MARCELO ZERATI

**Estudo de fatores prognósticos moleculares
no carcinoma renal de células claras pela
técnica de *tissue microarray***

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Programa de: Urologia

Orientador: Prof. Dr. Marcos Francisco
Dall'Oglio

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kátia Ramos
Moreira Leite

São Paulo

2011

MARCELO ZERATI

**Estudo de fatores prognósticos moleculares
no carcinoma renal de células claras pela
técnica de *tissue microarray***

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Programa de: Urologia

Orientador: Prof. Dr. Marcos Francisco
Dall'Oglio

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kátia Ramos
Moreira Leite

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Zerati, Marcelo

Estudo de fatores prognósticos moleculares no carcinoma renal de células claras
pela técnica de *tissue microarray* / Marcelo Zerati.-- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Programa de Urologia.

Orientador: Marcos Francisco Dall'Oglio.

Co-orientadora: Kátia Ramos Moreira Leite.

Descritores: 1.Carcinoma de células renais 2.Prognóstico 3.Análise em
microséries 4.Imunoistoquímica 5.Análise digital

USP/FM/DBD-006/11

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Sami e Ivete,
Pelo resplandecente exemplo de vida.

Aos meus filhos, Patrícia, Letícia e Gustavo,
Cada um ao seu modo, vocês me instigam, me estimulam, me ensinam.
Minha vida é melhor com vocês nela.

Ao meu irmão, Renato,
Companheiro de todas as horas, grande irmão, grande amigo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Dr. Humberto de Campos Franco Moraes

Meu grande amigo e fiel companheiro de jornada.

Tantas vezes meu norte, outras tantas meu esteio; sem teu apoio irrestrito
não teria ousado sonhar este momento.

Portanto, reparto-o contigo.

“A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você”.

Ralph Waldo Emerson (1803 – 1882)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcos Francisco Dall'Oglio, pela orientação segura, atenciosa, presente. Acreditaste nas minhas virtudes, relevaste minhas deficiências. A amizade genuína que me ofereceste, é o que levo comigo.

“O homem superior é modesto em seu discurso, mas excede em suas ações”.

Confúcio (551 – 479 AC)

À Prof^a. Dr^a. Kátia Ramos Moreira Leite, orientadora ímpar, por sua infinita paciência e dedicação à minha formação. Pelo seu exemplo, consegui olhar ao microscópio e ver mais longe.

“Ser líder é com ser uma dama. Se você precisa dizer às pessoas que é, então você não é”.

Margareth Thatcher (1925)

Ao Professor Miguel Srougi, mestre dos melhores, que me acolheu em seu Serviço, e me proporcionou a experiência de uma vida. Minha admiração para consigo, já de longa data, só faz crescer.

“O maior bem que podemos fazer aos outros não é oferecer-lhes nossa riqueza, mas levá-los a descobrir a deles.”

Émile Louis V. Laveleye (1822 – 1892)

Ao Prof. Dr. Homero Bruschini, chefe da Pós Graduação, que com competência e afinco exemplares colocou esta Pós Graduação no seu devido lugar: a melhor do país. É meu grande privilégio fazer parte deste momento.

“Você vê coisas e diz, ‘Por quê?’ Mas eu sonho coisas que nunca existiram e eu digo ‘Porque não?’”

George Bernard Shaw (1856 – 1950)

Ao Dr. José Pontes Júnior, amigo das melhores e piores horas, sua presença foi uma constante desde meu início nesta Pós Graduação, e foi meu porto seguro para dirimir as dúvidas que permearam este projeto.

À pesquisadora Sabrina Reis, meus olhos e ouvidos em São Paulo, pelo inestimável auxílio no cotidiano e nas tarefas burocráticas que este projeto exigiu.

Ao Dr. César da Câmara Segre, por partilhar comigo parte dos dados clínicos da sua tese.

Ao Dr. José Cury, amigo de longa data, pela presença constante e fraterna.

Ao Dr. Luiz Carlos Neves de Oliveira e Dr. Alexandre Crippa Sant'Anna por me estenderem sua amizade, e por seu interesse constante no meu progresso.

Ao Dr. Luiz H. Camara-Lopes, chefe do Laboratório de Patologia Cirúrgica e Molecular do Hospital Sírio Libanês, que colocou à minha disposição a estrutura do seu Laboratório. E por me ensinar as filigranas da biópsia de congelação.

Ao Dr. Ricardo Antenor de Souza e Souza, pelo seu grande empenho em recuperar lâminas e blocos de parafina dos pacientes conduzidos no Hospital Beneficência Portuguesa.

Aos Funcionários do Laboratório de Patologia Cirúrgica e Molecular do Hospital Sírio Libanês, que me acolheram com grande carinho. Em especial, a Márcia pelo auxílio administrativo, ao Laisaque e Daniel pela coleta dos blocos de parafina, e ao Isaque, pelo primor nas colorações imunoistoquímicas.

Ao Dr. Iberê Soares e aos funcionários do LIM-14, pelo esmero na construção do tissue microarray.

Ao amigo patologista Dr. Mateus C. Siqueira por seu grande envolvimento na etapa de digitalização das imagens, ao me colocar em contato com o Laboratório de Patologia Cirúrgica da Universidade Federal de Uberlândia, a quem agradeço na pessoa do Dr. Arnaldo Moreira da Silva e Dra Tânia Machado de Carvalho, a cessão do sistema de captura de imagens utilizado nesta Tese.

Ao Dr. Edison Daniel Schneider Monteiro, que gentilmente me ensinou a técnica de leitura digital com Photoshop.

A Carmen e Sammi Naufel, e em especial a Artur Queiroz, pela consultoria permanente em Photoshop.

A Valdecir Marvulle, pela precisão dos cálculos estatísticos.

A Rita de Cássia Ortega Borges, incansável no levantamento bibliográfico; e também pelo perfeccionismo na revisão final e diagramação do manuscrito.

Aos membros da Banca de Qualificação, Dr. Ricardo Duarte Jordão, Dr. Cristiano Mendes Gomes, e Dra. Maria Del Pilar Estevez Diz, pelo empenho em corrigir as deficiências desta Tese.

Aos colegas da Pós Graduação pelo excelente convívio. Em especial ao Dr. Marcus Vinicius Queiróz, Dr. Jose Everton de Castro Filho, Dr. Celso Heitor de Freitas, Dr. Alcides Mosconi, Dr. Cipriano Formiga, Dra. Karine Piñera, Sabrina Reis, Camila Marin e Luciana Timoszczuk pelo ambiente de amizade e troca de informações.

A Elisa de Arruda Cruz, secretária da Pós Graduação, pelo inestimável auxílio nas tarefas burocráticas.

À equipe do LIM-55 pelo auxílio constante e por terem me acolhido como parte do seu time. Vocês transformaram este Laboratório em algo real.

A todos os colaboradores da Divisão de Clínica Urológica, aqui representados pela Iones e Beth, pelo carinho e atenção a mim dispensados.

Aos que me formaram médico, os professores da Pontifícia Universidade de São Paulo, aqui representados na pessoa do Dr. Saul Gun.

Aos que me formaram cirurgião, no Hospital Beneficência Portuguesa de São José do Rio Preto: Dr. Dante Nascimbeni, Dr. José Agostinho Vicentini, Dr. Roberto Kaiser (*in memoriam*), Dr. João Otávio Pirozzi, Dr. Aldemir Bilachi e Dr. Emílio Juste Jr.

Aos que me formaram urologista, no Instituto de Urologia e Nefrologia de São José do Rio Preto: Dr. Sami Zerati, Dr. Rubens Carlos Martucci, Dr. Eliseu Roberto Melo Denadai, Dr. Carlos Benedito Menezes Verona, Dr. Miguel Zerati-Filho, Dr. Cleverson Luiz Rocha D'Avila. E aos nefrologistas: Dr. Athanase Georges Bezas, Dr. João Batista Barberato, Dr. Horácio José Ramalho, Dr. Mario Abbud Filho, Dra. Maria Cristina Sentine Salgueiro e Dr. Wilson Makoto Yamazaki. Ainda, pessoas importantes na minha formação: Dra. Lígia Beatriz Cherubini de Lima, Dra. Sueli Suzigan, Dr. Tufik Bauab Jr., Dr. Antonio Soares de Souza.

Ao Dr. Marcus Vinicius Pádua Netto e Francisco Cyro R. C. Prado Filho, pela oportunidade a mim oferecida na Faculdade de Medicina de Araguari, e por seu grande apoio desde as primeiras horas deste projeto.

Aos colegas, Dr. Glycério Assis Pereira Neto e Dr. Marcelo Takeo Rufato Okano, que vieram caminhar conosco na construção de um serviço de referência. Trouxeram para nossa casa o talento e a inquietude dos jovens. E no cotidiano, tornaram a minha ausência imperceptível.

Às minhas secretárias, Lenice, Janaína, Adelma, Ângela, Luciane, Rosane, Midore, por manter minha vida organizada e cuidar de todos os detalhes necessários ao bom andamento da minha rotina nos inúmeros deslocamentos a São Paulo.

Aos meus amigos, muitos para citar; por vezes distantes, mas não esquecidos, pois são, simplesmente, amigos.

A Lourdes Rosa Filha, por sua amizade, paciência, respeito e cumplicidade. Sua companhia serena me trouxe de volta a alegria do convívio. Sou mais feliz contigo ao meu lado.

A minha família, meus pais e meu irmão, cuja convicção do meu sucesso é própria daqueles que não nos veem os defeitos. Em especial aos pequenos Letícia e Gustavo, que são a razão de tudo o que me motiva. Sua força me educa, e diariamente vocês me mostram do que são capazes.

A Deus, que zela por mim todos os dias, mas o fez com especial atenção durante os anos deste projeto.

AGRADECIMENTO INSTITUCIONAL

Agradeço o apoio financeiro da FAPESP

Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo

sem o qual a realização desta Tese não seria possível

Protocolo: 2008/52908-8

EPÍGRAFE

“Num mundo de fugitivos, aqueles que tomam uma direção diferente
dão a impressão de estar debandando.”

T. S. Eliot (1888 – 1965)

NORMATIZAÇÃO

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento da publicação:

Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, Norma Ortográfica 2009.

Guia de Apresentação de Dissertações, Teses e Monografias; 2ª Edição, São Paulo; 2005. Autores: Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.

Referências: Adaptado do *International Committee of Medical Journals Editors* (Grupo de Vancouver).

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

<i>Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....</i>	<i>i</i>
<i>Lista de Figuras</i>	<i>iv</i>
<i>Lista de Gráficos</i>	<i>v</i>
<i>Lista de Tabelas.....</i>	<i>vi</i>
<i>Resumo</i>	<i>vii</i>
<i>Summary</i>	<i>viii</i>
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Carcinoma Renal.....</i>	3
1.1.1 <i>Epidemiologia.....</i>	6
1.1.2 <i>Fatores Prognósticos</i>	10
1.1.3 <i>Carcinoma Renal do Tipo Células Claras</i>	19
1.2 <i>Hipóxia e os Tumores.....</i>	21
1.2.1 <i>A Via Induzível pela Hipóxia.....</i>	23
1.3 <i>mTOR e os Tumores</i>	26
1.4 <i>Proliferação Celular e os Tumores</i>	29
1.5 <i>p53 e os Tumores.....</i>	31
1.6 <i>Tissue Microarray.....</i>	33
2 OBJETIVOS	36
2.1 <i>Objetivo Primário</i>	37
2.2 <i>Objetivo Secundário</i>	37
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	38
3.1 <i>Casuística.....</i>	39
3.2 <i>Tissue Microarray.....</i>	43
3.3 <i>Imunoistoquímica</i>	44
3.4 <i>Captura Digital e Armazenamento das Imagens</i>	45

3.5	<i>Quantificação Digital da Imunoexpressão</i>	46
3.5.1	Expressão Citoplasmática e de Membrana	49
3.5.2	Expressão Nuclear	53
3.6	<i>Análise Estatística</i>	58
4	RESULTADOS	59
4.1	CA-IX	60
4.2	EGF-R	63
4.3	Ki-67	66
4.4	p53	69
4.5	PTEN	72
4.6	VEGF	75
4.7	VEGF-R	78
5	DISCUSSÃO	82
6	CONCLUSÕES	102
7	ANEXOS	104
7.1	<i>Anexo A: Parecer da CAPPesq</i>	105
7.2	<i>Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</i>	106
8	REFERÊNCIAS	110
9	APÊNDICES	129

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

=	Igual
>	Maior
<	Menor
°C	Graus centígrados
µm	Micrômetro
4E-BP1	Proteína tipo um de ligação ao fator quatro-E de iniciação da translação eucariótica
AJCC	“American Joint Committee on Cancer”
BHD	Birt Hogg Dubbé
CA-IX	Anidrase carbônica tipo nove
CAPPesq	Comissão de Ética em Pesquisa do HCFMUSP
CA-XII	Anidrase carbônica tipo doze
CR	Carcinoma renal
CRCC	Carcinoma renal de células claras
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ECOG	“Eastern Cooperative Oncology Group”
EGF-R	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EpCAM	Molécula de adesão de células epiteliais
FH	Fumarato-hidratase
FKBP12	Proteína de ligação do FK506, tipo doze
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina-eosina

Her2/neu	Receptor tipo dois do fator de crescimento epidérmico humano
HIF-1	Fator induzível pela hipóxia tipo um
HIF-1 α	Fator induzível pela hipóxia tipo um alfa
HIF-1 β	Fator induzível pela hipóxia tipo um beta
IHQ	Imunoistoquímica
KPS	Estado de performance de Karnofsky
Met	Receptor do fator de crescimento do hepatócito
MIB-1	O mesmo que Ki-67
mM	Milimol
MMAC1	O mesmo que PTEN
MSKCC	“Memorial Sloan Kettering Cancer Center”
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
p53	Antígeno tumoral celular p53
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Logaritmo decimal negativo da concentração de hidrogênio em uma solução
PI3K	Fosfatidilinositol três-quinase
PS	Estado de performance
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina no cromossomo dez
RGB	Vermelho, verde e azul
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
S6K1	Proteína S-seis quinase ribossomal beta-um
TEP1	Componente um da proteína telomerase

TGF α	Fator transformador de crescimento alfa
TIFF	Formato de arquivo de imagem etiquetado
TMA	Microarranjo tecidual, do Inglês: tissue microarray
TNM	Tumor, Nódulo, Metástase
TOR	Alvo da rapamicina
UICC	“Union Internationale Contre le Cancer”
UISS	“UCLA Integrated Staging System”
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGF-R	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular
VHL	von Hippel-Lindau

Lista de Figuras

FIGURA 1: A VIA INDUZÍVEL PELA HIPÓXIA.....	25
FIGURA 2: A VIA DO MTOR.	28
FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MONTAGEM DO TMA.	34
FIGURA 4: ETAPAS DA CONFECÇÃO DO TMA.	35
FIGURA 5: HISTOSPOT.	47
FIGURA 6: DEMARCADOR DE 150.000 PIXELS SOBRE A ÁREA DE INTERESSE.	48
FIGURA 7: PRESERVAÇÃO DA ÁREA DE INTERESSE E REMOÇÃO DA IMAGEM ADJACENTE.	49
FIGURA 8: AMPLIAÇÃO E SELEÇÃO DA COLORAÇÃO CORRESPONDENTE À IMUNOEXPRESSÃO.....	51
FIGURA 9: DETALHE DA COLORAÇÃO ACASTANHADA ESCOLHIDA.....	52
FIGURA 10: REMOÇÃO DIGITAL DAS COLORAÇÕES DE NÃO-INTERESSE E CONTAGEM FINAL DE PIXELS DA COLORAÇÃO DE INTERESSE.....	53
FIGURA 11: DUPLICAÇÃO DA REGIÃO DE INTERESSE PARA CONTAGEM NUCLEAR.	54
FIGURA 12: AMPLIAÇÃO DA IMAGEM E CONTAGEM DO NÚMERO TOTAL DE NÚCLEOS..	55
FIGURA 13: AMPLIAÇÃO DA IMAGEM E CONTAGEM DOS NÚCLEOS POSITIVOS.	56
FIGURA 14: RESULTADO FINAL DA CONTAGEM DE NÚCLEOS.	57

Lista de Gráficos

GRÁFICO 1: TAXAS DE SOBREVIVÊNCIA PELO ESTADIAMENTO TNM 2010.	13
GRÁFICO 2: SOBREVIVÊNCIA GLOBAL PELA EXPRESSÃO DA CA-IX.	61
GRÁFICO 3: SOBREVIVÊNCIA GLOBAL PELA EXPRESSÃO DO EGF-R.	64
GRÁFICO 4: SOBREVIVÊNCIA GLOBAL PELA EXPRESSÃO DO KI-67.....	67
GRÁFICO 5: SOBREVIVÊNCIA GLOBAL PELA EXPRESSÃO DO P53.	70
GRÁFICO 6: SOBREVIVÊNCIA GLOBAL PELA EXPRESSÃO DO PTEN.....	73
GRÁFICO 7: SOBREVIVÊNCIA GLOBAL PELA EXPRESSÃO DO VEGF.....	76
GRÁFICO 8: SOBREVIVÊNCIA GLOBAL PELA EXPRESSÃO DO VEGF-R.....	79

Lista de Tabelas

TABELA 1: PRINCIPAIS TIPOS HISTOLÓGICOS DE CÂNCER RENAL, SUA INCIDÊNCIA E GENES ENVOLVIDOS.....	5
TABELA 2: FATORES DE RISCO PARA CARCINOMA RENAL.	9
TABELA 3: ESTADIAMENTO TNM PARA CÂNCER RENAL.	12
TABELA 4: HIPÓXIA - TIPOS, DEFINIÇÕES E PRINCIPAIS CAUSAS.	22
TABELA 5: TABELA DE BASE DA CASUÍSTICA: CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES E TUMORES.	41
TABELA 6: PERDA AMOSTRAL DO TMA, POR MARCADOR.....	42
TABELA 7: ANTICORPOS EMPREGADOS NO ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO.....	44
TABELA 8: EXPRESSÃO DA CA-IX PELAS DIVERSAS VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	62
TABELA 9: EXPRESSÃO DO EGF-R PELAS DIVERSAS VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	65
TABELA 10: EXPRESSÃO DO Ki-67 PELAS DIVERSAS VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	68
TABELA 11: EXPRESSÃO DO P53 PELAS DIVERSAS VARIÁVEIS DO ESTUDO.	71
TABELA 12: EXPRESSÃO DO PTEN PELAS DIVERSAS VARIÁVEIS DO ESTUDO.	74
TABELA 13: EXPRESSÃO DO VEGF PELAS DIVERSAS VARIÁVEIS DO ESTUDO.	77
TABELA 14: EXPRESSÃO DO VEGF-R PELAS DIVERSAS VARIÁVEIS DO ESTUDO.	80
TABELA 15: TABELA SINÓPTICA DOS RESULTADOS OBSERVADOS.....	81

Resumo

Zerati M. *Estudo de fatores prognósticos moleculares no carcinoma renal de células claras pela técnica de tissue microarray* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 128p.

