysis, and it was also related to high nuclear grade and larger tumor size, but not to sex, age or stage group, similar to what we observed in our sample. They also found that RCC subtypes show different patterns of expression of cyclin D1. For multivariate analysis, stage group and nuclear grade were used as clinicopathological parameters, with the addition of cyclin D1 and the other biomarkers [14]. We used the same clinicopathological parameters in a simplified multivariate analysis for clear cell RCC alone and similarly only stage group and nuclear grade were independent significant factors (data not shown). Those discrepancies may have resulted from differences in the following: sample size, follow-up time, methods of analysis

adopted, forms of classification and cutoff points defining high or low expression for cyclin D1 and other cell cycle proteins as well as parameters used in the multivariate analysis.

Our study also showed a possible use for cyclin D1 as an early marker of metastasis, particularly for clear cell RCC because we observed an association between low protein expression and its occurrence. An increase in cyclin D1 occurs relatively early during tumorigenesis. It has been suggested that cyclin D1 appears to be involved in the early stages of neoplastic transformation, whereas its importance decreases as the tumor progresses. The expression of cyclin D1 could be normalized or even reduced, whereas secondary events, such as deregulation of pRB and compensatory inactivating mutations in cyclin D1/CDK4 inhibitors (e.g. p16), would assume greater importance in defining the aggressive behavior of the neoplasia [7,9,13,19]. This might explain the correlation observed in our study between higher expression of cyclin D1 and the absence of metastasis or smaller tumor size, indicative for less advanced tumors. This same correlation was observed by Hedberg *et al.*, 1999 [13].

Chromosomal translocations, gene amplification, interruptions in the normal intracellular traffic and reduced proteolysis are the mechanisms that can lead to the accumulation of cyclin D1 in the nuclei of tumor cells [8-10]. Hedberg *et al.*, 2004, evaluated the frequency of CCND1 gene amplification using the FISH technique in 133 RCCs and found that none of them exhibited any sign of gene amplification [20]. The presence of polymorphisms G/A 870 that produces a variant protein, cyclin D1b, could lead to the accumulation of cyclin D1 in a cell by reduced proteolysis. This isoform is able to form the active complex with CDK4, but cannot be exported to the cytoplasm for subsequent degradation [9,10]. Studies have shown that overexpression of cyclin D1 alone exerts little influence on cell growth, suggesting that this protein is not a potent oncogene unless additional events occur. Cyclin D1 can also act in other ways that do not involve its cell cycle regulatory function, such as contributing to cell adhesion and motility and as a transcriptional cofactor for steroidal hormone receptors, such as estrogen and androgen [8,9]. These other actions may contribute to its oncogenic properties.

The functions of the various cell cycle proteins are highly interconnected. The phosphorylation of the pRb protein seems to be a point of convergence for several oncogenic signaling pathways, including those that are not directly related to the cell cycle. In the same article, Hedberg *et al.*, 2004, through their results, concluded that pRb seems to be functional in RCC [20]. Additional alterations in other G1/S transition proteins and/or genes, such as p21, p27 and p16 (CDKis), could explain why cyclin D1 levels are low in some tumors and if there is another cell cycle protein that could be better used as a prognostic marker for RCC.

The importance of cyclin D1 lies in the fact that it shows altered expression in most primary tumors and constitutes a link between mitogenic signals and the cell cycle network.

CONCLUSIONS

Our study showed that the cyclin D1 protein is overexpressed in RCC and that high protein levels were related to a better clinical outcome as well as to most of the favorable prognostic markers for RCC. Additionally, the cyclin D1 expression pattern appears to be different among RCC subtypes. The combination of the classical prognostic factors with molecular features, such as cyclin D1 protein expression, can increase the predictive accuracy of the current prognostic models for RCC, especially clear cell RCC. However, further investigations are necessary to reveal which mechanisms lead to cyclin D1 accumulation in neoplastic cells and what other events might be contributing to the progression of the disease.