INTODUÇÃO: O carcinoma renal (CR) é uma doença agressiva, e sua incidência vem aumentando. A variante de células claras (CRCC) é a mais comum e apresenta comportamento biológico mais agressivo. Os recentes avanços no conhecimento da biologia molecular do tumor demonstram que a oncogênese dos diversos tipos histológicos é regida por mecanismos celulares diversos. Os modelos prognósticos atuais vêm procurando incorporar os recentes avanços da biologia molecular, com o intuito de melhorar sua capacidade de predizer a evolução e o desfecho destes pacientes. **OBJETIVOS:** Correlacionar a imunoexpressão dos marcadores selecionados com: 1) sobrevida global e, 2) com parâmetros prognósticos estabelecidos (estadio clínico TNM, tamanho tumoral, grau nuclear de Fuhrman, invasão microvascular e invasão de gordura perirrenal) em portadores de CRCC não metastático. **MÉTODOS:** Neste estudo de coorte retrospectivo, avaliamos 99 pacientes portadores de CRCC não metastático, quanto à expressão imunoistoquímica das seguintes proteínas: CA-IX, EGF-R, Ki-67, p53, PTEN, VEGF e VEGF-R. Os parâmetros analisados foram: Sobrevida global, estadio TNM, tamanho tumoral, grau nuclear de Fuhrman, invasão microvascular e invasão de gordura perirrenal. Utilizamos um *tissue microarray* construído exclusivamente para esta finalidade e realizamos a leitura da imunoexpressão por técnica digital utilizando o software Photoshop®. **RESULTADOS:** O tempo de seguimento médio foi de 7,9 anos. Com relação à sobrevida global, não observamos sua correlação com nenhum dos marcadores avaliados. Quanto à correlação da expressão dos marcadores com os parâmetros prognósticos convencionais, observamos que a expressão do EGF-R se correlacionou com estadio T ($p=0,049$) e invasão da gordura perirrenal ($p=0,020$); e o VEGF-R se correlacionou com grau de Fuhrman ($p=0,022$) e invasão microvascular ($p=0,005$). Nos demais marcadores, não foi observada correlação significativa. **CONCLUSÃO:** Os fatores prognósticos moleculares EGF-R e VEGF-R apresentam-se como ferramentas úteis para avaliação do risco de prognóstico desfavorável em portadores de carcinoma renal de células claras não metastático.

Descritores: Carcinoma de células renais, prognóstico, análise em microsséries, imunoistoquímica, análise digital

Summary

Zerati M. *Study of molecular prognostic factors in clear cell renal cell carcinoma by tissue microarray* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 128p.

INTRODUCTION: Renal cell carcinoma is an aggressive disease and its incidence is rising. The clear cell variant is the most common, and also the most aggressive. Recent advances in the understanding of the tumor's molecular biology indicate that the oncogenesis of each histologic subtype is controlled by distinct cellular mechanisms. Current prognostic models are gradually incorporating the advances in molecular biology, in the hope to improve their predictive capacity. **OBJECTIVES:** To correlate the immunoexpression of selected markers with 1) overall survival, and 2) with established prognostic parameters (clinical TNM stage, tumor size, Fuhrman nuclear grade, microvascular invasion and perirenal fat invasion) in patients with non-metastatic ccRCC. **METHODS:** This is a retrospective cohort study, we evaluated 99 patients with non-metastatic clear cell renal cell carcinoma, as to the expression of the following proteins: CA-IX, EGF-R, Ki-67, p53, PTEN, VEGF e VEGF-R. The analyzed parameters where: overall survival, TNM stage, tumor size, Fuhrman nuclear grade, microvascular invasion, perirenal fat invasion. We utilized a custom built tissue microarray, and the immunoexpression was digitally quantified using the Photoshop® software. **RESULTS:** The mean follow-up time was 7,9 years. We found no correlation between the expression of the studied molecular markers and overall survival. As for the conventional prognostic parameters, we found the expression of EGF-R to correlate with T stage ($p= 0,049$) and perirenal fat invasion ($p= 0,020$), and VEGF-R to correlate with Fuhrman nuclear grade ($p= 0,022$) and microvascular invasion ($p= 0,022$). None of the other markers showed correlation with the studied parameters. **CONCLUSIONS:** The expression of EGF-R and VEGF-R may be useful tools in the prognostic evaluation of unfavorable risk in patients with non metastatic clear cell renal cell carcinoma.

Descriptors: Renal cell carcinoma, prognostic, tissue microarray, immunohistochemistry, digital analysis

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma renal (CR) é uma doença agressiva, considerada a mais letal dentre as neoplasias urológicas.^{1;2}

Nos portadores de doença clinicamente localizada, a cirurgia representa a forma padrão de tratamento, com taxas robustas de cura; entretanto, nos quadros de doença localmente avançada ou metastática, os pacientes enfrentam prognóstico bastante reservado.³

Indivíduos com tumores localizados apresentam expectativa de vida em cinco anos de aproximadamente 95%, enquanto que nos portadores de doença localmente avançada a sobrevida média é de 65% em cinco anos, e dentre aqueles com doença metastática, a sobrevida média em dois anos é de apenas dezoito por cento.³

Existem vários fatores prognósticos em uso para a avaliação dos pacientes, que vem acompanhando a evolução do conhecimento desta patologia, ainda que permaneçam controvérsias quanto à sua utilização.⁴

Atualmente há dois paradigmas fundamentais do câncer renal que estão em franca modificação, impondo novas e instigantes questões no manejo destes pacientes.

Primeiramente, com o avanço dos conhecimentos sobre a genética e a biologia molecular do CR, tornou-se evidente que, o que outrora era considerado como uma patologia única, passou a abranger diversos tumores geneticamente distintos, cada um com características próprias, e, portanto, exigindo condutas terapêuticas individualizadas.⁵⁻⁷

Em segundo lugar, presenciamos o surgimento de uma classe inteiramente nova de medicamentos, os chamados inibidores-alvo moleculares. Estas drogas surgem como uma esperança de tratamento da doença metastática, sabidamente refratária às terapias convencionais. Entretanto, seu uso racional está diretamente relacionado ao melhor conhecimento das vias moleculares envolvidas na oncogênese. O futuro da terapia no CR metastático caminha no sentido da individualização do perfil molecular de cada paciente e da escolha de terapias específicas individuais.⁸⁻¹³

O presente estudo visa contribuir com o conhecimento do papel dos fatores prognósticos moleculares em portadores de carcinoma renal do tipo células claras (CRCC) não metastático.

O racional da escolha dos marcadores procurou agregar diferentes vias biológicas, a saber: 1) a via induzível pela hipóxia¹⁴, e 2) a via do mTOR¹³, pois ambas tem recebido grande atenção pelo seu potencial no prognóstico e na terapia deste tumor, 3) um marcador de proliferação celular¹⁵, e 4) a expressão do gene p53¹⁶, o mais frequentemente mutado em tumores humanos.

1.1 Carcinoma Renal

O reconhecimento do CR como entidade distinta advém do século XIX.

Em 1883, em sua tese intitulada “*Die Sogenannten Lipome der Niere*” (“Os Assim Chamados Lipomas do Rim”) Paul Grawitzⁱ apud Pasche¹⁷ oferecia as primeiras descrições detalhadas da doença, até então considerada uma forma de lipoma. Inicialmente, descreveu as lesões como “*nós do tamanho de uma ervilha, que raramente excediam o diâmetro de uma cereja, mas que em raras ocasiões podem ser tumores arredondados de quatro a cinco centímetros em tamanho (...) as margens do tumor são geralmente bem definidas e confinadas dentro da cápsula renal*”. Ele enfatizava a natureza maligna das lesões pela descrição de “*tumores do tamanho de uma cabeça humana, estendendo-se para dentro da pélvis do paciente*.” e também pela descrição de metástases pulmonares decorrentes do tumor. As detalhadas ilustrações da celularidade tumoral em cordões ou formações papilares embasavam o argumento de que eram de origem epitelial.

Grawitz foi o primeiro autor a apontar a abundante e surpreendente vasculatura do tumor, um achado não visto em lipomas e raramente observado em outros tumores. Por seu trabalho relevante na elucidação desta patologia, até os dias atuais o câncer renal é reconhecido pelo epônimo “*Tumor de Grawitz*”.

Durante muito tempo o CR foi considerado uma doença única. Apenas nos últimos dez a quinze anos, devido ao avanço do conhecimento sobre a genética e a biologia molecular desta doença, ficou evidente que existem

ⁱ Grawitz P. Die Sogenannten Lipome der Niere. Virchows Arch. 1883; 93:39-63.

várias neoplasias diferentes que acometem o rim; cada uma apresentando características histológicas próprias, causadas por mutações genéticas diferentes, apresentando história natural e evoluções clínicas peculiares, e com respostas diferentes às diversas formas de terapia.⁵ A Tabela 1 ilustra a incidência dos principais tipos histológicos e os genes envolvidos.

Tabela 1: Principais tipos histológicos de câncer renal, sua incidência e genes envolvidos.

Tipo Histológico	Incidência	Gene
Células Claras	75%	VHL (von Hippel-Lindau)
Papilífero Tipo 1	5%	Met (Hepatocyte growth factor receptor)
Papilífero Tipo 2	10%	FH (Fumarate hydratase)
Cromóforo	5%	BHD (Birt Hogg Dubbé)
Oncocitoma	5%	BHD (Birt Hogg Dubbé)

Adaptado de Linehan et al.⁵

Apesar das interessantes alterações genéticas envolvendo os diversos tipos histológicos de CR, esta tese aborda apenas tumores da variável tipo células claras (CRCC).

1.1.1 Epidemiologia

O carcinoma renal (CR) representa aproximadamente três por cento de todas as neoplasias. No ano de 2010 foram estimados 58.240 novos casos e 13.040 mortes por CR nos Estados Unidos.¹⁸

Dados europeus indicam que em 2008 a incidência de novos casos de CR naquele continente foi de 88.400 casos, enquanto a mortalidade foi de 39.300 casos.¹⁹

Não dispomos de estatísticas nacionais sobre o CR, entretanto, o Instituto Nacional do Câncer estimou para 2010 a ocorrência global de 489.270 novos casos de câncer.²⁰ Se considerarmos uma projeção de três por cento, baseada nas estatísticas norteamericanas, podemos calcular uma estimativa de 14.678 novos casos de CR no Brasil em 2010. Ainda extrapolando estas mesmas estatísticas, a mortalidade brasileira estimada por CR seria de 3.286 casos em 2010.

A Organização Mundial da Saúde, através do Projeto Globocan, estima que em 2010, a incidência e a mortalidade por CR no Brasil seriam respectivamente 4.418 e 2.465 casos.²¹

A incidência do CR está aumentando dramaticamente nos EUA. Chow et al.²² demonstraram que entre 1975 e 1995 as taxas de incidência ajustadas pela idade para cada 100.000 habitantes/ano foram de 9,6 para homens brancos, 4,4 para mulheres brancas, 11,1 para homens negros e

4,9 para mulheres negras. Neste mesmo período, a taxa de incidência apresentou aumento anual constante de 2,3% para homens brancos, 3,1% para mulheres brancas, 3,9% para homens negros e 4,3% para mulheres negras. Este aumento foi observado tanto em tumores localizados quanto em metastáticos, e o autor argumenta que a ampla utilização de meios de imagem, como ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética explicam ao aumento da incidência dos tumores localizados através do fenômeno de migração de estágio; todavia o aumento dos tumores metastáticos e também a maior incidência em negros permanece sem explicação.

Outro estudo demonstra que desde 1950 houve um aumento de 126% na incidência e de 36,5% na mortalidade anual pela neoplasia. Em 1997 a incidência foi de 9,1/100.000 habitantes, e a taxa de mortalidade foi de 3,5/100.000. O aumento da incidência da neoplasia foi observado principalmente nos pacientes com tumores localizados, novamente reforçando o argumento da migração para estágios iniciais da doença na ocasião do diagnóstico, conforme mencionado previamente.^{23;24}

Existem diversos fatores de risco para CR, com relevância variável.²⁵ Dentre os fatores de risco estabelecidos, e com associação positiva, encontram-se: consumo de tabaco^{26;27}, hipertensão arterial²⁸⁻³², susceptibilidade genética^{33;34} e obesidade.³⁵⁻⁴⁰ Alguns fatores de risco suspeitos incluem diabetes mellitus^{30;41}, doença renal terminal e transplante renal⁴²⁻⁴⁶, multiparidade⁴⁷⁻⁵⁰, e exposição ao tricloroetileno.⁵¹⁻⁵³ Fatores de

risco suspeitos, porém com associação inversa, cuja exposição oferece efeito protetor incluem exercícios físicos⁵⁴⁻⁵⁶ e consumo de álcool.^{57;58}

Tabela 2: Fatores de risco para carcinoma renal.

Fator de risco	Tipo de associação	Comentários
Tabaco ⁽¹⁾	Positiva	Risco dose-dependente em pacotes/ano Abstinência reduz risco após 10 anos
Obesidade ⁽¹⁾	Positiva	Risco dose-dependente para IMC Benefício incerto da perda de peso
Hipertensão ⁽¹⁾	Positiva	Risco dose dependente para tempo de hipertensão Controle de pressão arterial pode reduzir risco Efeito independente de peso corporal
Síndromes familiares ⁽¹⁾	Positiva	CR hereditário em famílias acometidas
Predisposição genética ⁽²⁾	Positiva	Associação positiva com história familiar de CR Aumento do risco de CR esporádico em indivíduos geneticamente suscetíveis
Diabetes ⁽²⁾	Positiva	Efeito independente de peso corporal e pressão arterial ainda não estabelecido
Doença renal terminal ⁽²⁾	Positiva	Aumento do risco subsequente de CR
Multiparidade ⁽²⁾	Positiva	Risco dose-dependente para número de gestações Possível associação inversa com idade da primeira gestação
Exercício físico ⁽²⁾	Inversa	Risco dose-dependente com nível de atividade
Álcool ⁽²⁾	Inversa	Risco dose-dependente com quantidade ingerida
Tricloroetileno ⁽²⁾	Positiva	Risco dose-dependente com nível de exposição

Adaptado de Chow et al.²⁵**Legenda:**

- (1) Estabelecido – Observado na maioria dos estudos, exposição precede CR; relação de dose-resposta; redução do risco com remoção da exposição
- (2) Suspeito – Resultados conflitantes na literatura; efeito independente do fator de risco não foi estabelecido; avaliação do risco incompleta.

1.1.2 Fatores Prognósticos

A capacidade de antecipar o desfecho da neoplasia renal tem evoluído rapidamente, em conjunto com o melhor entendimento da sua biologia.

O primeiro sistema formal de estadiamento do CR foi proposto em 1958 por Flocks e Kadesky⁵⁹, e utilizava informações anatômicas obtidas a partir dos estudos de imagem disponíveis à época.

Em 1969, Robson⁶⁰ publicou seu sistema de estadiamento, que viria a se popularizar principalmente pela facilidade de uso. Entretanto, o estadiamento de Robson apresentava alguns problemas: principalmente ao agrupar na categoria III pacientes com envolvimento linfonodal, hoje reconhecido como evento de mau prognóstico; juntamente com a presença de trombo vascular em veia renal e cava inferior, que apresentam geralmente prognóstico comparável à doença localizada.

A série original de Fuhrman⁶¹ foi publicada em 1982, onde avaliou aspectos morfológicos em 103 pacientes com CR, incluindo estadiopatológico, tamanho, arranjo celular, tipo celular e grau nuclear. Fuhrman descreveu quatro graus de morfologia nuclear, em ordem crescente de tamanho nuclear, irregularidade, e proeminência de nucléolos. Seus resultados demonstraram que em pacientes com estadiopatológico 1, os de grau nuclear 1 não apresentaram metástases quando seguidos por pelo menos cinco anos, enquanto que metade dos pacientes com graus nucleares

maiores apresentou metástases. Um dado curioso desta série foi que pacientes com variante de células claras se comportaram de modo menos agressivo do que os com tumores granulares, com taxa de metástases respectivamente de 38% e 71%. Fuhrman argumenta que este comportamento foi explicado pelo menos em parte pelo grau nuclear, pois apenas cinco por cento dos tumores com grau nuclear 3 e 4 eram de células claras, enquanto que nos tumores granulares os mesmos graus representavam 57% dos casos.

As limitações dos antigos sistemas de estadiamento se tornaram evidentes, levando ao sistema TNM, proposto pela AJCC/UICC.⁶²

Em sua sétima edição⁶³, o Manual de Estadiamento do Câncer da AJCC traz como principais modificações em relação à versão anterior⁶⁴ a subdivisão das lesões T2 em T2a (entre 7,1 e 10 centímetros) e T2b (maior que 10,1 centímetros); o envolvimento da glândula adrenal passa a T4 se por contiguidade e a M1 se não contíguo; a invasão da veia renal passa a T3a; e o envolvimento linfonodal foi simplificado para N0 e N1. A tabela 3 ilustra o detalhamento atual da Categoria T da AJCC.

O estadiamento TNM parece ser um dos fatores prognósticos mais importantes. A sobrevida câncer-específica nos estádios T1-2 varia de 71 a 97%, enquanto que para os tumores localmente avançados é de 20 a 53%; e é menor que dez por cento nos pacientes com doença metastática.⁶⁵

Conforme ilustra o gráfico 1, a sobrevida dos pacientes portadores de doença localizada é bastante favorável, ultrapassando 80% para o estágio I,

ao passo que os portadores de doença metastática apresentam sobrevida em cinco anos inferior a dez por cento.⁶³

Tabela 3: Estadiamento TNM para câncer renal.

Categoria T	Definição
T1	Tumor limitado ao rim, até 7 cm. no maior diâmetro
T1a	Tumor até 4 cm., limitado ao rim
T1b	Tumor entre 4,1 e 7 cm., limitado ao rim
T2	Tumor limitado ao rim, maior que 7 cm. no maior diâmetro
T2a	Tumor entre 7,1 e 10 cm., limitado ao rim
T2b	Tumor maior que 10,1 cm., limitado ao rim
T3	Tumor invade veias maiores ou tecido perirrenal, porém limitado à fáscia de Gerota
T3a	Tumor invade veia renal ou ramos maiores, gordura perirrenal ou do seio renal, limitado à fáscia de Gerota
T3b	Tumor se estende à veia cava, abaixo do diafragma
T3c	Tumor se estende à veia cava, acima do diafragma, ou invade sua parede
T4	Tumor se estende além da fáscia de Gerota, incluindo extensão por contiguidade da adrenal ipsilateral

Adaptado de Edge, et al.⁶³

Entretanto, existem pontos de discussão quanto ao estadiamento do CR.

Ao estudar a evolução dos tumores pT1, Dall'Oglio et al.⁶⁶ demonstraram que um melhor ponto de corte estaria em quatro centímetros. Estes autores avaliaram 120 pacientes, divididos em três grupos: 1) com tumores abaixo de quatro centímetros; 2) entre quatro e sete centímetros; e

3) acima de sete centímetros; e observaram que tumores maiores que quatro centímetros se relacionaram com fatores de mau prognóstico, como a invasão tumoral microvascular, histologia sarcomatosa e envolvimento de linfonodos. Também verificaram que a sobrevida livre de doença foi significativamente diferente entre os grupos. Para os tumores pT1 maiores que quatro centímetros, a sobrevida foi de 100% em 31 meses, enquanto que os pT1 entre quatro e sete centímetros apresentaram sobrevida de 81%, sugerindo a subdivisão da categoria pT1 em pT1a para tumores até quatro centímetros e pT1b para aqueles entre quatro e sete centímetros.

Gráfico 1: Taxas de sobrevida pelo Estadiamento TNM 2010.

Legenda: Sobrevida observada em 37.166 pacientes com CR, pelo critério atual da AJCC, baseado no National Cancer Data Base. Adaptado de Edge, et al.⁶³

Bonsib et al.⁶⁷ avaliaram tumores classificados como estágio pT2, e demonstraram que em 97% deles existe infiltração da gordura do seio renal, sendo, portanto considerados pT3, apontando para a “raridade” da categoria pT2.

Recentemente, há quem questione⁶⁸ a nova categoria T2 da AJCC. Waalkes et al. avaliaram 579 pacientes previamente estadiados com tumores T2 que foram recategorizados em T2a ou T2b, e não encontraram diferença significativa na sobrevida câncer-específica em cinco anos (79% versus 74,1%, $p=0,38$).⁶⁹

Em relação à categoria T3, a nova subclassificação tem demonstrado relevância clínica. O recém criado Consórcio Internacional de Trombo Venoso em CR congrega onze instituições europeias e norteamericanas, e avaliou a maior coorte atual, com 1.122 pacientes; e reportou diferença relevante na sobrevida câncer-específica acima de dez anos de seguimento entre os novos subgrupos T3a e T3b.⁷⁰

A invasão do seio renal e da gordura perirrenal são ambos considerados estágio pT3, todavia, têm-se demonstrado que, provavelmente devido à presença de grande quantidade de vasos sanguíneos no seio renal estes tumores apresentam maior risco de morte (63%), quando comparados aos que apresentam invasão da gordura perirrenal.⁷¹

O envolvimento de linfonodos é sabidamente um dos mais importantes fatores prognósticos. Ocorre entre treze a 30% dos casos, relaciona-se a tumores avançados e a presença de metástases à distância.⁷²

Também foi demonstrado que a presença de êmbolos neoplásicos intravasculares constitui fator prognóstico independente. Gonçalves et al.⁷³ encontraram êmbolos tumorais em 25% de pacientes operados por CR estadio pT1 e pT2. Destes, 50% apresentaram recidiva da doença, contra apenas seis por cento daqueles sem embolização microvascular.

Recentemente, Dall'Oglio et al.^{74;75} propuseram uma nova tríade prognóstica formada pela presença de invasão microvascular, juntamente com o grau nuclear de Fuhrman e o tamanho tumoral. As variáveis resultam em três grupos de risco: os tumores de baixo risco são aqueles sem invasão microvascular, com baixo grau de Fuhrman e menores que 7 cm. O risco intermediário é aquele em que um dos três fatores desfavoráveis está presente. O terceiro grupo, de alto risco é aquele com invasão tumoral microvascular, grau nuclear de Fuhrman 3 ou 4 e tamanho maior que 7 cm.

A presença de sintomas no momento do diagnóstico também demonstra valor prognóstico. Dall'Oglio et al.^{76;77} avaliaram 115 pacientes e concluíram que a sobrevida câncer-específica foi de 100% e 80% respectivamente para pacientes assintomáticos e sintomáticos, e que os primeiros apresentavam achados significativamente mais favoráveis, como menor tamanho, estadio, grau nuclear e invasão microvascular. Achados similares foram descritos por outros autores.^{78;79} Portadores de CR que apresentam síndromes paraneoplásicas concomitantes ao diagnóstico também apresentam prognóstico inferior.^{80;81}

Na evolução dos sistemas prognósticos, surgiram os sistemas integrados e nomogramas.

Sistemas integrados de estadiamento utilizam modelos matemáticos que combinam diversos fatores prognósticos não-anatômicos que demonstravam valor prognóstico em câncer renal.

O Sistema de Estadiamento Integrado (UISS) da UCLA⁸² combina o sistema TNM 1997 com o performance status da ECOG e o grau histológico de Fuhrman. Foram avaliados 661 pacientes submetidos a nefrectomia, e identificadas 64 combinações possíveis das variáveis analisadas, que foram condensadas em cinco grupos distintos. A sobrevida projetada para dois e cinco anos para cada um dos grupos foi respectivamente: Grupo I: 96% e 94%, grupo II: 89% e 67%, grupo III: 66% e 39%, grupo IV: 42% e 23%, e grupo V: 9% e 0%. Subsequentemente, o UISS demonstrou grande robustez em trabalhos internacionais multicêntricos.^{83;84}

O grupo do Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) também desenvolveu um sistema integrado para avaliação de portadores de CR localizado⁶⁵, que foi baseado no trabalho validado de Motzer para tumores metastáticos.⁸⁵ Identificaram 1554 pacientes submetidos a nefrectomia para CR, sendo que 118 foram diagnosticados com recidiva tumoral e passíveis de avaliação. Os parâmetros avaliados foram: tempo de nefrectomia, cálcio sérico, hemoglobina, desidrogenase láctica e *Karnofsky Performance Status* (KPS), e a cada parâmetro foi atribuído um ponto, num escore de zero a cinco pontos. Os pacientes foram estratificados em três grupos de risco: Baixo (zero pontos), intermediário (um ou dois pontos) e alto (três a cinco pontos). A sobrevida global em dois anos foi de respectivamente, 88%, 51% e 11%.

Um Nomograma (ou Ábaco) é um instrumento gráfico de cálculo, um diagrama bidimensional que permite o cálculo gráfico e aproximado de uma função com qualquer número de variáveis. Em sua concepção mais geral, o nomograma representa simultaneamente o conjunto de equações que definem determinado problema e o número total de soluções possíveis.⁸⁶

Em 2001 Kattan et al.⁸⁷ avaliaram 601 pacientes submetidos a nefrectomia, indistintamente do tipo histológico do tumor, com as seguintes variáveis: apresentação sintomática ou incidental, doença local ou sistêmica, histologia, tamanho tumoral e estadio patológico. Concluíram que a sobrevida livre de doença em cinco anos desta coorte foi de 86%. A capacidade preditora deste nomograma quando comparado ao desfecho real foi de 74%.

Coube a Frank et al.⁸⁸ o primeiro nomograma específico para carcinoma de renal de células claras. Foram 1801 pacientes, avaliados quanto a idade, sexo, uso de tabaco, apresentação clínica, estadio clínico, tamanho, grau nuclear, presença de necrose, diferenciação sarcomatoide, arquitetura cística, multifocalidade e margens cirúrgicas. Os fatores prognósticos independentes identificados foram estadio clínico, tumores maiores que cinco centímetros, grau nuclear e presença de necrose. Mais recentemente, o mesmo grupo atualizou estes dados, e propôs um nomograma de avaliação dinâmica.⁸⁹

Na sequência do nomograma inicial de Kattan, o mesmo serviço publicou um nomograma similar ao inicial, porém específico para carcinoma renal de células claras, com ênfase no tipo esporádico.⁹⁰ Foram avaliados

833 pacientes com CRCC, excluídos portadores de Doença VHL e síndromes familiares, e doença metastática. As variáveis consideradas foram tamanho, estadio patológico, grau nuclear, necrose, invasão vascular, e apresentação clínica. A probabilidade de sobrevida livre de recorrência em cinco anos foi de 80,9%, e a capacidade preditora deste nomograma foi de 82%.

Uma limitação relativa destes nomogramas é que todos se baseiam em informações obtidas de achados pós operatórios.

Recentemente, com uma linha de raciocínio diferente, coube a Kanao, et al.⁹¹ o primeiro nomograma baseado exclusivamente em parâmetros pré operatórios. Os autores utilizaram estadio clínico TNM 2002 para avaliar 545 portadores de CR indistintamente do tipo histológico, e incluindo doença metastática. Concluíram que os estádios T, N e M foram fatores prognósticos independentes, com taxas de sobrevida de um, três e cinco anos respectivamente de 95,2%, 92% e 89,9%. A capacidade preditora deste nomograma quando comparado ao desfecho real foi de 81%.

Com os novos conhecimentos acerca da biologia molecular dos CR, e a identificação do impacto prognóstico de diversos marcadores moleculares, era natural que a sua expressão fosse incorporada às ferramentas disponíveis para prognóstico.

Kim et al.⁹² alegam ter publicado a primeira série de qualquer tumor sólido que demonstra um modelo prognóstico baseado em expressão proteica que obteve desempenho superior ao proporcionado pelo TNM, grau

nuclear ou estado de performance. Nesta série, os autores avaliaram 318 pacientes com CRCC, tanto localizados como metastáticos, e avaliaram a expressão imunoistoquímica de diversas proteínas, Ki-67, p53, gelsolina, CA-IX, CA-XII, PTEN, EpCAM e vimentina. Um modelo prognóstico incluindo uma combinação de parâmetros clínicos e moleculares (estadio T, estadio N, ECOG-PS, p53, CA-IX e vimentina) foi validado, com índice de concordância de 79%, que demonstrou ser significativamente superior aos observados com grau nuclear isolado, TNM isolado, ou UISS, cujos índices de concordância eram respectivamente 65%, 73% e 75%.

O mesmo grupo avaliou apenas CRCC metastáticos e encontrou resultados similares ao agrupar os seguintes parâmetros: Estadio T, ECOG-PS, CA-IX, Vimentina, p53 e PTEN.⁹³

1.1.3 Carcinoma Renal do Tipo Células Claras

Macroscopicamente o carcinoma renal de células claras (CRCC) tem aspecto bastante variável, mas geralmente constitui-se em uma massa lobulada, que distorce o rim e pode se insinuar para a gordura perirrenal. Uma pseudocápsula fibrosa está presente e confere ao tumor uma aparência circunscrita. A superfície de corte revela coloração que vai do amarelo-ouro (indicativa do alto conteúdo lipídico das células claras ou macrófagos, ou componente de necrose) até o vermelho-acastanhado (indicativa de componente celular granuloso). São achados frequentes a hemorragia, necrose, alterações císticas e fibrose. Histologicamente, em sua

forma habitual, o CRCC é constituído por células de citoplasma amplo e claro, ricas em lípidos, e que se dispõe em trabéculas ou formam ácinos, e mais raramente podem apresentar áreas papilíferas e componentes de células eosinofílicas.⁹⁴

Geneticamente apresenta a perda do cromossomo 3p, onde se localiza o gene von Hippel-Lindau (VHL). O gene VHL é um gene supressor de tumor, cuja proteína atua como fator transcripcional. Detalhes desta biologia molecular encontram-se adiante no texto.

A descoberta do gene VHL, e sua caracterização como um gene supressor de tumor é creditada a Latif et al.⁹⁵, em 1993.

O gene VHL, como todo gene supressor de tumor, obedece à teoria de Knudson⁹⁶, que postula que o fenótipo tumoral é o resultado de mutações em ambos os alelos do gene acometido, enquanto que a mutação de um único alelo não produz fenótipo tumoral, mas é transmitida para as gerações subsequentes. Este comportamento explica as diferenças observadas entre a forma esporádica e familiar da neoplasia.

A maioria dos casos de CRCC parece ocorrer esporadicamente, entretanto há evidências de que um a quatro por cento dos casos são devidos a predisposição hereditária.⁷

Na forma familiar, o carcinoma renal ocorre em 35 a 45% dos indivíduos afetados, tem aparecimento mais precoce, em geral na adolescência, e é caracterizado pela multicentricidade e bilateralidade. Metástases se desenvolvem em 40% dos pacientes não tratados.⁹⁷

Segundo Pasche¹⁷, a síndrome de von Hippel-Lindau (VHL) foi descrita por Eugene von Hippelⁱⁱ, oftalmologista alemão que publicou a ocorrência de angiomas hereditários de retina, e Arvid Lindauⁱⁱⁱ, patologista sueco que determinou que os angiomas de retina e os hemangioblastomas do sistema nervoso central pertenciam à mesma síndrome familiar.

Posteriormente, coube a Melmon e Rosen^{iv} estabelecer que o CRCC seja uma manifestação clínica da síndrome VHL.

1.2 Hipóxia e os Tumores

Fisiologistas e clínicos definem hipóxia como um estado de redução no suprimento adequado de oxigênio, ou pressão parcial de oxigênio abaixo de níveis críticos, causando comprometimento ou até mesmo abolindo completamente diversas funções biológicas. Anóxia é definida como ausência de oxigênio tecidual.⁹⁸

Os principais tipos e causas de hipóxia, e alguns de seus causadores estão listados na Tabela 4.

Níveis adequados de oxigênio são necessários para a manutenção dos sistemas de transporte de membrana e biossíntese celular. Diante de um

ⁱⁱ von Hippel E. Über eine sehr seltene Erkrankung der Netzhut. Albrecht von Graefes Archiv Ophthalmol. 1904; 59:83-6.

ⁱⁱⁱ Lindau A. Studien über Kleinhirncysten: Bau, Pathogenege und Beziehungen zur Angiomatosis Retinae. Acta Pathol Microbiol Scand. 1926; 3:1-128

^{iv} Melmon KL, Rosen SW. Lindau's disease: review of the literature and study of a large kindred. Am J Med. 1964; 36:595-617

suprimento irrestrito de oxigênio, a maioria dos tumores apresenta taxa de consumo tecidual de oxigênio comparável àquela observada no tecido normal correspondente.⁹⁹

Tabela 4: Hipóxia - Tipos, definições e principais causas.

Tipo	Definição	Principais Causas
Hipóxia hipoxêmica	Baixa tensão arterial de oxigênio	Doenças pulmonares Altitude elevada
Hipóxia anêmica	Habilidade reduzida de transporte de oxigênio	Anemia Formação de metahemoglobina Intoxicação por dióxido de carbono
Hipóxia isquêmica	Redução da perfusão tecidual de oxigênio	Tromboses e estenoses vasculares
Hipóxia difusional	Deterioração da geometria ou arquitetura difusional	Aumento das distâncias de difusão
Hipóxia citotóxica	Inabilidade da célula de utilizar o oxigênio	Intoxicação por cianureto

Adaptado de Zander et al.⁹⁸

Tumores se tornam hipóxicos porque os vasos sanguíneos que produzem são aberrantes, e possuem fluxo sanguíneo reduzido. Ainda mais, o ganho de função e a perda da inibição por contato observados nos tumores acarretam aumento da proliferação celular, com consequente redução proporcional do suprimento sanguíneo e de oxigênio. A proliferação celular descontrolada da neoplasia supera a capacidade de formação de novos vasos sanguíneos.¹⁰⁰

Historicamente, a hipóxia tumoral tem sido considerada um problema terapêutico desde os trabalhos seminais de Gray et al.^v, e de Thomlinson^{vi}, quando foi demonstrado que a hipóxia torna os tumores mais resistentes à quimioterapia.¹⁴

Existem consideráveis evidências demonstrando que a hipóxia é também a consequência do rápido crescimento de vários tumores sólidos, inclusive os do rim.^{99;101}

Estudos da biologia celular renal também demonstram que a hipóxia é um importante fator regulador de uma rede de expressão gênica, com habilidade de estimular ou inibir genes específicos, afetando sua expressão.⁹⁹

1.2.1 A Via Induzível pela Hipóxia

O HIF-1 (hypoxia inducible factor 1) é um heterodímero de HIF-1 α e HIF-1 β . Enquanto HIF-1 β é expresso constitutivamente, o HIF-1 α tem sua concentração intracelular controlada tanto ao nível de biossíntese quanto ao nível pós-translacional.^{100;102}

O controle da biossíntese do HIF-1 α é realizado através da via do PI3K-AKT-mTOR. É sabido que o aumento da atividade da PI3K e AKT

^v Gray L, Conger A, Ebert M, Hornsey S, Scott O. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. Br J Radiol. 1953;26:638-48.

^{vi} Thomlinson R. Tumour anoxia and the response to radiation. Sci Basis Med Annu Rev. 1965:74-90.

estimulados por fatores de crescimento associados aos seus receptores, ou como resultado de um gene PTEN defeituoso – um achado comum em diversos tumores humanos – pode aumentar a expressão de HIF-1 α por esta via de sinalização.¹⁰³

O controle postranslacional do HIF-1 α é feito através do produto do gene VHL, a proteína VHL.^{100;102}

Em condições de normóxia, o HIF-1 α é hidroxilado em dois resíduos de prolina e um resíduo de asparaginase. Este complexo prolin-hidroxilado do HIF-1 α se liga à proteína VHL, que é o componente de reconhecimento da E3 ubiquitina-ligase, que por sua vez leva à rápida degradação do HIF-1 α . Desta forma o HIF-1 α tem meia vida muito curta e não é detectado em condições de normóxia.^{100;102}

Por outro lado, em condições de hipóxia, o HIF-1 α não é hidroxilado, e não se une à proteína VHL, e portanto não é degradado pela ubiquitina. Deste modo, superexpressão do HIF-1 α é vista com frequência em tumores humanos, porém raramente em tecidos normais.¹⁰⁴ Além da hipóxia, evidências indicam que a mutação, deleção ou hipermetilação do gene VHL pode causar acúmulo intracelular de HIF-1 α por um defeito na ubiquitinização, e este acúmulo poderia ocorrer mesmo na ausência de hipóxia.^{105;106} A Figura 1 ilustra este mecanismo de ação.

A mutação do VHL ou sua perda ocorre em 50% a 80% dos CRCC esporádicos, sugerindo uma potencial via tumorigênica do VHL-HIF-1 α neste tipo histológico de CR.^{107;108} Alguns estudos demonstram que a inibição

competitiva do substrato de reconhecimento do VHL por um peptídeo derivado da proteína HIF-1 α recupera o fenótipo tumoral de células deficientes em VHL, uma evidência que reforça o possível elo entre a inativação do VHL e a elevação intracelular do HIF-1 α .¹⁰⁷

Figura 1: A via induzível pela hipóxia.

Legenda: Em condições fisiológicas (normóxia) o complexo de ligação da proteína VHL, a subunidade Alfa, se liga ao complexo Elonguina B-C, e degrada o HIF-1 α através do proteossomo. Na presença de hipóxia ou mutação da subunidade Alfa da proteína VHL, o complexo Elonguina não se forma, o HIF-1 α não é degradado e se acumula, ocasionando a ativação de eventos de ganho de função da célula neoplásica. O VEGF é passível de inibição por drogas-alvo antiangiogênicas. Adaptado de Linehan et al.⁵, e Cohen et al.¹⁰⁹

Recentemente, Kondo et al.¹¹⁰ publicaram evidências de que o HIF-1 α é um alvo crítico do gene VHL, sendo importante para sua atividade supressiva tumoral, pois demonstraram que a supressão tumoral do VHL pode ser contornada por uma variante do HIF que escapa ao controle do VHL.

HIF-1 α regula positivamente a transcrição de uma série de genes relacionados à angiogênese, entre eles o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador alfa (TGF- α) e eritropoietina. A perda da repressão de HIF-1 pelo VHL libera a ação desses fatores, aumentando a atividade de genes proangiogênicos.⁵

1.3 mTOR e os Tumores

A Rapamicina é produzida pelo *Streptomyces hygroscopicus*, um estreptomiceto isolado no solo da ilha de Páscoa.¹¹¹ Seu mecanismo de ação demonstra que a rapamicina se une a uma proteína, FKBP12, e que este complexo interage e perturba outra grande proteína da família das quinases, a TOR (do Inglês, *target of rapamycin*)¹¹², que em mamíferos é designada mTOR.