LIST OF ABBREVIATIONS

BMI – Body-mass index

CDKis – Cyclin kinase-dependent inhibitors

CDKs – Cyclins kinase-dependent

CI – Confidence Interval

OR – *Odds Ratio*

RCC – Renal Cell Carcinoma

ROC – Receiver Operating Characteristic

SD – Standard Deviation

WHO – World Health Organization

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Mr. Flávio Leite and Mr. Guilherme Lemos for their excellent technical assistance and to CEMEQ (Center of Quantitative Methods from Hospital das Clínicas - Ribeirão Preto School of Medicine –USP) for statistical support.

REFERENCES

1. EBLE J.N, SAUTER G., EPSTEIN J.I., SESTERHENN I.A. (EDS.). **Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. World Health Organization Classification of Tumours.** Lyon, France: IARC Press, International Agency for Research on Cancer, 2004.
2. LINDBLAD, P. Epidemiology of renal cell carcinoma. **Scand J Surg**, v. 93, n. 2, p. 88-96, 2004.
3. CHOW, W-H.; DONG, L.M.; DEVESSA, S.S. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. **Nat Rev Urol**, v. 7, n. 5, p. 245-57, 2010.
4. LOPEZ-BELTRAN, A. et al. 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults. **Eur Urol**, v. 49, n. 5, p. 798-805, 2006.
5. VOLPE, A.; PATARD, J.J. Prognostic factors in renal cell carcinoma. **World J Urol**, v. 28, n. 3, p. 319-27, 2010.
6. FURNISS, D. et al. Prognostic factors for renal cell carcinoma. **Cancer Treat Rev**, v. 34, n. 5, p. 407-26, 2008.
7. DONNELLAN, R.; CHETTY, R. Cyclin D1 and human neoplasia. **Mol Pathol**, v. 51, n. 1, p. 1-7, 1998.
8. STAMATAKOS, M. et al. Cell cyclins: triggering elements of cancer or not? **World J Surg Oncol**, v. 8, p. 111, 2010.
9. DIEHL, J.A. Cycling to cancer with cyclin D1. **Cancer Biol Ther**, v. 1, n. 3, p. 226-31, 2002.
10. KIM, J. K.; DIEHL, J. A. Nuclear cyclin D1: na oncogenic driver in human cancer. **J Cell Physiol**, v. 220, n. 2, p. 292-6, 2009.
11. ZHU J. et al. The relationships between cyclin D1 expression and prognosis of non-small cell lung cancer. **Chin J Lung Cancer**, v. 13, n. 8, p. 803-8, 2010.
12. GILLET C. et al. Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer. **Int J Cancer**, v. 69, n. 2, p. 92-9, 1996.
13. HEDBERG, Y. et al. Cyclin-D1 expression in human renal-cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 84, n. 3, p. 268-72, 1999.
14. HEDBERG, Y. et al. Expression of cyclin D1, D3, E, and p27 in human renal cell carcinoma analysed by tissue microarray. **Br J Cancer**, v. 88, n. 9, p. 1417-23, 2003.
15. AALTOMAA, S. et al. Expression of cyclins A and D and p21^(waf1/cip1) proteins in renal cell cancer and their relation to clinicopathological variables and patient survival. **Br J Cancer**, v. 80, n. 12, p. 2001-7, 1999.

16. MIGITA, T. et al. Low expression of p27(Kip1) is associated with tumor size and poor prognosis in patients with renal cell carcinoma. **Cancer**, v. 94, n. 4, p. 973-9, 2002.
17. GREENE F.L., PAGE D., MORROW M., BALCH C., HALLER D., FRITZ A., FLEMING I., EDS. **AJCC Cancer Staging Manual**. 6th. New York: Springer, 2002.
18. FUHRMAN, S.A.; LASKY, L.C.; LIMAS C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. **Am J Surg Pathol**, v. 6, n. 7, p. 655-63, 1982.
19. MUELLER, A. et al. A transgenic mouse model with cyclin D1 overexpression results in cell cycle, epidermal growth factor receptor and p53 abnormalities. **Cancer Res**, v. 57, p. 5542-9, 1997.
20. HEDBERG, Y. et al. Retinoblastoma protein in human renal cell carcinoma in relation to alterations in G1/S regulatory proteins. **Int J Cancer**, v. 109, p. 189-93, 2004.