A função da TOR ainda é grandemente desconhecida, porém é cada vez mais claro que se trata de um componente central de uma rede complexa de sinalização intracelular com função regulatória de crescimento celular, proliferação e regulação do tamanho biológico dos animais.¹¹³

A mTOR existe na forma de dois complexos multiproteicos, ligada às proteínas raptor e rictor. O complexo rictor-mTOR é insensível à rapamicina, e está envolvido na manutenção do citoesqueleto, proliferação e sobrevivência celular. O complexo raptor-mTOR é inibido pela ação da rapamicina e seus análogos, e têm como funções controlar autofagia celular, tradução de RNAm, e biogênese ribossomal, funções envolvidas no acúmulo de massa celular e crescimento.¹¹³

Na porção aferente da via do mTOR estão as proteínas PI3K e AKT, entre as quais o gene supressor de tumor PTEN atua com função regulatória negativa. Abaixo da mTOR, a ativação da via atua positivamente sobre S6K1 e p27 e negativamente sobre 4E-BP1, todas componentes críticas do maquinário de translação celular, inclusive atuando sobre o HIF-1 α .¹³. A figura 2 ilustra este mecanismo celular.

O gene PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10*), também conhecido por MMAC1 ou TEP1, é um gene supressor de tumor, localizado no cromossomo 13q23.3.¹¹⁴

A caracterização da proteína PTEN demonstrou ser uma fosfatase que modula vias de transdução de sinal e há indícios que pelo menos parte de seu papel é regular atividade serina/treonina quinase AKT/PKB, influenciando a sinalização de sobrevivência celular.^{115;116}

Figura 2: A Via do mTOR.

Legenda: Fatores de crescimento ativam a via aferente ao mTOR. O gene PTEN controla a atividade na porção aferente desta via. A ativação do mTOR atua sobre elementos críticos do mecanismo de proliferação celular. A ativação postranslacional do mTOR desencadeia acúmulo de HIF-1 α , e a ativação de eventos de ganho de função da célula neoplásica. O mTOR-1 (raptor) é passível de inibição pela Rapamicina e seus análogos. Adaptado de Pantuck et al.^{13;14}

Brenner et al.¹¹⁷ avaliaram a expressão do PTEN em 42 espécimes de CR, oncocitomas e também em amostras de tecido normal dos mesmos pacientes. Observaram que PTEN tinha forte expressão em todas as amostras de tecido renal normal, e a análise imunoistoquímica mostrou que a expressão era quase exclusiva de células epiteliais dos túbulos proximais, conhecidas como precursoras da variante de células claras do CR. No CR, a expressão do PTEN estava acentuadamente reduzida, e o grau de redução

da expressão era similar entre os tumores bem diferenciados e pouco diferenciados. Contrariamente à forte expressão nas células tubulares proximais, as células epiteliais tubulares distais, precursoras dos oncocitomas, exibiram fraca expressão do PTEN. Como conclusão, a expressão do PTEN é perdida nas fases precoces da carcinogênese renal, tornando-o um valioso marcador para CR.

Kondo et al.¹¹⁴ avaliaram 68 pacientes com CR e encontraram mutações deste gene em 5 pacientes (7,5%). A correlação clínica demonstrou que 4 dos 5 pacientes com mutação do PTEN apresentavam tumor de alto grau, com metástases à distância ou invasão da veia renal, resultando em pior prognóstico. O paciente remanescente apresentava CR papilífero de baixo grau. Concluem que a mutação PTEN pode contribuir para um fenótipo tumoral invasivo e/ou metastático.

1.4 Proliferação Celular e os Tumores

A proliferação celular é um dos processos biológicos mais fundamentais devido ao seu papel no crescimento e manutenção da homeostase tecidual.

Sobre o ciclo celular, resumidamente, temos que na fase de repouso (G0), de duração variável, a célula não exibe atividade proliferativa. A partir de estímulos específicos, a célula entra no ciclo proliferativo pela fase G1 (*first gap*), também com duração variável, onde a célula se prepara para a fase seguinte, ou fase S (*synthesis*), onde qual ocorre a síntese de DNA e a

duplicação do genoma celular, levando aproximadamente 12 horas. A fase S é seguida de um período de aparente inatividade chamada de G2 (*second gap*) variando entre uma a seis horas, onde a célula se prepara para a divisão das cromátides durante a fase M (*mitosis*), que leva cerca de uma a duas horas. Uma vez concluída a fase M, cada célula-filha pode então seguir para nova fase G0 ou G1, e assim sucessivamente. A interfase, formada pelas fases G1, S e G2, compreende a maior fração do ciclo celular, entretanto células nestas fases não são morfologicamente reconhecíveis. Na fase M, as células podem ser identificadas pelo aspecto típico dos cromossomos nas diferentes subfases da mitose.¹¹⁸

Marcadores de proliferação celular podem ser classificados em três categorias principais: 1) Marcadores de fração de crescimento, 2) Marcadores de fases específicas do ciclo celular, e 3) Marcadores de tempo do ciclo celular.

Ki-67 (MIB-1) é um anticorpo marcador da fração de crescimento, identificando a proporção das células em proliferação, que identifica um antígeno expresso nas fases G1, S e G2 do ciclo celular.^{119;120} A fase M pode ser avaliada pelo simples método de contagem de mitoses.¹²¹

O papel do Ki-67 como fator prognóstico em CR é um tanto controverso.

Kankuri et al.¹²² avaliaram a expressão do p53 e Ki-67 em 117 pacientes divididos em três grupos: sem metástases, com metástases primárias ou com metástases tardias, e a expressão dos marcadores

demonstrou estar relacionada com fenótipo tumoral agressivo, e pior sobrevida nos pacientes com metástases. Quando ambos os marcadores estavam positivos, observaram maior probabilidade de doença metastática.

Yildiz et al.¹²³, demonstraram que a associação entre invasão microvascular, expressão de VEGF e Ki-67 eram fortes indicadores de prognóstico desfavorável.

No estudo de Kim et al.⁹³, com 150 pacientes, a expressão de Ki-67 mostrou ser preditiva de sobrevida na análise univariada, porém, na análise multivariada não demonstrou ser fator prognóstico independente.

Num trabalho mais recente, por outro lado, ao avaliar a correlação entre a expressão de Ki-67 e necrose de coagulação em 741 pacientes, Tollefson et al.¹²⁴ concluíram que a expressão de Ki-67 é um fator prognóstico independente, a despeito da presença ou ausência de necrose.

1.5 p53 e os Tumores

O gene p53 é um gene supressor de tumor, sendo o mais frequentemente mutado nos tumores humanos^{125;126}. O p53 codifica uma proteína homônima que funciona como fator transcripcional. A maioria das mutações do p53 ocorre em sítios que codificam sequências de domínios específicos de ligação com DNA, causando perda da capacidade de ligação entre a proteína p53 e o DNA.¹²⁷

A via de sinalização que regula o p53 levanta grande interesse devido ao potencial de relevância clínica.

Níveis celulares de p53 aumentam dramaticamente em resposta à lesão do DNA, como por radiação ionizante ou ultravioleta e certos medicamentos citotóxicos de uso em oncologia. Este aumento dos níveis celulares de p53 faz com que a proteína p53 imponha uma parada no ciclo celular em G1, um fenômeno que permite à célula reparar o DNA defeituoso antes de iniciar a fase S do ciclo celular. A função deficiente de p53 não interrompe a fase G1, possibilitando a replicação de DNA defeituoso, uma situação que aumenta o número de mutações e instabilidade genômica, aumentando a chance de transformação neoplásica.¹²⁸

O p53 também auxilia na indução da apoptose, ou morte celular programada. Depois da exposição à radiação ou quimioterapia as células deficientes em p53 exibem aumento na resistência a estes agentes, e desta forma células malignas podem adquirir resistência através de mutações do gene p53 que interferem no início do processo de apoptose¹²⁹.

Shvarts et al.¹³⁰ avaliaram 29 pacientes com recidiva tumoral após a nefrectomia radical e demonstraram que os fatores preditivos mais significativos foram o estadio T, ECOG, e a expressão de p53. Pacientes demonstrando expressão média de p53 acima e abaixo de 20% das células apresentaram taxas de recidiva de 37,7% e 14,4% respectivamente (p= 0.018).

Como já mencionado, a expressão do p53 e Ki-67 demonstrou estar relacionada com fenótipo tumoral agressivo, e pior sobrevida em pacientes com metástases. Quando ambos os marcadores estavam positivos, houve maior probabilidade de doença metastática¹²².

Avaliando 246 pacientes com tumores localizados e metastáticos classificados por tipo histológico, Zigeuner et al.¹³¹ demonstrou que apesar da superexpressão do p53 ser mais pronunciada nos CR não células claras, apenas nos CRCC a análise multivariada mostrou ser o p53 um fator prognóstico independente.

1.6 Tissue Microarray

Descrito em 1986 por Battifora¹³², foi idealizado inicialmente como uma forma mais rápida e fácil de testar os anticorpos em múltiplas amostras de tecido e para controle de qualidade das reações imunoistoquímicas. Posteriormente tornou-se evidente que esta técnica era bastante promissora para a obtenção de pesquisas de alto débito, tendo sido popularizada por diversos autores.¹³³⁻¹³⁶

Para a confecção de um TMA, o passo inicial consiste em recuperar os blocos de parafina e suas respectivas lâminas coradas em hematoxilina-eosina (HE). As lâminas são analisadas ao microscópio ótico comum, e áreas representativas do tumor são demarcadas. Em seguida, por justaposição das lâminas marcadas com os respectivos blocos, estes são marcados na área correspondente ao tecido de interesse, formando cada

um, um bloco doador. A seguir, a área de interesse de cada bloco doador é puncionada com um instrumento específico, em formato de agulha, que remove um diminuto cilindro do tecido a ser analisado. Esta amostra é então transferida para o bloco receptor do TMA, e sua posição neste bloco é definida em um sistema de coordenadas cartesianas. Após transferir amostras de todos os blocos doadores, o conjunto final agrupado no bloco receptor é no que consiste o TMA. As figuras 3 e 4 ilustram a técnica descrita acima.

Figura 3: Representação esquemática da montagem do TMA.

Legenda: a) punção do bloco doador em posição correspondente à lâmina em hematoxilina-eosina; b) transferência do cilindro de tecido para o bloco receptor do TMA; c) corte do bloco de TMA e obtenção das lâminas de TMA. Donor: Doador; Recipient: Receptor. Adaptado de Kokonen.¹³³

Uma vez construído o TMA, o bloco é cortado em secções numeradas de 3µm, e montado em lâminas específicas para esta finalidade, que podem ser coradas de acordo com as preferências do pesquisador, seja por hematoxilina-eosina, imunoistoquímica ou testes de hibridização.

Cortesia de Pontes, Jr.¹³⁷

Figura 4: Etapas da confecção do TMA.

Legenda: A) identificação das áreas de interesse na lamina em HE; B) localização da área correspondente no bloco de parafina, e punção do mesmo; C) montagem do bloco de TMA; D) lâmina do TMA; E) histospot em detalhe; F) área de interesse do histospot em grande aumento.

A questão que esta tese busca responder é se existe correlação entre a expressão dos marcadores moleculares avaliados com a sobrevida global ou com a presença de fatores prognósticos tradicionais em pacientes portadores de carcinoma renal de células claras não metastático.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Primário

Correlacionar imunoexpressão dos marcadores selecionados (CA-IX, EGF-R, Ki-67, p53, PTEN, VEGF, VEGF-R) com sobrevida global dos pacientes portadores de CRCC não metastático.

2.2 Objetivo Secundário

Correlacionar imunoexpressão dos marcadores selecionados (CA-IX, EGF-R, Ki-67, p53, PTEN, VEGF, VEGF-R) com fatores prognósticos convencionais: Estadio T, tamanho do tumor, grau nuclear de Fuhrman agrupado, invasão microvascular e invasão de gordura perirrenal em pacientes portadores de CRCC não metastático.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

O levantamento inicial revelou 227 pacientes portadores de câncer renal operados no serviço do Professor Miguel Srougi, no período entre janeiro de 1988 e março de 2006. Destes, 144 foram identificados com histologia de carcinoma renal de células claras (CRCC) e 83 foram excluídos por terem tipos histológicos diversos, não-células claras.

Dentre os 144 portadores de CRCC, 41 foram censurados por impossibilidade de localização de material disponível para análise imunoistoquímica, ou por não apresentarem dados de prontuário completos para análise, resultando 103 pacientes que tiveram seu material incluído no TMA.

Houve nove pacientes operados no Hospital Beneficência Portuguesa de São Paulo entre 05 de Setembro de 1995 e 14 de Maio de 1998, e todos os demais foram operados no Hospital Sírio Libanês entre 18 de Agosto de 1988 e 04 de Março de 2006.

O tempo de seguimento variou de 1,9 a 19,5 anos, com seguimento médio de 7,9 anos.

Após a confecção do TMA, observamos que as posições (D15 + D16) e (E15 + E16) continham designação de apenas um paciente (respectivamente 25951A e SL25951A). Diante da incerteza se se tratava apenas de duplicidade de amostras ou de troca de amostras, ambas as posições foram excluídas da análise.

Também foram excluídos dois pacientes portadores de doença metastática.

Restaram 99 pacientes que são o objetivo do presente estudo. As características clínicas e demográficas da população do estudo encontram-se na tabela 5.

Os dados demográficos e clínicos foram obtidos pela revisão dos prontuários médicos, enquanto que os dados anatomopatológicos são provenientes do relatório final da fornecido pelo Laboratório de Patologia. A condição clínica final dos pacientes foi obtida por revisão de prontuário ou por contato telefônico.

Este estudo foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq), e foi aprovado conforme demonstra o Parecer encontrado no Anexo A.

Dos pacientes ou seus representantes legais foi obtido consentimento livre e esclarecido para utilização do material e informações de prontuário, preservando a confidencialidade dos mesmos. No Anexo B encontra-se a cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Também, após a confecção das lâminas do TMA houve perdas adicionais de material, seja por artefatos ou mais frequentemente por descolamento de histospots, que variaram de lâmina para lâmina, e por vezes comprometeram ambas as amostras de alguns pacientes, conforme detalhado na Tabela 6.

Tabela 5: Tabela de base da casuística: características dos pacientes e tumores.

	n = 99	%
Sexo		
Masculino	72	72,7
Feminino	27	27,3
Idade (anos)		
Mínima / máxima	9 / 81	
Média (IC, 95%)	59,2 (56,5 / 61,8)	
Tempo de seguimento (anos)		
Mínimo / máximo	1,9 / 19,5	
Média (IC, 95%)	7,9 (6,9 / 8,8)	
Tamanho do tumor (cm)		
Mínimo / máximo	1,2 / 19,5	
Média (IC, 95%)	5,0 (4,38 / 5,60)	
Lado		
Direito	41	41,4
Esquerdo	55	55,6
Bilateral	3	3
Estadio T		
T1	72	72,7
T2	8	8,1
T3	19	19,2
Estadio N+	0	0
Estadio M+	0	0
Tamanho do tumor (categorizado)		
Até 4,0 cm.	52	52,5
Entre 4,1 e 7,0 cm.	28	28,3
Maior que 7,1 cm.	19	19,2
Grau nuclear de Fuhrman		
G1	27	27,3
G2	38	38,4
G3	27	27,3
G4	7	7,1
Invasão microvascular		
Ausente	73	73,7
Presente	26	26,3
Invasão de gordura perirrenal		
Ausente	79	79,8
Presente	20	20,2

Tabela 6: Perda amostral do TMA, por marcador.

Marcador	Perda Amostral	n	Detalhamento
CA IX	0	78	Não aplicável
	1	17	B02, B16, C06, D11, D14, I01, I16, J02, J06, L14, L16, M10, M12, M14, N02, N06, N14
	2	4	(A03+A04), (C15+C16), (G15+G16), (M15+M16)
EGF-R	0	78	Não aplicável
	1	19	B02, B16, C16, D11, D14, G15, I01, I16, J02, J06, L16, M02, M07, M10, M12, M14, N02, N06, N07
	2	2	(A03+A04), (M15+M16)
Ki-67	0	72	Não aplicável
	1	23	B02, B08, B16, C06, D11, D14, F12, F13, I01, I16, J06, L02, L14, L16, M02, M07, M10, M12, M14, N02, N06, N07, N14
	2	4	(A03+A04), (C15+C16), (G15+G16), (M15+M16)
p53	0	77	Não aplicável
	1	18	B02, B16, C06, D11, D14, I01, I16, J02, J06, L14, L16, M10, M12, M14, N02, N06, N07, N14
	2	4	(A03+A04) (C15+C16) (G15+G16) (M15+M16)
PTEN	0	78	Não aplicável
	1	19	B02, B16, C16, D11, D14, I01, I16, J02, J06, L16, M02, M07, M10, M12, M14, N02, N06, N07, N14
	2	2	(A03+A04), (M15+M16)
VEGF	0	69	Não aplicável
	1	24	A01, B02, B08, C06, D11, D14, F12, I01, I16, J02, J06, J07, L14, L16, M02, M08, M10, M12, M14, N02, N06, N07, N10, N14
	2	6	(A03+A04), (B13+B14), (B15+B16), (C15+C16), (G15+G16), (M15+M16)
VEGF-R	0	62	Não aplicável
	1	28	A08, A14, A15, B02, C06, C12, D10, D14, E05, F04, F10, G13, G16, H04, H09, I06, I08, I16, J10, J12, L07, L15, M01, M04, M06, M09, M14, N08
	2	9	(A03+A04), (B09+B10), (F11+F12), (H15+H16), (J05+J06), (L01+L02), (I03+L04), (L09+L10), (N13+N14)

3.2 Tissue Microarray

A técnica empregada para construção do TMA foi adaptada de Kononen et al.¹³³ Fedor e De Marzo publicaram uma revisão detalhada das técnicas contemporâneas de construção de TMA.¹³⁸

Em nosso estudo empregamos um sistema mecanizado de precisão da marca Beecher (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, EUA) que coleta cilindros de 0,6 milímetros de diâmetro e os insere no bloco receptor a intervalos de 0,3 milímetros.

O diagrama cartesiano de montagem do TMA está no Apêndice 1.

Foram cortadas 100 lâminas do bloco de TMA, armazenadas em congelador comum a -20°C até a realização da reação imunoistoquímica.

Cada TMA foi inspecionado a olho nu, e os histospots que descolaram tiveram suas posições marcadas com caneta de ponta fina, tipo marcador permanente na cor azul, de modo a garantir que cada linha fosse fotografada com a quantidade exata de histospots, conforme o diagrama de construção do TMA.

As linhas “a” até “m” continham dezesseis histospots cada; a linha “n” continha catorze, e a linha “o” apenas dois. Esta configuração assimétrica de linhas previne que o TMA seja analisado de forma invertida. O preenchimento com caneta dos pontos faltantes confere a certeza que cada amostra será fotografada em sua posição exata no TMA e, portanto correlacionada ao paciente em questão.

3.3 Imunoistoquímica

As amostras foram submetidas à recuperação antigênica pelo calor utilizando tampão citrato (1mM, pH 6,0) e aquecidas por 30 minutos em panela de pressão elétrica. As lâminas foram incubadas por uma noite a 4^o C, com os anticorpos monoclonais especificados na Tabela 7. Para imunocoloração foi utilizado o sistema LSAB (Dako Cytomation, CA, EUA).

A coloração foi desenvolvida por uma solução substrato-cromógena 3,3'-diaminobenzidina, seguida por contracoloração com hematoxilina de Harris. As lâminas foram desidratadas, montadas com lamínulas e observadas em microscópio óptico.

Tabela 7: Anticorpos empregados no estudo imunoistoquímico.

Anticorpo	Fabricante	Diluição
CA-IX	Abcam (Cambridge, MA, EUA)	1:1.000
EGF-R	Abcam (Cambridge, MA, EUA)	1:50
Ki-67	Chemicon (Temecula, CA, EUA)	1:100
p53	Abcam (Cambridge, MA, EUA)	1:500
PTEN	Abcam (Cambridge, MA, EUA)	1:20
VEGF	Abcam (Cambridge, MA, EUA)	1:100
VEGF-R	Abcam (Cambridge, MA, EUA)	1:50

3.4 Captura Digital e Armazenamento das Imagens

Na digitalização das imagens foi utilizado um microscópio Olympus BX60 (Olympus Corporation, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera Olympus DP71 controlada pelo software DP Controller (versão 3.2.1.276). O gerenciamento das imagens foi feito através do software Olympus DP Manager (versão 3.1.1.208).

As lâminas eram analisadas ao microscópio ótico para certificar adequada qualidade da imagem e da iluminação. Em seguida os histospots eram analisados pelo fotômetro da câmera. Uma vez obtidas imagens de bom padrão, os controles da câmera eram passados para o modo manual, a fim de obter captura de imagens padronizadas no decorrer de todo TMA. Os parâmetros utilizados foram ISO 200, velocidade do diafragma 1/2.500 de segundo. Todas as regulagens do microscópio – abertura e distância do condensador, intensidade da luz – foram mantidas inalteradas durante toda a sessão de captura de imagens.

Uma vez fotografadas, as imagens eram salvas em formato TIFF - *Tagged Image File Format* (Adobe Systems, CA, EUA), e automaticamente nomeadas em sequência contendo o tipo de marcador e sua posição cartesiana no TMA, de modo a assegurar que cada imagem pudesse ser corretamente identificada posteriormente.

3.5 Quantificação Digital da Imunoexpressão

A imunoexpressão dos marcadores foi analisada digitalmente utilizando o software Photoshop CS4, versão 11.0 (Adobe Systems, CA, EUA), através da contagem de pixels, ou medição de área, conforme descrito por Lehr et al.^{139;140}

Cada histospot foi inspecionado à procura de uma área representativa que deveria preencher os seguintes requisitos: 1) conter exclusivamente tecido neoplásico e, 2) apresentar histologia homogênea e compacta. Em seguida, um demarcador circular com área fixa correspondendo a 150.000 pixels era aplicado sobre a área de interesse. O restante do histospot era eliminado digitalmente. As etapas acima estão ilustradas nas figuras 5 a 7.

Figura 5: Histspot.

Legenda: Área de trabalho do programa Photoshop contendo amostra de tecido para análise. A aba no canto superior esquerdo da tela (seta) identifica o nome do arquivo em uso, que contém o marcador analisado e qual a posição cartesiana no TMA.

Figura 6: Demarcador de 150.000 pixels sobre a área de interesse.

Legenda: Um demarcador circular com área de 150.000 pixels é colocado sobre a área de interesse da amostra. A ferramenta “Demarcadores” (seta) encontra-se na terceira aba no canto inferior direito da área de trabalho, se esta estiver em modo “Básico”. O demarcador pode ser definido com qualquer forma e área desejada, e salvo para utilização futura.

Figura 7: Preservação da área de interesse e remoção da imagem adjacente.

Legenda: Uma vez colocado o demarcador na área de interesse, realiza-se a inversão da seleção (comando “Shift+Control+I”) – e passamos a selecionar a área externa ao demarcador, que é excluída, restando apenas a área de interesse para análise.

A metodologia de leitura utilizada era específica para cada tipo de expressão dos marcadores – nuclear, citoplasmática ou de membrana.

3.5.1 Expressão Citoplasmática e de Membrana

A região a ser analisada era ampliada até observar-se a “pixelização” da imagem, e com a ferramenta de seleção de cores, um pixel acastanhado

era selecionado no ponto de interesse (membrana ou citoplasma), com grau de seleção regulado para 100, correspondendo a 50% da escala de seleção. Este comando permite que o programa selecione pixels adjacentes ao selecionado, evitando que a seleção fosse excessivamente restritiva. Uma vez selecionada a coloração acastanhada de interesse, todas as demais cores eram digitalmente excluídas, restando apenas os pixels da coloração de interesse, que eram contados com o auxílio do histograma, conforme ilustram as figuras 8 a 10.

Os valores dos pixels observados eram transferidos para uma planilha em Excel (Microsoft Corporation, CA, EUA), formatada para o cálculo automático da média das duas amostras de cada paciente, quando presentes. Quando apenas uma amostra estava presente, seu valor era considerado.

Figura 9: Detalhe da coloração acastanhada escolhida.

Legenda: Todos os pixels correspondentes à coloração escolhida são selecionados e achureados .

Figura 10: Remoção digital das colorações de não-interesse e contagem final de pixels da coloração de interesse.

Legenda: Realiza-se novamente a inversão da seleção (comando “Shift+Control+I”). Em seguida excluem-se todos os pixels correspondentes às colorações de não-interesse. Restam apenas os pixels da coloração escolhida, que são contados (seta) na aba “Histograma”.

3.5.2 Expressão Nuclear

A imagem da região a ser analisada era duplicada e colocada lado a lado na área de trabalho do software. Com ampliação adequada, e utilizando a ferramenta de contagem, na imagem à esquerda eram contados todos os núcleos de células neoplásicas; e na imagem à direita, apenas os núcleos

positivos para o marcador em questão. A sequência descrita está ilustrada nas figuras 11 a 14.

Figura 11: Duplicação da região de interesse para contagem nuclear.

Legenda: A área de interesse para contagem nuclear é copiada (comando “Control+C”) e colada ao lado da imagem original (comando “Control+V”).

Figura 12: Ampliação da imagem e contagem do número total de núcleos.

Legenda: A imagem da amostra é ampliada. Utiliza-se a Ferramenta Contagem, disponível no menu “Análise”. Todos os núcleos são pontuados e contados (seta).

Figura 13: Ampliação da imagem e contagem dos núcleos positivos.

Legenda: A cópia da imagem da amostra é processada de modo similar ao anterior, porém contando apenas os núcleos positivos para o marcador em questão, e utilizando um segundo “Grupo de Contagem” (seta).

Figura 14: Resultado final da contagem de núcleos.

Os valores observados eram transferidos para uma planilha em Excel (Microsoft Corporation, CA, EUA), formatada para o cálculo automático da percentagem dos núcleos positivos pelo total de núcleos, e também para o cálculo da média das percentagens das duas amostras de cada paciente, quando presentes. Quando apenas uma amostra estava presente, sua percentagem era considerada.

3.6 Análise Estatística

As análises foram realizadas com auxílio do programa SPSS versão 16.0 para Windows.

As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier, e a diferença entre as curvas foi demonstrada pelo teste log-rank.

Os testes t-Student e ANOVA foram empregados quando os dados exibiam distribuição normal, enquanto que os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram empregados para dados com distribuição anormal.

4 RESULTADOS

4.1 CA-IX

A expressão da CA-IX foi analisada em 95 casos válidos.

A área expressa pela CA-IX variou de zero a 68.780 pixels, com mediana de 20.924 pixels e desvio padrão de 15.902 pixels. A média foi de 23.700 pixels, com intervalo de confiança de 95% entre 20.461 e 26.939 pixels.

Quando analisamos as taxas de sobrevida dos pacientes com maior versus menor expressão da CA-IX (50% / 50%), notamos que a sobrevida global não foi influenciada pela expressão deste marcador (log rank, $p=0,790$), conforme ilustra o Gráfico 2.

A expressão imunoistoquímica da CA-IX não se relacionou com Estadio T ($p=0,179$), tamanho do tumor ($p=0,143$), grau nuclear de Fuhrman agrupado ($p=0,598$), invasão microvascular ($p=0,685$) ou invasão de gordura ($p=0,104$) (Tabela 8).

Gráfico 2: Sobrevida global pela expressão da CA-IX.

Tabela 8: Expressão da CA-IX pelas diversas variáveis do estudo.

Variável	n(%)	Mínimo	Máximo	Mediana	DP	Média	IC (95%)	Distribuição	Teste	p
Estadio T								Anormal	Kruskal-Wallis	0,179
T1	69 (72,6)	0	68.780	21.593	16.082	25.527	21.664 – 29.390			
T2	8 (8,4)	0	49.775	15.867	18.053	21.197	6.104 – 36.290			
T3	18 (19,0)	0	47.459	17.866	13.278	17.812	11.209 – 24.415			
Tamanho								Anormal	Kruskal-Wallis	0,143
< 4 cm	50 (52,6)	0	68.780	19.745	15.928	22.157	17.631 – 26.684			
>4,1 a 7 cm	27 (28,4)	6.619	61.790	27.743	15.867	28.987	22.710 – 35.264			
>7,1 cm	18 (19,0)	0	49.775	20.383	14.713	20.057	12.741 – 27.374			
Grau de Fuhrman								Anormal	Mann-Whitney	0,598
G1 e G2	62 (65,3)	0	53.536	20.130	14.517	22.738	19.051 – 26.425			
G3 e G4	33 (34,7)	0	68.780	23.281	18.327	25.509	19.010 – 32.007			
Invasão microvascular								Anormal	Mann-Whitney	0,685
Ausente	70 (73,7)	0	68.780	20.130	15.632	23.405	19.678 – 27.133			
Presente	25 (26,3)	0	61.790	23.281	16.938	24.527	17.536 – 31.519			
Invasão de gordura								Anormal	Mann-Whitney	0,104
Ausente	76 (80,0)	0	68.780	21.250	16.329	25.101	21.369 – 28.832			
Presente	19 (20,0)	0	47.459	20.137	12.965	18.100	11.851 – 24.349			

Legendas: DP: Desvio Padrão; IC: Intervalo de Confiança

4.2 EGF-R

A expressão do EGF-R foi analisada em 97 casos válidos.

A área expressa pelo EGF-R variou de zero a 117.108 pixels, com mediana de zero pixel e desvio padrão de 21.735 pixels. A média foi de 4.909 pixels, com intervalo de confiança de 95% entre 529 e 9.290 pixels.

Quando analisamos as taxas de sobrevida dos pacientes com expressão presente versus ausente do EGF-R, notamos que a sobrevida global não foi influenciada pela expressão deste marcador (log rank, $p=0,873$), conforme ilustra o Gráfico 3.

A expressão imunoistoquímica do EGF-R não se relacionou com tamanho do tumor ($p=0,530$), sendo que tumores acima de 7,1 cm foram omitidos da análise não apresentar valores válidos. Também não houve correlação com grau nuclear de Fuhrman agrupado ($p=0,196$) e invasão microvascular ($p=0,796$).

Observamos correlação entre a expressão do EGF-R e Estadio T ($p=0,049$), sendo que o Estadio T2 foi omitido da análise por não apresentar valores válidos; e com invasão de gordura ($p=0,020$), onde pacientes que apresentaram invasão de gordura exibiram maior imunoexpressão do EGF-R (Tabela 9).

Gráfico 3: Sobrevida global pela expressão do EGF-R.

Tabela 9: Expressão do EGF-R pelas diversas variáveis do estudo.

Variável	n(%)	Mínimo	Máximo	Mediana	DP	Média	IC (95%)	Distribuição	Teste	p
Estadio T								Anormal	Kruskal-Wallis	0,049
T1	71 (73,2)	0	117.108	0	15.248	2.418	0 – 6.027			
T2	8 (8,2)	0	0	0	0	0	0			
T3	18 (18,6)	0	108.857	0	38.993	16.919	0 – 36.309			
Tamanho								Anormal	Kruskal-Wallis	0,530
< 4 cm	52 (53,6)	0	117.108	0	24.648	6.015	0 – 12.877			
>4,1 a 7 cm	27 (27,8)	0	108.857	0	23.069	6.052	0 – 15.178			
>7,1 cm	18 (18,6)	0	0	0	0	0				
Grau de Fuhrman								Anormal	Mann-Whitney	0,196
G1 e G2	64 (66,0)	0	99.255	0	14.062	2.403	0 – 5.916			
G3 e G4	33 (34,0)	0	117.108	0	31.481	9.769	0 – 20.932			
Invasão microvascular								Anormal	Mann-Whitney	0,796
Ausente	72 (74,2)	0	108.857	0	21.291	4.987	0 – 9.990			
Presente	25 (25,8)	0	117.108	0	23.422	4.684	0 – 14.532			
Invasão de gordura								Anormal	Mann-Whitney	0,020
Ausente	78 (80,4)	0	117.108	0	14.555	2.200	0 – 5.482			
Presente	19 (19,6)	0	108.857	0	38.092	16.028	0 – 34.388			

Legendas: DP: Desvio Padrão; IC: Intervalo de Confiança

4.3 Ki-67

A expressão do Ki-67 foi analisada em 95 casos válidos.

A percentagem de núcleos expressando o Ki-67 variou de zero a 18,58%, com mediana de zero e desvio padrão de 4,07%. A média foi de 2,51%, com intervalo de confiança de 95% entre 1,68% e 3,34%.

Quando analisamos as taxas de sobrevida dos pacientes com expressão presente versus ausente do Ki-67, notamos que a sobrevida global não foi influenciada pela expressão deste marcador (log rank, $p=0,453$), conforme ilustra o Gráfico 4.

A expressão imunoistoquímica do Ki-67 não se relacionou com Estádio T ($p=0,243$), tamanho do tumor ($p=0,321$), grau nuclear de Fuhrman agrupado ($p=0,565$), ou invasão microvascular ($p=0,907$).

Notamos uma tendência à correlação entre a expressão do Ki-67 e invasão de gordura ($p=0,066$), onde pacientes que apresentaram invasão de gordura tenderam à maior imunoexpressão do Ki-67 (Tabela 10).

Gráfico 4: Sobrevida global pela expressão do KI-67.

Tabela 10: Expressão do Ki-67 pelas diversas variáveis do estudo.

Variável	n(%)	Mínimo	Máximo	Mediana	DP	Média	IC (95%)	Distribuição	Teste	p
Estadio T								Anormal	Kruskal-Wallis	0,243
T1	69 (72,6)	0	18,58	0	3,87	2,31	1,38 – 3,24			
T2	8 (8,4)	0	4,69	0	1,93	1,03	0 – 2,64			
T3	18 (19,0)	0	18,08	1,71	5,18	3,94	1,37 – 6,52			
Tamanho								Anormal	Kruskal-Wallis	0,321
< 4 cm	50 (52,6)	0	18,58	0	3,84	2,32	1,23 – 3,41			
>4,1 a 7 cm	27 (28,4)	0	10,21	0	2,53	1,47	0,47 – 2,47			
>7,1 cm	18 (19,0)	0	18,08	3,26	5,72	4,61	1,77 – 7,45			
Grau de Fuhrman								Anormal	Mann-Whitney	0,565
G1 e G2	62 (65,3)	0	18,58	0	3,61	2,17	1,26 – 3,09			
G3 e G4	33 (34,7)	0	18,08	0	4,81	3,15	1,44 – 4,86			
Invasão microvascular								Anormal	Mann-Whitney	0,907
Ausente	70 (73,7)	0	18,58	0	3,56	2,24	1,39 – 3,09			
Presente	25 (26,3)	0	18,08	0	5,25	3,28	1,11 – 5,44			
Invasão de gordura								Anormal	Mann-Whitney	0,066
Ausente	76 (80,0)	0	18,58	0	3,41	2,00	1,22 – 2,78			
Presente	19 (20,0)	0	18,08	2,99	5,70	4,56	1,81 – 7,31			

Legendas: DP: Desvio Padrão; IC: Intervalo de Confiança

4.4 p53

A expressão do p53 foi analisada em 95 casos válidos.

A percentagem de núcleos expressando o p53 variou de zero a 22,41%, com mediana de zero e desvio padrão de 3,76%. A média foi de 1,33%, com intervalo de confiança de 95% entre 0,56% e 2,09%.

Quando analisamos as taxas de sobrevida dos pacientes com expressão presente versus ausente do p53, notamos que a sobrevida global não foi influenciada pela expressão deste marcador (log rank, $p= 0,242$), conforme ilustra o Gráfico 5.

A expressão imunoistoquímica do p53 não se relacionou com Estadio T ($p= 0,608$), tamanho tumoral ($p=352$), grau nuclear de Fuhrman agrupado ($p= 0,470$), invasão microvascular ($p= 0,162$), ou invasão de gordura ($p= 0,669$) (Tabela 11).

Gráfico 5: Sobrevida global pela expressão do p53.

Tabela 11: Expressão do p53 pelas diversas variáveis do estudo.

Variável	n(%)	Mínimo	Máximo	Mediana	DP	Média	IC (95%)	Distribuição	Teste	p
Estadio T								Anormal	Kruskal-Wallis	0,608
T1	69 (72,6)	0	22,41	0	4,28	1,62	0,59 – 2,65			
T2	8 (8,4)	0	0,91	0	0,32	0,11	0 – 0,38			
T3	18 (18,0)	0	6,64	0	1,89	0,75	0 – 1,69			
Tamanho								Anormal	Kruskal-Wallis	0,352
< 4 cm	50 (52,6)	0	22,41	0	4,52	1,81	0,53 – 3,10			
>4,1 a 7 cm	27 (28,4)	0	15,57	0	3,27	1,03	0 – 2,32			
>7,1 cm	18 (19)	0	5,00	0	1,20	0,43	0 – 1,03			
Grau de Fuhrman								Anormal	Mann-Whitney	0,470
G1 e G2	62 (65,3)	0	22,41	0	4,17	1,61	0,55 – 2,67			
G3 e G4	33 (34,7)	0	15,57	0	2,83	0,79	0 – 1,79			
Invasão microvascular								Anormal	Mann-Whitney	0,162
Ausente	70 (73,7)	0	22,41	0	4,29	1,67	0,65 – 2,69			
Presente	25 (26,3)	0	5,00	0	1,11	0,36	0 – 0,82			
Invasão de gordura								Anormal	Mann-Whitney	0,669
Ausente	76 (80,0)	0	22,41	0	4,10	1,48	0,54 – 2,42			
Presente	19 (20,0)	0	6,64	0	1,85	0,71	0 – 1,60			

Legendas: DP: Desvio Padrão; IC: Intervalo de Confiança

4.5 PTEN

A expressão do PTEN foi analisada em 97 casos válidos.

A percentagem de núcleos expressando o PTEN variou de zero a 76,04%, com mediana de 0,40% e desvio padrão de 16,88%. A média foi de 12,50%, com intervalo de confiança de 95% entre 9,10 e 15,90%.

Quando analisamos as taxas de sobrevida dos pacientes com expressão presente versus ausente do PTEN, notamos que a sobrevida global não foi influenciada pela expressão deste marcador (log rank, $p=0,359$), conforme ilustra o Gráfico 6.

A expressão imunoistoquímica do PTEN não se relacionou com Estadio T ($p=0,332$), tamanho tumoral ($p=0,909$), grau nuclear de Fuhrman agrupado ($p=0,103$), invasão microvascular ($p=0,149$), e invasão de gordura ($p=0,470$) (Tabela 12).