TABLES AND FIGURES

Table 1: Distribution of 109 RCC patients according to cyclin D1 expression and outcome

Variables	Categories	Cyclin D1		Total	p*	Outcome		Total	p*
		Low	High			Better	Worse		
Sex	F	15 (44.12%)	19 (55.88%)	34	0.6135	31 (91.18%)	3 (8.82%)	34	0.0252
	M	37 (49.33%)	38 (50.67%)	75		54 (72%)	21 (28%)	75	**
Age	< 50	10 (43.48%)	13 (56.52%)	23	0.8482	18 (78.26%)	5 (21.74%)	23	0.4095
	50-69	31 (50%)	31 (50%)	62		46 (74.19%)	16 (25.81%)	62	
	≥ 70	11 (45.83%)	13 (54.17%)	24		21 (87.5%)	3 (12.5%)	24	
Clinical presentation	Asymptomatic	14 (35%)	26 (65%)	40	0.0432	39 (97.5%)	1 (2.5%)	40	0.0002
	Symptomatic	38 (55.07%)	31 (44.93%)	69	**	46 (66.67%)	23 (33.33%)	69	**
Tumor size	≤ 4.0 cm	10 (29.41%)	24 (70.59%)	34	0.01	34 (100%)	0	34	0.0002
	> 4.0 cm	42 (56%)	33 (44%)	75	**	51 (68%)	24 (32%)	75	**
Stage group	Low (I, II)	34 (45.33%)	41 (54.67%)	75	0.4613	72 (96%)	3 (4%)	75	<0.0001
	High (III, IV)	18 (52.94%)	16 (47.06%)	34		13 (38.24%)	21 (61.76%)	34	**
Fuhrman	Low (1, 2)	24 (35.82%)	43 (64.18%)	67	0.0017	63 (94.03%)	4 (5.97%)	67	<0.0001
	High (3, 4)	28 (66.67%)	14 (33.33%)	42	**	22 (52.38%)	20 (47.62%)	42	**
Sarcomatoid differentiation	No	43 (44.33%)	54 (55.67%)	97	0.0448	82 (84.54%)	15 (15.46%)	97	<0.0001
	Yes	9 (75%)	3 (25%)	12	**	3 (25%)	9 (75%)	12	**
Necrosis	No	15 (31.91%)	32 (68.09%)	47	0.0041	45 (95.74%)	2 (4.26%)	47	<0.0001
	Yes	37 (59.68%)	25 (40.32%)	62	**	40 (64.52%)	22 (35.48%)	62	**
Outcome	Better	36 (42.35%)	49 (57.65%)	85	0.0352	—			
	Worse	16 (66.67%)	8 (33.33%)	24	**				
Total		52	57	109		85	24	109	

*Chi-square Test. **p < 0.05

Table 2: Distribution of 78 clear cell RCC patients according to cyclin D1 expression and outcome