Gráfico 6: Sobrevida global pela expressão do PTEN.

Tabela 12: Expressão do PTEN pelas diversas variáveis do estudo.

Variável	n(%)	Mínimo	Máximo	Mediana	DP	Média	IC (95%)	Distribuição	Teste	p
Estadio T								Anormal	Kruskal-Wallis	0,332
T1	71 (73,2)	0	76,04	3,00	17,06	12,34	8,30 – 16,38			
T2	8 (8,2)	0	29,47	0	13,40	7,23	0 – 18,43			
T3	18 (18,6)	0	45,43	6,50	17,72	15,47	6,67 – 24,28			
Tamanho								Anormal	Kruskal-Wallis	0,909
< 4 cm	52 (53,6)	0	76,04	3,04	18,53	12,91	7,75 – 18,07			
>4,1 a 7 cm	27 (27,8)	0	36,52	0	13,41	10,93	5,63 – 16,24			
>7,1 cm	18 (18,6)	0	45,43	1,67	17,27	13,67	5,08 – 22,25			
Grau de Fuhrman								Anormal	Mann-Whitney	0,103
G1 e G2	64 (66,0)	0	76,04	6,61	17,20	14,00	9,70 – 18,30			
G3 e G4	33 (34,0)	0	45,43	0	16,08	9,59	3,89 – 15,29			
Invasão microvascular								Anormal	Mann-Whitney	0,149
Ausente	72 (74,2)	0	76,04	6,26	17,22	13,81	9,77 – 17,86			
Presente	25 (25,8)	0	45,43	0	15,57	8,72	2,29 – 15,15			
Invasão de gordura								Anormal	Mann-Whitney	0,470
Ausente	78 (80,4)	0	76,04	0,20	16,78	11,98	8,19 – 15,76			
Presente	19 (19,6)	0	45,43	3,35	17,58	14,66	6,19 – 23,13			

Legendas: DP: Desvio Padrão; IC: Intervalo de Confiança

4.6 VEGF

A expressão do VEGF foi analisada em 93 casos válidos.

A área expressa pelo VEGF variou de zero a 103.429 pixels, com mediana de 41.594 pixels e desvio padrão de 24.093 pixels. A média foi de 41.445 pixels, com intervalo de confiança de 95% entre 36.483 e 46.406 pixels.

Quando analisamos as taxas de sobrevida dos pacientes com maior versus menor expressão do VEGF (50% / 50%), notamos que a sobrevida global não foi influenciada pela expressão deste marcador (log rank, $p=0,278$), conforme ilustra o Gráfico 7.

A expressão imunoistoquímica do VEGF não se relacionou com Estadio T ($p=0,733$), tamanho tumoral ($p=0,361$), grau nuclear de Fuhrman agrupado ($p=0,674$), invasão microvascular ($p=0,465$), ou invasão de gordura ($p=0,930$) (Tabela 13).

Gráfico 7: Sobrevida global pela expressão do VEGF.

Tabela 13: Expressão do VEGF pelas diversas variáveis do estudo.

Variável	n(%)	Mínimo	Máximo	Mediana	DP	Média	IC (95%)	Distribuição	Teste	p
Estadio T								Normal	ANOVA	0,733
T1	67 (72,0)	0	93.020	39.857	24.286	40.429	34.505 – 46.353			
T2	8 (8,6)	2.350	87.755	45.173	25.381	47.284	26064 – 68.503			
T3	18 (19,4)	3981	103.429	43.955	23.763	42i.631	30.814 – 54.448			
Tamanho								Normal	ANOVA	0,361
< 4 cm	49 (52,7)	0	87.672	39.297	25.042	38.819	31.626 – 46.012			
>4,1 a 7 cm	26 (28,0)	4.520	103.429	47.962	23.862	47.123	37.485 – 56.762			
>7,1 cm	18 (19,3)	2.350	87.755	39.106	21.516	40.390	29.690 – 51.090			
Grau de Fuhrman								Anormal	Mann-Whitney	0,674
G1 e G2	61 (65,6)	0	87.672	43.706	23.584	40.120	34.079 – 46.160			
G3 e G4	32 (34,4)	3.981	103.429	38.681	25.220	43.971	34.878 – 53.064			
Invasão microvascular								Normal	t-Student	0,465
Ausente	68 (73,1)	0	93.020	41.830	24.315	40.330	34.444 – 46.215			
Presente	25 (26,9)	3981	103.429	39.297	23.696	44.477	34.696 – 54.529			
Invasão de gordura								Normal	t-Student	0,930
Ausente	74 (79,6)	0	93.020	41.661	24.441	41.333	35.671 – 46.995			
Presente	19 (20,4)	3981	103.429	38.066	23.324	41.880	30.639 – 53.122			

Legendas: DP: Desvio Padrão; IC: Intervalo de Confiança

4.7 VEGF-R

A expressão do VEGF-R foi analisada em 90 casos válidos.

A área expressa pelo VEGF-R variou de 1.745 a 97.583 pixels, com mediana de 44.554 pixels e desvio padrão de 21.246 pixels. A média foi de 42.849 pixels, com intervalo de confiança de 95% entre 38.400 e 47.299 pixels.

Quando analisamos as taxas de sobrevida dos pacientes com maior versus menor expressão do VEGF-R (50% / 50%), notamos que a sobrevida global não foi influenciada pela expressão deste marcador (log rank, $p=0,858$), conforme ilustra o Gráfico 8.

A expressão imunoistoquímica do VEGF-R não se relacionou com Estadio T ($p=0,104$), tamanho tumoral ($p=0,189$), e invasão de gordura ($p=0,552$).

Notamos correlação entre a expressão do VEGF-R e o grau nuclear de Fuhrman agrupado ($p=0,022$), e também com invasão microvascular ($p=0,005$); onde pacientes que apresentaram estas variáveis positivas exibiram maior imunoexpressão do VEGF-R (Tabela 14).

Gráfico 8: Sobrevida global pela expressão do VEGF-R.

Tabela 14: Expressão do VEGF-R pelas diversas variáveis do estudo.

Variável	n(%)	Mínimo	Máximo	Mediana	DP	Média	IC (95%)	Distribuição	Teste	p
Estadio T								Normal	ANOVA	0,104
T1	63 (70,0)	1.745	97.583	41.547	20.604	40.282	35.093 – 45.471			
T2	8 (8,9)	11.866	88.128	67.474	27.022	56.431	33.940 – 79.022			
T3	19 (21,1)	3.971	85.843	48.254	19.298	45.643	36.342 – 54.944			
Tamanho								Normal	ANOVA	0,189
< 4 cm	47 (52,2)	5.269	80.212	41.547	18.616	40.084	34.618 – 45.549			
>4,1 a 7 cm	24 (26,7)	1.745	97.583	43.847	25.437	42.135	31.394 – 52.877			
>7,1 cm	19 (21,1)	11.866	88.128	49.188	20.870	50.594	40.534 – 60.653			
Grau de Fuhrman								Normal	t-Student	0,022
G1 e G2	57 (63,3)	1.745	88.128	39.525	22.477	39.208	33.244 – 45.172			
G3 e G4	33 (36,7)	3.971	97.583	49.188	17.520	49.139	42.927 – 55.351			
Invasão microvascular								Normal	t-Student	0,005
Ausente	65 (72,2)	1.745	88.128	39.525	21.204	38.966	33.712 – 44.220			
Presente	25 (27,8)	19.843	97.583	49.188	18.110	52.946	45.471 – 60.422			
Invasão de gordura								Normal	t-Student	0,552
Ausente	70 (77,8)	1.745	97.583	43.954	21.962	42.131	36.895 – 47.368			
Presente	20 (22,2)	3.971	85.843	46.376	18.825	45.363	36.553 – 54.174			

Legendas: DP: Desvio Padrão; IC: Intervalo de Confiança

Tabela 15: Tabela sinóptica dos resultados observados.

Variável	CA-IX	EGF-R	Ki-67	p53	PTEN	VEGF	VEGF-R
Estadio T	0,179	0,049	0,243	0,608	0,332	0,733	0,104
Tamanho tumoral	0,143	0,530	0,321	0,352	0,909	0,361	0,189
Grau de Fuhrman agrupado	0,598	0,196	0,565	0,470	0,103	0,674	0,022
Invasão microvascular	0,685	0,796	0,907	0,162	0,149	0,465	0,005
Invasão de gordura	0,104	0,020	0,066	0,669	0,470	0,930	0,552
Sobrevida global	0,790	0,873	0,453	0,242	0,359	0,278	0,858

Legenda: Resultados em Negrito: $P < 0,05$

5 DISCUSSÃO

Nesta série, apresentamos os resultados do estudo de sete fatores prognósticos moleculares em carcinoma renal de células claras não metastático.

Foram avaliados exclusivamente pacientes portadores da variante células claras, suprimindo os demais tipos histológicos do CR. Tal escolha se deve por ser este o tipo histológico mais comum de CR, e também aquele com comportamento biológico mais agressivo, excetuando alguns subtipos bastante raros. Ainda mais, como os mecanismos moleculares são diferentes para cada subtipo histológico, pareceu-nos coerente que ao selecionar o mais relevante deles, teríamos maior chance de sucesso no estudo de mecanismos moleculares específicos.

A casuística estudada é altamente selecionada, constituída de pacientes tratados em centros de primeira linha, todos operados por um mesmo cirurgião especialista, o que oferece grande padronização técnica; e que receberam tratamento dentro do estado da arte para esta patologia. O seguimento pós-operatório é extenso.

Em contrapartida, ressaltamos algumas limitações da nossa série.

O alto grau de seleção dos pacientes pode se constituir em viés de seleção, e não refletir a realidade observada na população geral. Nossa série é composta apenas de pacientes com doença não metastática, e formada por mais de 70% de pacientes do estadio T1, onde naturalmente, pode-se inferir que se trata de tumores com fenótipo menos agressivo. A casuística pode ter sido pequena para demonstrar os objetivos do estudo.

Com relação ao método, algumas considerações são necessárias.

A escolha do TMA como ferramenta de pesquisa é uma tendência atual na pesquisa de alto débito.^{133;135;136;141}

Com esta tecnologia é possível conseguir grande padronização no processamento dos espécimes. Com todas as amostras coradas ao mesmo tempo, com a mesma técnica e na mesma lâmina, é possível eliminar variações inerentes ao preparo individual das mesmas, além do ganho em escala e economia de recursos.^{133;136;141;142}

Uma questão de grande relevância quanto ao TMA aponta para a possibilidade de discrepâncias na análise das diminutas amostras utilizadas no método, quando comparadas com as grandes amostras provenientes dos blocos de parafina convencional. Diversas questões foram levantadas quanto a potenciais variações de amostragem, problemas na coleta dos tecidos, a eventual heterogeneidade do material em TMA quando comparado ao bloco total de parafina, e principalmente quanto à aplicabilidade e correlação clínica dos achados provenientes do TMA. Vários trabalhos recentes abordaram estas questões, alguns citados a seguir.

Torhorst et al.¹³⁶ utilizaram um modelo em câncer de mama, avaliando 553 pacientes quanto à expressão de receptores de estrógeno, de progesterona e p53. Utilizando quatro TMA independentes de 0,6 mm, versus os blocos de parafina correspondentes, constataram que com apenas uma amostra de tumor do TMA a correlação foi positiva em 95% para receptor de estrógeno, até 81% para receptor de progesterona e até 74% para p53. Entretanto, quando consideradas as doze análises de TMA (três

marcadores em quatro microsséries diferentes) a correlação clínica foi extremamente significativa para cada uma das doze comparações ($p < 0,0015$). O autor conclui que uma única amostra de cada paciente é suficiente para identificar associações relevantes.

Em outro trabalho avaliando 38 carcinomas invasivos de mama quanto à expressão de receptores de estrógeno e progesterona e Her2/neu, Camp et al.¹⁴³ testaram a redundância de duas até dez amostras de tumor compondo o TMA, e concluíram que com duas amostras a correlação com a parafina convencional chega a 95%. Outro dado interessante deste estudo é que avaliaram a imunoexpressão dos marcadores em amostras preservadas década a década entre 1932 e 1999 e concluíram que mesmo amostras preservadas por mais de 60 anos retém imunoexpressão adequada para análise.

Karlsson et al.¹⁴² avaliaram amostras de câncer de pulmão coradas para Ki-67 e p53 e testaram a correlação entre a espessura dos cilindros de TMA de 0,6 mm e 1,0 mm, encontrando correlação dos achados em 96% das amostras.

Atualmente, as vantagens do TMA tornaram-se evidentes:^{133;135;136;141;142} 1) Possibilidade de estudos com múltiplos marcadores simultaneamente, 2) Possibilidade de análise de grandes casuísticas em curto espaço de tempo, 3) Economia significativa de tecidos, devido à pequena amostra empregada, 4) Preservação das amostras originais, tornando-as disponíveis para estudos futuros, 5) Melhor padronização técnica das reações empregadas, e 6) Economia significativa

de materiais de laboratório, reagentes, anticorpos, e de pessoal técnico, permitindo ganho em escala e melhor aporte de recursos para pesquisa.

Na opinião de Torhorst¹³⁶, a tecnologia TMA será provavelmente o único meio de realizar avaliações extensas com grande número de marcadores em casuísticas de centenas ou milhares de amostras em tempo hábil e com maior economia.

A leitura das lâminas com tecnologia digital oferece padronização da etapa mais subjetiva da pesquisa: a interpretação dos espécimes. Mesmo patologistas experientes diferem subjetivamente na leitura e interpretação das lâminas, podendo causar viés importante na interpretação dos resultados.¹⁴⁴

A imunoistoquímica é um método de análise qualitativo, porém mais recentemente tem sido utilizada para análise quantitativa com auxílio de programas de análise de imagem.¹⁴⁵⁻¹⁴⁸

O emprego de tecnologia digital de análise proporciona a eliminação (ou grande redução) da subjetividade na leitura por parte do observador. A coloração de interesse pode ser objetivamente quantificada em seus componentes vermelho, verde e azul (RGB) com o histograma do programa de análise, que fornece a definição numérica da cor analisada. O programa permite ainda adequar a sensibilidade da seleção das áreas em análise.^{139;140}

O Adobe Photoshop® é um software comercialmente disponível e de baixo custo, e seu emprego torna esta metodologia reproduzível a outros centros.^{139;140;148-150}

1. CA-IX

O gene que codifica CA-IX é regulado pelo HIF-1 α , que por sua vez sofre o controle pela expressão da proteína VHL. A expressão da CA-IX é comum no CRCC, e seu papel é regular o pH intra e extracelular em condições de hipóxia. Tanto a hipóxia quanto a mutação do gene VHL causam acúmulo de HIF-1 α , com ativação de fatores proangiogênicos, dentre eles, a expressão da CA-IX.^{100;102-104;106-108}

Segundo trabalho de revisão publicado por Tunuguntla e Jorda¹⁵¹, a expressão forte em mais de 85% das células neoplásicas é um importante marcador prognóstico, indica tumores de melhor evolução e prevê a resposta a imunoterapia com interleucina 2. Apesar dos altos níveis de expressão tecidual estarem correlacionados com resposta a IL-2¹⁵², sua maior expressão no sangue periférico tem sido relacionada à menor sobrevida câncer-específica¹⁵³. Esta correlação também está demonstrada em outras neoplasias, como no carcinoma colo-retal¹⁵⁴.

A literatura está repleta de trabalhos demonstrando a utilidade da CA-IX como marcador prognóstico para CRCC, inclusive predizendo a resposta terapêutica.^{14;154-159} Entretanto, sua importância não é consensual, e o

entusiasmo inicial quanto à sua ampla utilização está dando lugar a uma visão mais austera, à medida que nichos ou subgrupos de pacientes são avaliados.

Na série de Papworth et al.¹⁶⁰, avaliando a expressão de CA-IX por imunoistoquímica e no soro, notaram que a expressão da CA-IX no soro não se correlacionou com a sobrevida de portadores de CRCC.

Leibovich et al.¹⁶¹ reportam uma série de 933 CR, sendo 730 com CRCC e com seguimento médio de dez anos, onde a CA-IX não demonstrou valor como marcador prognóstico independente na análise multivariada ajustada para diversos fatores prognósticos convencionais. A série de Leibovich et al., apresenta algumas diferenças quando comparada à nossa. Eles utilizaram a medição qualitativa da imunoexpressão; e apesar de a maioria dos pacientes serem portadores de CRCC, eles avaliaram vários tipos histológicos. A este respeito é interessante ressaltar que não foi observada diferença significativa na expressão da CA-IX entre os grupos Nx/N0 versus N1/N2 e também entre os grupos M0 versus M1. Poder-se-ia esperar que alguma diferença entre estes grupos fosse observada, a menos que os resultados estejam contaminados pelos diversos tipos histológicos, algo não mencionado no artigo original; e desta forma, os resultados desta série apontam para o papel limitado da CA-IX como fator prognóstico no CRCC não metastático. Estes autores ainda reportaram altos níveis de expressão da enzima em diversos outros órgãos (principalmente mucosa gástrica, epitélio pancreático e biliar, e base das criptas epiteliais do intestino

delgado), e portanto questionam que a CA-IX poderia ter utilidade limitada como fator prognóstico independente e alvo terapêutico no CRCC.

Shvarts et al.¹³⁰ avaliaram a expressão da CA-IX por Imunoistoquímica em 193 pacientes com CR localizado submetidos a nefrectomia e demonstraram não haver valor prognóstico independente na sua expressão.

Mais recentemente, em uma série que tem grande similaridade com a nossa, Klatte et al.¹⁶², avaliaram 170 pacientes com CRCC não metastático submetidos a tratamento cirúrgico do tumor primário, em busca de uma assinatura genética que permitisse identificar portadores de doença não metastática de alto risco. Avaliaram a expressão de vinte marcadores moleculares, dentre eles a CA-IX, porém a análise da expressão imunoistoquímica foi realizada sem o auxílio de análise digital. Nesta série, a CA-IX não apresentou expressão relevante na análise univariada ($p=0,651$).

Na nossa série, a expressão imunoistoquímica da CA-IX não se relacionou com nenhum dos parâmetros avaliados (sobrevida global, Estadio T, tamanho tumoral, grau nuclear de Fuhrman agrupado, invasão microvascular e invasão de gordura perirrenal).

Deste modo, podemos corroborar o conceito emergente na literatura indicando que a expressão da CA-IX em portadores de CRCC não metastático tem utilidade limitada.

2. EGF-R

O EGF-R é uma glicoproteína transmembrana detectada em diversos tecidos, incluindo tecido renal normal e neoplásico.¹⁶³

Este receptor recebe dois ligantes, o EGF, e também ao TGF α . O aumento na expressão do gene EGF-R e, por conseguinte na produção de sua proteína tem sido implicados no desenvolvimento de fenótipo maligno para certos tumores.¹⁶⁴

Utilizando imunoistoquímica, Lager et al.¹⁶⁵ avaliaram 67 pacientes com CR e identificaram que a maior expressão de EGF-R estava diretamente relacionada ao estadio T ($p=0,01$), tamanho tumoral ($p=0,04$), grau nuclear ($p=0,02$), e sobrevida ($p=0,05$).

Cohen et.al.,¹⁶⁶ avaliaram 44 pacientes com CRCC por imunoistoquímica, quanto à expressão de EGF-R citoplasmático e de membrana, e concluíram que o EGF-R citoplasmático se correlacionou com estadio patológico ($p=0,003$) e grau nuclear de Fuhrman ($p=0,042$), enquanto que a análise composta da expressão dos dois compartimentos do EGF-R se correlacionou apenas com estadio patológico ($p=0,045$). Nesta série, entretanto, não houve correlação deste marcador com sobrevida global.

Moch et al.¹⁶⁷ avaliaram 50 casos de CR no estadio pT3 quanto à expressão de EGF-R juntamente com Ki-67. Isoladamente, o EGF-R demonstrou apenas tendência à menor sobrevida ($p=0,08$), porém, a expressão do Ki-67 foi significativamente mais alta nos pacientes EGF-R

positivos, sugerindo que a proliferação celular é mais intensa nestes pacientes, impactando a sobrevida.

A literatura apresenta achados divergentes quanto ao valor prognóstico do EGF-R.

Yoshida et al.¹⁶⁸ avaliaram 31 pacientes com diversos tipos histológicos de CR, submetidos a cirurgia, sendo que catorze apresentaram doença metastática (N+ ou M+). Ao avaliar a expressão do EGF-R, não encontraram correlação com estadios T, estadios N, estadios M, tipo celular, ou diferenciação sarcomatosa; apenas o grau nuclear de Fuhrman apresentou significância estatística ($p < 0,05$)

Hofmockel et al.¹⁶⁹ avaliaram a expressão de vários componentes da família do EGF, mais especificamente EGF, EGF-R, TGF α , e c-erb-B2, e não encontraram correlação de nenhum deles com fatores prognósticos em CR.

Na nossa série, a expressão do EGF-R não se relacionou com a sobrevida global dos pacientes, nem tampouco com tamanho tumoral, grau nuclear de Fuhrman agrupado e invasão microvascular. Entretanto, observamos correlação entre sua expressão e Estadio T e invasão de gordura perirrenal. Portanto, nossa série está em concordância com as de Lager et al.¹⁶⁵ e Cohen et al.,¹⁶⁶ quanto à relação da expressão do EGF-R com estadios T, porém apenas esta última avaliou apenas portadores de CRCC, ao passo que todas as demais aqui revisadas avaliaram tipos histológicos diversos, e nenhuma delas o fez apenas em portadores de

doença não metastática. Ainda nesta linha, não identificamos na literatura relato sobre a correlação do EGF-R com invasão de gordura perirrenal.

Pelo menos em parte, os resultados díspares encontrados na literatura podem ser atribuídos a problemas de padronização da técnica e do tipo de anticorpo empregado.^{166;170;171} Com o crescente interesse em terapias-alvo direcionadas ao EGF-R, tais como erlotinib, gefitinib, cetuximab, ABX-EGF, PKI-166, pode-se esperar uma maior padronização das técnicas empregadas.^{166;170;172-174}

3. VEGF-R

O 'fms-like' tirosina-quinase é um receptor transmembrana da família da tirosina-quinase que foi identificado como um receptor do VEGF^{175;176}. Recentemente a expressão de receptores VEGF foi identificada em diversos tipos de células não-endoteliais (melanoma, algumas leucemias, células progenitoras da retina), sugerindo que estes receptores não são exclusivos de células endoteliais¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Alguns estudos têm demonstrado que o VEGF e seu receptor flt-1 exibem papel importante no processo de metastatização e estão associados a mau prognóstico em tumores humanos¹⁸⁰⁻¹⁸². A atenção ao VEGF-R aumentou recentemente devido surgimento de terapias-alvo direcionadas a bloquear sua ação, como o sorafenib.^{183;184}

Na nossa série, a expressão do VEGF-R não se correlacionou com a sobrevida global, Estadio T, tamanho tumoral e invasão de gordura

perirrenal. Observamos correlação entre a expressão do VEGF-R e o grau nuclear de Fuhrman agrupado e também com invasão microvascular, onde pacientes que apresentaram estas variáveis positivas exibiram maior imunoexpressão do VEGF-R.

O grau nuclear de Fuhrman se correlaciona com fenótipo tumoral mais agressivo; e a invasão microvascular está relacionada à atividade angiogênica. Estes dois parâmetros se constituem em fatores prognósticos estabelecidos, conforme demonstraram Dall'Oglio et al.^{74;75}

Nossos resultados quanto ao VEGF-R parecem indicar que o aumento de sua expressão no contexto do CRCC não metastático poderia ser indicativo de fases iniciais de aumento da atividade angiogênica e aquisição de comportamento agressivo por parte da neoplasia.

A literatura demonstra resultados conflitantes quanto ao valor prognóstico do VEGF-R.

Ljungberg et al.¹⁸⁵ avaliaram a expressão dos receptores VEGF-R 1 e 2 pela análise do mRNA em pacientes com diversos tipos histológicos de CR, incluindo portadores de doença metastática, e concluíram que sua expressão se correlacionou com estadio tumoral e sobrevida global, porém não eram fatores prognósticos independentes, a despeito do tipo histológico avaliado.

Alamdari et al.¹⁸⁶ avaliaram 120 pacientes com CR metastático quanto à expressão de VEGF, VEGF-R, fator de crescimento de fibroblastos (bFGF) e eritropoietina, e concluíram que nenhum destes marcadores apresentou

valor prognóstico independente. Nesta série, apenas o estado de performance, número de sítios metastáticos e invasão capsular constituíram-se fatores prognósticos independentes.

Minardi et al.¹⁸⁷ avaliaram 48 pacientes portadores exclusivamente de CRCC estágio pT1 submetidos a nefrectomia parcial. Analisaram a expressão de VEGF, VEGF-R e densidade de microvasos, e concluiu que nenhum destes marcadores demonstrou ser fator prognóstico independente. Apenas o grau nuclear de Fuhrman apresentou valor prognóstico independente.

Na já mencionada série de Klatte et al.¹⁶², onde avaliaram apenas CRCC não metastático, foi possível construir um nomograma para prever sobrevida livre de doença utilizando fatores prognósticos moleculares. A expressão do Ki-67, p53, VEGF-R1 endotelial e epitelial, e do VEGF-D epitelial demonstraram ser fatores prognósticos independentes, e a assinatura molecular baseada exclusivamente nestes marcadores apresentou uma acurácia preditiva de 0,838. Para comparação, a acurácia preditiva do estadió T isolado é de 0,746, e do UCLA UISS é de 0,780.⁸²⁻⁸⁴ Elegantemente, os autores avançaram o conceito de predição combinando os fatores clínicos, patológicos e moleculares e construíram um nomograma cuja acurácia preditiva atingiu 0,904

4. Ki-67

Proliferação celular é um dos processos biológicos mais fundamentais devido ao seu papel no crescimento e manutenção da homeostase tecidual.

Ki-67 (MIB-1) é um anticorpo marcador da fração de crescimento, que identifica a proporção das células em proliferação. Identifica um antígeno expresso nas fases G1, S e G2 do ciclo celular.^{119;120}

Na nossa série, a expressão imunoistoquímica do Ki-67 não se relacionou com a sobrevida global dos pacientes, nem com os demais parâmetros avaliados: estadio T, tamanho tumoral, grau nuclear de Fuhrman agrupado, invasão microvascular e invasão de gordura perirrenal. Observamos apenas uma tendência à correlação com invasão de gordura perirrenal ($p=0,066$), provavelmente limitada pelo tamanho da amostra.

Nossa série é composta exclusivamente por tumores não metastáticos, e portanto é razoável supor que são tumores de fenótipo menos agressivo, e portanto apresentem menor índice de proliferação celular.

Por outro lado, na já mencionada série de Klatte et al.¹⁶² o Ki-67 foi identificado como fator prognóstico independente ($p=0,016$). Nesta mesma linha de conclusão está a série de Tollefson et al.¹²⁴, que avaliaram 741 pacientes portadores exclusivamente de CRCC, onde cerca de 90% eram pN0 ou pM0, e concluíram que a expressão de Ki-67 é um fator prognóstico independente, a despeito da presença ou ausência de necrose tecidual. O mesmo foi demonstrado por Rioux-Leclercq et al.¹⁸⁸ que avaliaram 73 pacientes com CRCC e demonstram que o KI-67 apresentou valor prognóstico independente.

O valor prognóstico do Ki-67 foi demonstrado em outras séries.

Kankuri et al.¹²² avaliaram a expressão do p53 e Ki-67 em 117 pacientes, onde 101 (86%) eram CRCC, e que foram divididos em três grupos: sem metástases, com metástases primárias ou com metástases tardias. A expressão dos marcadores demonstrou estar relacionada com fenótipo tumoral agressivo, e pior sobrevida nos pacientes com metástases. Quando ambos os marcadores estavam positivos, observaram maior probabilidade de doença metastática.

Yildiz et al.¹²³, demonstraram que a associação entre invasão microvascular, expressão de VEGF e Ki-67 eram fortes indicadores de prognóstico desfavorável.

Em contrapartida, Phuoc et al.¹⁸⁹ avaliaram 119 pacientes com CRCC utilizando Imunoistoquímica, e concluíram que o Ki-67 não demonstrou valor como fator prognóstico independente. Achado similar foi publicado por Shvarts et al.¹³⁰ em portadores de CR localizado, e por de Kim, et al.⁹³, em avaliando 150 pacientes com CR metastático.

5. p53

O gene p53 é o gene supressor de tumor mais frequentemente mutado nos tumores humanos^{125;126}. O p53 codifica uma proteína homônima que funciona como fator transcripcional, e cujos níveis celulares aumentam dramaticamente em resposta à lesão do DNA. Este aumento dos níveis

celulares de p53 faz com que a proteína p53 imponha uma parada no ciclo celular em G1, um fenômeno que permite à célula reparar o DNA defeituoso antes de iniciar a fase S do ciclo celular. A função deficiente do p53 não interrompe a fase G1, possibilitando a replicação de DNA defeituoso, uma situação que aumenta o número de mutações e instabilidade genômica, aumentando a chance de transformação neoplásica.¹⁹⁰

Na nossa série, a expressão imunoistoquímica do p53 não se relacionou com a sobrevida global dos pacientes, nem com os demais parâmetros avaliados: estadió T, tamanho tumoral, grau nuclear de Fuhrman agrupado, invasão microvascular e invasão de gordura perirrenal.

A literatura se mostra extensa em relação ao p53, porém não há unanimidade de resultados.

Klatte et al.¹⁶² identificaram o p53 como fator prognóstico independente ($p=0,005$) em CRCC não metastático. O mesmo foi reportado por Phuoc et al.¹⁸⁹

Shvarts et al.¹³⁰ avaliaram a expressão do p53 por Imunoistoquímica em 193 pacientes com CR localizado submetidos a nefrectomia e demonstraram que sua expressão se constituiu em fator prognóstico independente para predizer recidiva da doença.

Zigeuner et al.¹³¹ avaliaram a expressão do p53 nos diferentes tipos histológicos de CR e concluíram que apesar de o CRCC ser o que menos expressa p53, este foi o único subtipo histológico onde o marcador apresentou valor prognóstico.

Contrariamente, Rioux-Leclercq, et. al¹⁸⁸ demonstram que o p53 apresentou valor prognóstico apenas na análise univariada, não sendo validado como fator prognóstico independente.

Bot et al.,¹⁹¹ avaliaram 100 pacientes com tumores primários e não encontraram correlação da expressão do p53 com sobrevida, bem como nenhum dos demais parâmetros analisados (estadio, grau nuclear, tipo celular, arquitetura tumoral).

6. PTEN

O gene PTEN (ou MMAC1 ou TEP1), é um gene supressor de tumor localizado no cromossomo 13q23.3, e que está implicado em grande número de neoplasias.^{114;116} A caracterização da proteína PTEN demonstrou ser uma fosfatase que modula vias de transdução de sinal envolvendo mensageiros lipídicos secundários^{192;193}. Há indícios de que pelo menos parte de seu papel é regular atividade serina/treonina quinase AKT/PKB, influenciando a sinalização de sobrevida celular.^{115;116}

Na nossa série, a expressão imunoistoquímica do PTEN não se relacionou com a sobrevida global dos pacientes, nem com os demais parâmetros avaliados: estadio T, tamanho tumoral, grau nuclear de Fuhrman agrupado, invasão microvascular e invasão de gordura perirrenal.

Na literatura, o papel do PTEN como fator prognóstico é favorável, porem não consensual.

Pantuck et al.¹³ realizaram uma elegante análise de diversas proteínas que compõem a via do mTOR. Em 375 pacientes com CR, avaliaram a expressão imunoistoquímica de PTEN, pAkt, p27 e pS6 e correlacionaram com sobrevida e fatores prognósticos convencionais. Seus resultados indicaram que o PTEN, pAkt, pS6, juntamente com estágio T, N e M, e estado de performance ECOG, foram fatores prognósticos independentes para sobrevida livre de doença. Achado similar quanto ao PTEN foi visto na série de Kim, et al.⁹³

Em contrapartida, na série de Shvarts et. al.¹³⁰, avaliando o PTEN não demonstrou valor prognóstico. O mesmo foi observado por Klatte et al.¹⁶² ao avaliar apenas CRCC não metastático.

7. VEGF

O VEGF tem sido alvo de investigações quanto a sua ação na resposta neovascular de tumores sólidos.^{194;195} A expressão do VEGF é induzida pela baixa tensão de oxigênio em diversas circunstâncias fisiopatológicas¹⁹⁶, e está bem estabelecido que o HIF-1 é um mediador chave da resposta à hipóxia¹⁹⁷.

Estudos recentes determinaram o papel crucial do gene VHL na resposta hipóxica dependente do HIF-1¹⁹⁸. Grande parte da atividade mitogênica das células de CR expressando mutação do VHL foi neutralizada por anticorpos contra o VEGF.¹⁹⁹

Na nossa série, a expressão imunoistoquímica do VEGF não se relacionou com a sobrevida global dos pacientes, nem com os demais parâmetros avaliados: estadió T, tamanho tumoral, grau nuclear de Fuhrman agrupado, invasão microvascular e invasão de gordura perirrenal.

Em estudos clínicos, a expressão VEGF como fator prognóstico mostrou ser controversa.

Yildiz et al.¹²³ avaliaram 48 espécimes de CR quanto à expressão de VEGF e Ki-67 juntamente com fatores prognósticos tradicionais. Concluíram que a expressão de VEGF e invasão microvascular eram fatores prognósticos independentes na análise multivariada. Nos pacientes sem invasão microvascular a expressão de VEGF foi significativa; e nos pacientes com invasão microvascular a expressão do Ki-67 foi significativa. Desta forma, a associação entre invasão microvascular, expressão de VEGF e Ki-67 demonstrou ser forte indicador de prognóstico desfavorável.

Bensalah et al.²⁰⁰ avaliaram 78 pacientes com tumores pT3a e pT3b, e concluíram que a expressão do VEGF não se relaciona com a progressão dos tumores pT3 para invasão de veia cava, porém, demonstrou ser um fator prognóstico independente em pacientes com CR estadió pT3.

No estudo de Alamdari et al.¹⁸⁶ com 120 pacientes portadores de CR metastático submetidos à nefrectomia a expressão de VEGF não demonstrou valor prognóstico em análise multivariada, entretanto apresentou correlação com melhor sobrevida em pacientes com melhor *performance status*.

Ljungberg et al.¹⁸⁵ avaliaram a expressão do VEGF e seus receptores através de mRNA em 84 casos de CRCC, e concluíram que sua expressão se correlaciona com estadios tumoral e com sobrevida, entretanto, não se constituíram em fatores prognósticos independentes.

No estudo de Phuoc et al.¹⁸⁹ a expressão do VEGF não demonstrou valor prognóstico independente.

Como considerações finais, temos que o CR é uma doença multifacetada e desafiadora. A incorporação de marcadores moleculares está se acumulando na literatura de CR, principalmente em doença metastática. A análise conjunta de sete marcadores moleculares não apresentou conclusões definitivas em portadores de doença não metastática. Entretanto, a expressão de dois marcadores – EGF-R e VEGF-R – mostrou utilidade como potencial preditor de risco desfavorável nestes pacientes. Nosso estudo contribui adicionando uma pequena peça neste grande mosaico.

6 CONCLUSÕES

Quanto ao Objetivo Primário:

Os marcadores moleculares avaliados (CA-IX, EGF-R, Ki-67, p53, PTEN, VEGF, VEGF-R) não se correlacionam com a sobrevida global dos portadores de CRCC não metastático.

Quanto ao Objetivo Secundário:

A expressão da CA-IX não se correlacionou com nenhum dos fatores prognósticos avaliados nesta coorte de pacientes.

A expressão do EGF-R se correlacionou com estadió T e com invasão da gordura perirrenal.

A expressão do VEGF-R se correlacionou com grau nuclear de Fuhrman agrupado e com invasão microvascular.

A expressão dos demais marcadores – Ki-67, p53, PTEN e VEGF – não se correlacionaram com nenhum dos fatores prognósticos avaliados nesta coorte de pacientes.

7 ANEXOS

7.1 Anexo A: Parecer da CAPPesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23/04/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0203/08**, intitulado: **"ESTUDO DE FATORES PROGNÓSTICOS MOLECULARES NO CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS PELA TÉCNICA DE TISSUE MICROARRAY"** apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisadores Responsáveis: **Dr. Marcos Francisco Dall'Oglio e Prof. Dr. Miguel Srougi**

Pesquisador (a) Executante: **Marcelo Zerati**

CAPPesq, 25 de Abril de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

7.2 Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA "Estudo de fatores prognósticos moleculares no carcinoma renal de células claras pela técnica de *tissue microarray*"

PESQUISADOR: Dr. Marcos Francisco Dall'Oglio.....

CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº ..84.860.

UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Clínica Urológica.....

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	☒	RISCO MÍNIMO	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO		RISCO MAIOR	

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : ...24 meses..

Anexo I

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa

Este é um formulário-padrão de consentimento orientado para trabalhos de pesquisa. Estas informações tem por objetivo orienta-lo(a) sobre um projeto de pesquisa sobre câncer renal a ser iniciado, e obter sua permissão para utilizar o material obtido na sua cirurgia de nefrectomia radical (retirada do rim acometido pelo câncer renal) para estudo.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais

O projeto de pesquisa prevê apenas a utilização do material que já foi obtido por nefrectomia radical – amostras do tumor renal – que foram mantidos conservados para que sejam analisados por meio de métodos de laboratório. Será analisada a forma como alguns genes influenciam o grau de agressividade do tumor renal. Todo o material necessário para o estudo já está disponível, e você não precisará se submeter a nenhum exame e a nenhum procedimento. **Basta que você CONSINTA que o material em arquivo seja utilizado e que seu prontuário médico seja revisado pelo pesquisador.** Todos os exames realizados fazem parte da rotina do hospital, e não há nenhum que esteja em fase experimental

3. Desconfortos e riscos esperados

Não há desconfortos ou riscos esperados

4. Benefícios que poderão ser obtidos

Você não terá nenhum benefício direto relacionado à pesquisa. Somente contribuirá para que novos conhecimentos existam relacionados ao seu tumor, podendo gerar benefícios futuros a outros indivíduos portadores da mesma doença.