Variables	Categories	Cyclin D1		Total	p*	Outcome		Total	p*
		Low	High			Better	Worse		
Sex	F	8 (30.77%)	18 (69.23%)	26	0.7341	23 (88.46%)	3 (11.54%)	26	0.0437**
	M	18 (34.62%)	34 (65.38%)	52		35 (67.31%)	17 (32.69%)	52	
Age	< 50	4 (25%)	12 (75%)	16	0.1876	12 (75%)	4 (25%)	16	0.3666
	50-69	19 (41.3%)	27 (58.7%)	46		32 (69.57%)	14 (30.43%)	46	
	≥ 70	3 (18.75%)	13 (81.25%)	16		14 (87.5%)	2 (12.5%)	16	
Clinical presentation	Asymptomatic	3 (11.11%)	24 (88.89%)	27	0.0025**	26 (96.3%)	1 (3.7%)	27	0.0012**
	Symptomatic	23 (45.1%)	28 (54.9%)	51		32 (62.75%)	19 (37.25%)	51	
Tumor size	≤ 4.0 cm	2 (9.52%)	19 (90.48%)	21	0.0068**	21 (100%)	0	21	0.0016**
	> 4.0 cm	24 (42.11%)	33 (57.89%)	57		37 (64.91%)	20 (35.09%)	57	
Stage group	Low (I, II)	13 (26.53%)	36 (73.47%)	49	0.0976	46 (93.88%)	3 (6.12%)	49	<0.0001**
	High (III, IV)	13 (44.83%)	16 (55.17%)	29		12 (41.38%)	17 (58.62%)	29	
Fuhrman	Low (1, 2)	8 (16.67%)	40 (83.33%)	48	<0.0001**	44 (91.67%)	4 (8.33%)	48	<0.0001**
	High (3, 4)	18 (60%)	12 (40%)	30		14 (46.67%)	16 (53.33%)	30	
Sarcomatoid differentiation	No	21 (30%)	49 (70%)	70	0.0647	56 (80%)	14 (20%)	70	0.0007**
	Yes	5 (62.5%)	3 (37.5%)	8		2 (25%)	6 (75%)	8	
Necrosis	No	5 (14.71%)	29 (85.29%)	34	0.0022**	32 (94.12%)	2 (5.88%)	34	0.0004**
	Yes	21 (47.73%)	23 (52.27%)	44		26 (59.09%)	18 (40.91%)	44	
Outcome	Better	14 (24.14%)	44 (75.86%)	58	0.0033**	—			
	Worse	12 (60%)	8 (40%)	20					
Total		26	52	78		58	20	78	

*Chi-square Test. **p < 0.05

Table 3: Association between cyclin D1 expression and worse clinical outcome as described by Odds Ratios (ORs) for multinomial logistic regression models: sequential adjustment for the variables in each model

Variables	RCC				Clear cell RCC			
	Model 1 (adjusted)		Model 2 (adjusted)		Model 1 (adjusted)		Model 2 (adjusted)	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Sex (M x F)	3.73 (0.54-26.04)	0.18	3.68 (0.52-26.30)	0.19	3.06 (0.44-21.07)	0.26	3.06 (0.44-21.44)	0.26
Type of RCC (clear cell x non clear cell)	2.76 (0.29-26.80)	0.38	3.52 (0.34-36.04)	0.29	—		—	
Necrosis (yes x no)	1.70 (0.18-16.03)	0.64	1.54 (0.16-14.89)	0.71	1.80 (0.21-15.59)	0.59	1.66 (0.19-14.70)	0.65
Clinical presentation (symptomatic x asymptomatic)	17.24 (0.54-552.64)	0.11	16.41 (0.45-594.28)	0.13	14.62 (0.46-467.75)	0.13	12.96 (0.36-468.57)	0.16
Sarcomatoid differentiation (yes x no)	18.52 (1.57-218.42)	0.02 *	15.26 (1.30-178.98)	0.03 *	15.59 (0.96-252.94)	0.05	12.77 (0.81-202.13)	0.07
Fuhrman (high x low)	2.45 (0.36-16.68)	0.36	2.05 (0.29-14.31)	0.47	2.32 (0.35-15.32)	0.38	1.95 (0.29-13.30)	0.49
Stage group (high x low)	17.74 (3.08-102.09)	<0.01 *	19.00 (3.20-112.90)	<0.01 *	10.93 (1.87-63.77)	0.01 *	11.71 (1.95-70.39)	0.01 *
Cyclin D1 (low x high)	—		2.31 (0.44-12.20)	0.32	—		2.10 (0.42-10.45)	0.36

Model 1: Multiple logistic regression without cyclin D1. Model 2: Multiple logistic regression with the addition of cyclin D1. CI = Confidence Interval. *p < 0.05

Figure 1: Immunohistochemical expression of cyclin D1 in (A) normal kidney tissue: 1 (absence of positive cells); (B) clear cell RCC, Fuhrman 1: 4 (> 60% positive cells); (C) clear cell RCC, Fuhrman 3: 2 (up to 30% positive cells); (D) unclassified RCC, Fuhrman 4: 2 (up to 30% positive cells); (E) type 1 papillary RCC, Fuhrman 1: 2 (up to 30% positive cells). The strong stained larger cells are macrophages; (F) chromophobe RCC, Fuhrman 1: 2 (up to 30% positive cells). Note a weaker staining for both papillary and chromophobe RCC.

Figure 2: Difference of cyclin D1 expression among RCC sample types

Figure 3: Kaplan-Meier survival curves for patients with RCC (A) and for patients with clear cell RCC (B). The end-point for survival probability is defined by occurrence of metastasis and/or death by RCC (p value from log-rank test).

Figure 4: Difference of tumor average according to the expression of cyclin D1 for RCC (A) and for clear cell RCC (B) (p value from Student's t test).

Figure 5: ROC Curves comparison between models 1 (without cyclin D1) and 2 (with the addition of cyclin D1) for RCC (A) and for clear cell RCC (B). AUC = Area Under the Curve

ANEXO F – Artigo publicado (World Journal of Surgical Oncology – WJSO)

Aceito em 18/01/2013; Publicado em: 02/02/2013

**THE IMAGING AND PATHOLOGICAL FEATURES OF A MUCINOUS TUBULAR
AND SPINDLE CELL CARCINOMA OF THE KIDNEY: A CASE REPORT**

AUTHORS:

Marcela Sampaio Lima¹ (marcelasampaio@yahoo.com.br)

Gyl Eanes Barros-Silva¹ (gyleanes@ig.com.br)

Renan Augusto Pereira¹ (re.augusto.pereira@hotmail.com)

Roberto Cuan Ravinal¹ (rcrav39@yahoo.com)

Silvio Tucci Junior² (stuccijr@yahoo.com.br)

Roberto Silva Costa¹ (rscosta@fmrp.usp.br)

Valdair Francisco Muglia³ (fmuglia@fmrp.usp.br)

Affiliations: 1- Department of Pathology – Faculdade de Medicina Ribeiro Preto – University of Sao Paulo (USP) - Ribeirao Preto – Brazil.

2- Department of Surgery – Urology Division -Faculdade de Medicina Ribeiro Preto – University of Sao Paulo (USP) - Ribeirao Preto – Brazil.

3- Department of Internal Medicine – Imaging Division – Faculdade de Medicina Ribeiro Preto – University of Sao Paulo (USP) - Ribeirao Preto – Brazil.

Running Head: MUCINOUS TUBULAR AND SPINDLE CELL CARCINOMA

Corresponding Author:

Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva - Department of Pathology – Ribeirao Preto School of Medicine – University of Sao Paulo (USP) –

Av Bandeirantes 3900 - Ribeirao Preto – State of Sao Paulo - Brazil. 14110-000

Phone: 55 16 36023244 Fax: 55 16 36024551

Abstract:

A mucinous tubular and spindle cell carcinoma (MTSCC) is a rare and recently described kidney neoplasm with distal nephron differentiation. It can affect patients of all ages and is more prevalent among women. In this case report, we present a 50-year-old woman who had a renal mass, which was accidentally discovered during an investigation for chronic anemia. The final diagnosis of MTSCC was made after the lesion was removed and a pathology work-up was performed. The clinical, pathological and imaging findings of this rare neoplasm are described in this report.

Keywords: Kidney neoplasm, Mucinous tubular and spindle cell carcinoma, Renal cancer.

Background

Mucinous tubular and spindle cell carcinoma (MTSCC) of the kidney is a rare renal cancer, first described in 1998 [1]. It was previously designated under the category of unclassified renal cell carcinoma (RCC) [2] in the World Health Organization (WHO) classification of renal neoplasms. In 2004, it was incorporated as a new entity: a variant of RCC [3,4].

The tumor is considered to be a low-grade carcinoma with a favorable prognosis. Its origin has been debated and some pathologists believe that it is derived from the epithelial cells of the loop of Henle, whereas others have credited its origin to the cells of the collecting duct [3].

There are few reports of MTSCC in medical literature and only two focus on the imaging features of the tumor [5,6]. The objective of this report is to describe the clinical, pathological and imaging findings of a case of renal MTSCC diagnosed at our institution.

Case presentation

A 50-year-old Caucasian woman was referred for ultrasound (US) examination during the course of an investigation for hypochromic/microcytic anemia, which was refractory to treatment for 4 years. The patient had no urinary complaints, hypertension or diabetes and had no history of smoking. The pre-operative serum creatinine and hemoglobin levels were 0.8 mg/dl and 9.1 g/dl (hematocrit 30%), respectively.

Abdominal ultrasonography revealed a round, solid, circumscribed mass, located in the upper pole of the left kidney. The mass was predominantly hypoechoic with echogenic areas in the central portion of the lesion (Figure 1A) and measured 9.5 x 9.0 x 8.0 cm. In view of the uncertain diagnosis, magnetic resonance (MR) was requested. The MR scan confirmed the presence of a circumscribed lesion in the left kidney, with a homogeneous low signal on T1-weighted imaging and an intermediate to high signal on T2-weighted imaging. After intravenous (IV) injection of the contrast medium, there was a diffuse enhancement and most of the lesion was hypovascular compared to the adjacent cortex. On T1-weighted imaging, pre- and postcontrast, a central scar could be defined. There were no signs of vascular, adrenal or perinephric fat invasion. Based on MR findings, a less aggressive and less common histologic variant of RCC, such as chromophobe or papillary lesion, was suspected (Figures 1B, C and D).

The patient underwent a left-sided total nephrectomy and adrenalectomy. The macroscopic examination revealed a single, solid, circumscribed mass, which was primarily white but with yellowish and hemorrhagic areas, and a visible central scar. The longest axis measured about 10.5 cm (Figure 1E).

Histology demonstrated a partially encapsulated tumor composed of tubular and cord arrangements embedded in pale mucinous stroma. The cells were small, cuboidal, with eosinophilic or sometimes vacuolated cytoplasm, and low-grade nuclear features. There were areas with many spindle cells and few mucins. Additionally, foci of epithelioid areas with closely packed round cells without mucin interposed were identified. The central scar showed fibrous connective tissue with lymphoplasmacytic infiltrate. There was no necrosis, vascular or capsular invasion and a sarcomatous component was not defined in the tumor (Figure 1F). No nodal involvement was detected. The Fuhrman nuclear grade was 1 and final pathological staging was pT2b pN0.

Immunohistochemical analysis demonstrated positivity in the epithelioid and spindle cell areas for cytokeratin (CK) AE1/AE3, 7, 19 and vimentin, and was negative for CD10 and CD15. The immunostaining for epithelial membrane antigen (EMA) was focally positive. Immunostaining for neuron-specific enolase (NSE), chromogranin, synaptophysin, sarcomeric actin and desmin did not show neuroendocrine or muscle differentiation (Table 1).

The patient was followed up for 24 months, with no evidence of local or systemic recurrence, and recovered from anemia.

Discussion

MTSCC is a rare kidney neoplasm which predominantly presents in adult women (4:1). The age at presentation varies from 17 to 82 years (mean 53 years) [4,7]. The majority of these tumors are accidentally discovered during abdominal imaging studies [3] due to other indications. Occasionally, when lesions are large, they may present with flank pain or hematuria, causing anemia, as in this case [4]. An association with nephrolithiasis has been described by some authors [8] and was also seen in this case. Complete surgical excision appears to be an adequate treatment and only a few cases have demonstrated recurrence, regional adenopathy or distant metastases, mainly in patients with MTSCC exhibiting components with true sarcomatoid changes [3,6,8-10].

The size of MTSCC is variable. It ranges from less than 1.0 cm in diameter to more than 18.0 cm, with most tumors measuring 2.0 to 4.0 cm in the longest axis [9]. The histological features of the neoplasm are characterized by elongated tubules and cord arrangements, which are separated by variable amounts of mucinous stroma. The parallel tubular arrays often have a spindle cell configuration, sometimes resembling a mesenchymal neoplasm. Cells are small with a cuboid or oval shape and exhibit low-grade nuclear characteristics. Areas of necrosis, solid tubular growth, foam cell deposits and chronic inflammation may be seen in the tumor [4,9].

In the absence of typical morphologic features, a nonclassic MTSCC pattern may be characterized by areas of papillary changes, neuroendocrine differentiation and sarcomatoid changes in the lesion. Immunohistochemistry may be valuable in limiting the potential differential diagnoses, as in this case. MTSCC is generally positive for low molecular weight cytokeratins (CK7, CK19). The epithelial membrane antigen is usually present and vimentin is occasionally detected [4].

Imaging descriptions of MTSCCs are very rare. In Table 2, we present the published MR imaging studies of MTSCCs, including our case. The combination of signal intensity on T1- and T2-weighted imaging with the pattern of enhancement described here is unlikely for the most common variant of RCC, clear cell carcinoma. These tumors usually have areas of high signal on T1-weighted imaging, due to necrosis and hemorrhage, and exhibit a classic hypervascularization after an IV injection of the contrast medium. However, papillary tumors may show a discrete low signal on T2-weighted imaging and a hypovascular pattern after IV contrast medium. The sonographic appearances of these lesions are non-specific.

Conclusion

In conclusion, there are still no specific imaging criteria for the diagnosis of MTSCC, which can only be confirmed by tissue sampling. The imaging features may resemble other variants of RCC, such as chromophobe or papillary types, which have a less favorable prognosis. However, a renal MTSCC should be suspected when a large, circumscribed, poorly enhancing lesion with low to intermediate signal on T2-weighted imaging is discovered, especially if in association with renal lithiasis [3,4].

Consent

Written informed consent was obtained from the patient for publication of this case report and accompanying images. A copy of the written consent is available for review by the Editor-in-Chief of this journal.

Abbreviations

CK: cytokeratin; EMA: epithelial membrane antigen; IV: intravenous; MR: magnetic resonance; MTSCC: mucinous and tubular spindle cell carcinoma; NSE: neuron-specific enolase; RCC: renal cell carcinoma; US: Ultrasound; WHO: World Health Organization.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

GEBS and VFM act as guarantors of integrity of the entire study. GEBS, RSC and VFM provided study concepts and design. MSL, GEBS, VFM and RCR provided literature research. MSL, RAP and ST performed the clinical studies. MSL, RAP, RSC and RCR prepared the manuscript. GEBS and VFM edited the manuscript. ST provided photographic documentation. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to Larissa VF Landgraf, a medical resident at the Department of Pathology, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, for performing the gross examination of the case.

References:

1. He Q, Ohaki Y, Mori O, Asano G, Tuboi N: **A case report of renal cell tumor in a 45-year-old female mimicking lower portion nephrogenesis.** *Pathol Int* 1998, **48**:416-420.
2. Eble JN: **Mucinous tubular and spindle cell carcinoma and post-neuroblastoma carcinoma: newly recognized entities in the renal cell carcinoma family.** *Pathology* 2003, **35**:499-504.
3. Yang G, Breyer BN, Weiss D, MacLennan, G: **Mucinous Tubular and Spindle Cell Carcinoma of the Kidney.** *J Urol* 2010, **183**:738-739.
4. Srigley JR: **Mucinous tubular and spindle cell carcinoma.** In *Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. World Health Organization Classification of Tumours.* Edited by Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. Lyon, France: IARC Press; 2004:40.
5. Noon AP, Smith DJ, McAndrew P: **Magnetic resonance imaging characterization of a mucinous tubular and spindle cell carcinoma of the kidney detected incidentally during an ectopic pregnancy.** *Urology* 2010, **75**(Suppl 2):247-248.
6. Makni SK, Chaari C, Ellouze S, Ayadi L, Charfi S, Abbes K, Slimen MH, Mhiri MN, Boudaoura TS: **Mucinous tubular and spindle cell carcinoma of the kidney associated with tuberculosis.** *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2011, **22**:335-338.
7. Parwani AV, Husain AN, Epstein JI, Beckwith JB, Argani P: **Low-grade myxoid renal epithelial neoplasms with distal nephron differentiation.** *Hum Pathol* 2001, **32**:506-512.
8. Hes O, Hora M, Perez-Montiel DM, Suster S, Curík R, Sokol L, Ondic O, Mikulástík J, Betlach J, Peychl L, Hrabal P, Kodet R, Straka L, Ferák I, Vrabec V, Michal M: **Spindle and cuboidal renal cell carcinoma, a tumour having frequente association with nephrolithiasis: report of 11 cases including a case with hybrid conventional renal cell carcinoma/spindle and cuboidal renal cell carcinoma components.** *Histopathology* 2002, **41**:549-555.
9. Srigley JR, Delahunt B: **Uncommon and recently described renal carcinomas.** *Mod Pathol* 2009, **22**: S2-S23.

10. Simon RA, di Sant'Agnes PA, Palapattu GS, Singer EA, Candelario, GD, Huang J, Yao JL: **Mucinous tubular and spindle cell carcinoma of the kidney with sarcomatoid differentiation.** *Int J Clin Exp Pathol* 2008, **1**:180-184.

Tables

Table 1: Immunohistochemical panel for MTSCC

Antibodies	Results
AE1/AE3	Positive, diffuse
EMA	Positive, focal
CK7	Positive, diffuse
CK19	Positive, diffuse
Vimentin	Positive, diffuse
CD10, CD15, NSE, synaptophysin, chromogranin, desmin, sarcomeric actin	Negative

CK, cytokeratin; EMA, epithelial membrane antigen; MTSCC, mucinous tubular and spindle cell carcinoma; NSE, neuron-specific enolase.

Table 2: Imaging findings of MTSCC described in literature

	Signal on T2-weighted imaging	Morphology	Pattern of enhancement
Noon <i>et al.</i> 2010 [5]	Intermediate to high, homogeneous	Circumscribed 7.0 cm	Diffuse, hypovascular
Makni <i>et al.</i> 2011 [6]	High, heterogeneous	Circumscribed 18.0 cm	Centripetal enhancement and a central scar
Blinded, 2013	Intermediate to high, homogeneous	Circumscribed 9.5 cm	Diffuse, hypovascular and a central scar

Figures

Figure 1: Imaging findings. (A) Ultrasound image showing a heterogeneous mass (*) in the upper pole of the left kidney (LK). (B) Axial T1-weighted and (C) coronal T2-weighted imaging demonstrating a mass in the left kidney (*), with homogeneous low T1 and a high signal in T2. A central scar (arrow) is seen on axial T1. (D) Axial T1, postcontrast, showing a hypovascular lesion compared to renal cortex (white arrow) with a central scar (*). (E) Gross findings: well-circumscribed tumor with a central scar (arrow). (F) Elongated tubules and cord arrangements (arrows) embedded in a mucinous stroma (*).

LK, left kidney