Os benefícios específicos deste estudo são os seguintes:

- Possibilidade de identificar quais tipos de câncer renal são mais ou menos agressivos
- Possibilidade de identificar quais tipos de câncer renal respondem melhor ou pior a tratamentos imunológicos, como a interleucina dois
- Possibilidade de identificar quais pacientes submetidos nefrectomia radical irão precisar de tratamentos adicionais, e se estes tratamentos serão necessários mais precocemente

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Não há procedimentos adicionais relacionados a este estudo

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

Fica esclarecido que como participante nesta pesquisa, você poderá ter acesso a qualquer tempo às informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas, bastando solicitar ao médico responsável.

2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

Fica esclarecido que como participante nesta pesquisa, voce tem total liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem prejuízo à continuidade da sua assistência médica no HCFMUSP

3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

Fica esclarecido que nenhuma informação do prontuário médico sobre a sua saúde será tornada pública, estando protegidas em sigilo, privacidade e em caráter confidencial. Seu prontuário médico poderá ser divulgado apenas com sua autorização expressa e por escrito.

4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

A pesquisa em questão não envolve qualquer risco à sua saúde, entretanto fica esclarecido que voce terá disponibilidade de assistência médica pelo Sistema Único de Saúde no HCFMUSP caso julgue necessário.

5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

A pesquisa em questão não envolve qualquer risco de dano à sua saúde, e não oferece indenização. Sua participação é espontânea e gratuita.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Orientador da Pesquisa	Dr. Marcos Dall'Oglio
Cargo / Função	Médico Urologista, Chefe do Departamento de Uro-Oncologia
Unidade HCFMUSP	Divisão de Clínica Urológica
Fone:	(11)3069-8080 ou 3069-8086
Pesquisador / CRM	Dr. Marcelo Zerati CRM 34010 (Minas Gerais)
Cargo / Função	Médico Urologista
Unidade HCFMUSP	Clínica Urológica
Endereço / Bairro	Rua Bernardo Cupertino 365, Bairro Martins
Cidade / CEP	Uberlândia, MG 38400-444
Telefones	(34) 3234-0591, 9153-3000
E-mail	marcelozerati@gmail.com

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Não há informações complementares relativas ao estudo em questão.

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 2007.

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO
(Resolução Conselho Nacional de Saúde 196, de 10 outubro 1996)

1. Este termo conterá o registro das informações que o pesquisador fornecerá ao sujeito da pesquisa, em linguagem clara e acessível, evitando-se vocábulos técnicos não compatíveis com o grau de conhecimento do interlocutor.
2. A avaliação do grau de risco deve ser minuciosa, levando em conta qualquer possibilidade de intervenção e de dano à integridade física do sujeito da pesquisa.
3. O formulário poderá ser preenchido em letra de forma legível, datilografia ou meios eletrônicos.
4. Este termo deverá ser elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e outra deverá ser juntada ao prontuário do paciente.
5. A via do Termo de Consentimento Pós-Informação submetida à análise da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa -CAPPesq deverá ser idêntica àquela que será fornecida ao sujeito da pesquisa.

8 REFERÊNCIAS

1. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 1999 Jan;49(1):8-31, 1.
 2. Novick A, Campbell SC. Renal Tumors. In: Walsh PC, Retik AB, Darracott Vaughan Jr. E, et al., editors. *Campbell's Urology*. 8 ed. Philadelphia: Saunders; 2002. p. 2672-731.
 3. Linehan WM, Bates SE, Yang JC. Cancers of the genitourinary system: cancers of the kidney. In: De Vita JVT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 7 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 1139-68.
 4. Delahunt B. Advances and controversies in grading and staging of renal cell carcinoma. *Mod Pathol* 2009;22(S2):S24-S36.
 5. Linehan WM, Walther MM, Zbar B. The genetic basis of cancer of the kidney. *J.Urol.* 2003 Dec;170(6 Pt 1):2163-72.
 6. Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N, Cindolo L, Ficarra V, Zisman A, De La TA, Tostain J, Artibani W, Abbou CC, et al. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience. *J.Clin.Oncol.* 2005 Apr 20;23(12):2763-71.
 7. Pavlovich CP, Schmidt LS. Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer* 2004;4:381-93.
 8. Atkins M, Regan M, McDermott D, Mier J, Stanbridge E, Youmans A, Febbo P, Upton M, Lechpammer M, Signoretti S. Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome of interleukin 2 therapy for renal cancer. *Clin Cancer Res* 2005 May 15;11(10):3714-21.
 9. Jones J, Libermann TA. Genomics of Renal Cell Cancer: The Biology Behind and the Therapy Ahead. *Clin Cancer Res* 2007 Jan 15;13(2):685s-692.
 10. Linehan WM, Grubb RL, Coleman JA, Zbar B, Walther MM. The genetic basis of cancer of kidney cancer: implications for gene-specific clinical management. *BJU.Int.* 2005 Mar;95 Suppl 2:2-7.
 11. Patard JJ, Rioux-Leclercq N, Fergelot P. Understanding the importance of smart drugs in renal cell carcinoma. *Eur.Urol.* 2006 Apr;49(4):633-43.
 12. Rini BI. Current status and future directions of molecular markers in renal cell carcinoma. *Curr.Opin.Urol.* 2006 Sep;16(5):332-6.
 13. Pantuck AJ, Seligson DB, Klatte T, Yu H, Leppert JT, Moore L, O'Toole T, Gibbons J, Beldegrun AS, Figlin RA. Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for
-

- molecular patient selection for targeted therapy. *Cancer* 2007 Jun 1;109(11):2257-67.
14. Pantuck AJ, Zeng G, Belldegrun AS, Figlin RA. Pathobiology, prognosis, and targeted therapy for renal cell carcinoma: exploiting the hypoxia-induced pathway. *Clin Cancer Res* 2003 Oct 15;9(13):4641-52.
 15. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J.Immunol.* 1984 Oct;133(4):1710-5.
 16. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992 Jul 2;358(6381):15-6.
 17. Pasche B. A new strategy in the war on renal cell cancer: hitting multiple targets with limited collateral damage. *JAMA* 2006 Jun 7;295(21):2537-8.
 18. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010 Sep;60(5):277-300.
 19. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur.J Cancer* 2010 Mar;46(4):765-81.
 20. Instituto Nacional do Câncer.Ministério da Saúde. Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: 2009.<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf>, acessado em 12-02/2008.
 21. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. The Globocan Project 2010 [cited 2010 Sep 30].
 22. Chow WH, Devesa SS, Warren JL, Fraumeni JF, Jr. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA* 1999 May 5;281(17):1628-31.
 23. Pantuck AJ, Zisman A, Belldegrun AS. The changing natural history of renal cell carcinoma. *J Urol.* 2001 Nov;166(5):1611-23.
 24. Kane CJ, Mallin K, Ritchey J, Cooperberg MR, Carroll PR. Renal cell cancer stage migration: analysis of the National Cancer Data Base. *Cancer* 2008 Jul 1;113(1):78-83.
 25. Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol* 2010 May;7(5):245-57.
-

-
26. US Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Smoking: A report of the Surgeon General (Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health). Atlanta, GA: 2004.
 27. Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int.J.Cancer* 2005 Mar 10;114(1):101-8.
 28. Choi MY, Jee SH, Sull JW, Nam CM. The effect of hypertension on the risk for kidney cancer in Korean men. *Kidney Int.* 2005 Feb;67(2):647-52.
 29. Flaherty KT, Fuchs CS, Colditz GA, Stampfer MJ, Speizer FE, Willett WC, Curhan GC. A prospective study of body mass index, hypertension, and smoking and the risk of renal cell carcinoma (United States). *Cancer Causes Control* 2005 Nov;16(9):1099-106.
 30. Nicodemus KK, Sweeney C, Folsom AR. Evaluation of dietary, medical and lifestyle risk factors for incident kidney cancer in postmenopausal women. *Int.J.Cancer* 2004 Jan 1;108(1):115-21.
 31. Vatten LJ, Trichopoulos D, Holmen J, Nilsen TI. Blood pressure and renal cancer risk: the HUNT Study in Norway. *Br.J.Cancer* 2007 Jul 2;97(1):112-4.
 32. Weikert S, Boeing H, Pischon T, Weikert C, Olsen A, Tjønneland A, Overvad K, Becker N, Linseisen J, Trichopoulou A, et al. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am.J.Epidemiol.* 2008 Feb 15;167(4):438-46.
 33. Kaelin WG. Von Hippel-Lindau disease. *Annu.Rev Pathol.* 2007;2:145-73.
 34. Clague J, Lin J, Cassidy A, Matin S, Tannir NM, Tamboli P, Wood CG, Wu X. Family history and risk of renal cell carcinoma: results from a case-control study and systematic meta-analysis. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2009 Mar;18(3):801-7.
 35. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008 Feb 16;371(9612):569-78.
 36. Reeves GK, Pirie K, Beral V, Green J, Spencer E, Bull D. Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *BMJ* 2007 Dec 1;335(7630):1134.
-

37. Pischon T, Lahmann PH, Boeing H, Tjonneland A, Halkjaer J, Overvad K, Klipstein-Grobusch K, Linseisen J, Becker N, Trichopoulou A, et al. Body size and risk of renal cell carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int.J.Cancer* 2006 Feb 1;118(3):728-38.
 38. Oh SW, Yoon YS, Shin SA. Effects of excess weight on cancer incidences depending on cancer sites and histologic findings among men: Korea National Health Insurance Corporation Study. *J.Clin.Oncol.* 2005 Jul 20;23(21):4742-54.
 39. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2004 Aug;4(8):579-91.
 40. Adams KF, Leitzmann MF, Albanes D, Kipnis V, Moore SC, Schatzkin A, Chow WH. Body size and renal cell cancer incidence in a large US cohort study. *Am.J.Epidemiol.* 2008 Aug 1;168(3):268-77.
 41. Setiawan VW, Stram DO, Nomura AM, Kolonel LN, Henderson BE. Risk factors for renal cell cancer: the multiethnic cohort. *Am.J.Epidemiol.* 2007 Oct 15;166(8):932-40.
 42. Vajdic CM, McDonald SP, McCredie MR, van Leeuwen MT, Stewart JH, Law M, Chapman JR, Webster AC, Kaldor JM, Grulich AE. Cancer incidence before and after kidney transplantation. *JAMA* 2006 Dec 20;296(23):2823-31.
 43. Stewart JH, Vajdic CM, van Leeuwen MT, Amin J, Webster AC, Chapman JR, McDonald SP, Grulich AE, McCredie MR. The pattern of excess cancer in dialysis and transplantation. *Nephrol.Dial.Transplant.* 2009 Oct;24(10):3225-31.
 44. Matson MA, Cohen EP. Acquired cystic kidney disease: occurrence, prevalence, and renal cancers. *Medicine (Baltimore)* 1990 Jul;69(4):217-26.
 45. Klatte T, Seitz C, Waldert M, de MM, Kikic Z, Bohmig GA, Haitel A, Schmidbauer J, Marberger M, Remzi M. Features and outcomes of renal cell carcinoma of native kidneys in renal transplant recipients. *BJU.Int.* 2010 May;105(9):1260-5.
 46. Bonsib SM. Renal cystic diseases and renal neoplasms: a mini-review. *Clin.J.Am.Soc.Nephrol.* 2009 Dec;4(12):1998-2007.
 47. Molokwu JC, Prizment AE, Folsom AR. Reproductive characteristics and risk of kidney cancer: Iowa Women's Health Study. *Maturitas* 2007 Oct 20;58(2):156-63.
-

-
48. Lee JE, Hankinson SE, Cho E. Reproductive factors and risk of renal cell cancer: the Nurses' Health Study. *Am.J.Epidemiol.* 2009 May 15;169(10):1243-50.
 49. Lambe M, Lindblad P, Wu J, Remler R, Hsieh CC. Pregnancy and risk of renal cell cancer: a population-based study in Sweden. *Br.J.Cancer* 2002 May 6;86(9):1425-9.
 50. Kabat GC, Silvera SA, Miller AB, Rohan TE. A cohort study of reproductive and hormonal factors and renal cell cancer risk in women. *Br.J.Cancer* 2007 Mar 12;96(5):845-9.
 51. Scott CS, Chiu WA. Trichloroethylene cancer epidemiology: a consideration of select issues. *Environ.Health Perspect.* 2006 Sep;114(9):1471-8.
 52. Kelsh MA, Alexander DD, Mink PJ, Mandel JH. Occupational trichloroethylene exposure and kidney cancer: a meta-analysis. *Epidemiology* 2010 Jan;21(1):95-102.
 53. Chiu WA, Caldwell JC, Keshava N, Scott CS. Key scientific issues in the health risk assessment of trichloroethylene. *Environ.Health Perspect.* 2006 Sep;114(9):1445-9.
 54. van Dijk BA, Schouten LJ, Kiemeny LA, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Relation of height, body mass, energy intake, and physical activity to risk of renal cell carcinoma: results from the Netherlands Cohort Study. *Am.J.Epidemiol.* 2004 Dec 15;160(12):1159-67.
 55. Moore SC, Chow WH, Schatzkin A, Adams KF, Park Y, Ballard-Barbash R, Hollenbeck A, Leitzmann MF. Physical activity during adulthood and adolescence in relation to renal cell cancer. *Am.J.Epidemiol.* 2008 Jul 15;168(2):149-57.
 56. Mahabir S, Leitzmann MF, Pietinen P, Albanes D, Virtamo J, Taylor PR. Physical activity and renal cell cancer risk in a cohort of male smokers. *Int.J.Cancer* 2004 Feb 10;108(4):600-5.
 57. Mahabir S, Leitzmann MF, Virtanen MJ, Virtamo J, Pietinen P, Albanes D, Taylor PR. Prospective study of alcohol drinking and renal cell cancer risk in a cohort of finnish male smokers. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2005 Jan;14(1):170-5.
 58. Lee JE, Giovannucci E, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Willett WC, Curhan GC. Total fluid intake and use of individual beverages and risk of renal cell cancer in two large cohorts. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2006 Jun;15(6):1204-11.
-

59. Flocks RH, Kadesky MC. Malignant neoplasms of the kidney; an analysis of 353 patients followed five years or more. *J Urol.* 1958 Feb;79(2):196-201.
 60. Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol.* 1969 Mar;101(3):297-301.
 61. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am.J Surg.Pathol.* 1982 Oct;6(7):655-63.
 62. Moch H, Artibani W, Delahunt B, Ficarra V, Knuechel R, Montorsi F, Patard J, Stief CG, Sulser T, Wild PJ. Reassessing the Current UICC/AJCC TNM Staging for Renal Cell Carcinoma. *Eur.Urol.* 2009 Oct;56(4):583-752.
 63. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti IA. *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th Edition. 67h ed. New York, NY: Springer; 2010.
 64. Greene FL, Page DL, Fleming ID. *AJCC Cancer Staging Manual*, 6th Edition. 6th ed. New York, NY: Springer; 2002.
 65. Eggener SE, Yossepowitch O, Pettus JA, Snyder ME, Motzer RJ, Russo P. Renal cell carcinoma recurrence after nephrectomy for localized disease: predicting survival from time of recurrence. *J.Clin.Oncol.* 2006 Jul 1;24(19):3101-6.
 66. Dall'Oglio MF, Srougi M, Nesrallah L, Leite KM, Hering F, Bomfim AC, Sanudo A. [Must the TNM staging of the renal cell carcinoma be modified again?]. *Rev.Assoc.Med.Bras.* 2003 Jan;49(1):86-90.
 67. Bonsib SM. T2 clear cell renal cell carcinoma is a rare entity: a study of 120 clear cell renal cell carcinomas. *J.Urol.* 2005 Oct;174(4 Pt 1):1199-202.
 68. Fenner A. Kidney cancer: Are we overclassifying renal cancer? *Nat Rev Urol* 2010 Dec;7(12):646.
 69. Waalkes S, Becker F, Schrader AJ, Janssen M, Wegener G, Merseburger AS, Schrader M, Hofmann R, Stockle M, Kuczyk MA. Is There a Need to Further Subclassify pT2 Renal Cell Cancers as Implemented by the Revised 7th TNM Version? *Eur.Urol* 2010 Oct 15.
 70. Martinez-Salamanca JI, Huang WC, Millan I, Bertini R, Bianco FJ, Carballido JA, Ciancio G, Hernandez C, Herranz F, Haferkamp A, et al. Prognostic Impact of the 2009 UICC/AJCC TNM Staging System for Renal Cell Carcinoma with Venous Extension. *Eur.Urol* 2010 Oct 13.
-

-
71. Thompson RH, Leibovich BC, Cheville JC, Webster WS, Lohse CM, Kwon ED, Frank I, Zincke H, Blute ML. Is renal sinus fat invasion the same as perinephric fat invasion for pT3a renal cell carcinoma? *J.Urol.* 2005 Oct;174(4 Pt 1):1218-21.
 72. Giuliani L, Martorana G, Giberti C, Pescatore D, Magnani G. Results of radical nephrectomy with extensive lymphadenectomy for renal cell carcinoma. *J.Urol.* 1983 Oct;130(4):664-8.
 73. Goncalves PD, Srougi M, Dall'lio MF, Leite KR, Ortiz V, Hering F. Low clinical stage renal cell carcinoma: relevance of microvascular tumor invasion as a prognostic parameter. *J.Urol.* 2004 Aug;172(2):470-4.
 74. Dall'Oglio MF, Ribeiro-Filho LA, Antunes AA, Crippa A, Nesrallah L, Goncalves PD, Leite KR, Srougi M. Microvascular tumor invasion, tumor size and Fuhrman grade: a pathological triad for prognostic evaluation of renal cell carcinoma. *J Urol.* 2007 Aug;178(2):425-8.
 75. Dall'Oglio MF, Antunes AA, Sarkis AS, Crippa A, Leite KR, Lucon AM, Srougi M. Microvascular tumour invasion in renal cell carcinoma: the most important prognostic factor. *BJU.Int.* 2007 Sep;100(3):552-5.
 76. Dall'Oglio M, Srougi M, Ortiz V, Nesrallah L, Goncalves PD, Leite KM, Hering F. [Incidental and symptomatic kidney cancer: pathological features and survival]. *Rev Assoc.Med.Bras.* 2004 Jan;50(1):27-31.
 77. Dall'Oglio MF, Srougi M, Goncalves PD, Leite K, Nesrallah L, Hering F. Incidental and symptomatic renal tumors: impact on patient survival. *Sao Paulo Med.J.* 2002 Nov 1;120(6):165-9.
 78. Lee CT, Katz J, Fearn PA, Russo P. Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information. *Urol Oncol* 2002 Jul;7(4):135-40.
 79. Tsui KH, Shvarts O, Smith RB, Figlin R, de Kernion JB, Belldegrun A. Renal cell carcinoma: prognostic significance of incidentally detected tumors. *J Urol* 2000 Feb;163(2):426-30.
 80. Kim HL, Belldegrun AS, Freitas DG, Bui MH, Han KR, Dorey FJ, Figlin RA. Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis. *J Urol* 2003 Nov;170(5):1742-6.
 81. Kim HL, Han KR, Zisman A, Figlin RA, Belldegrun AS. Cachexia-like symptoms predict a worse prognosis in localized t1 renal cell carcinoma. *J Urol* 2004 May;171(5):1810-3.
 82. Zisman A, Pantuck AJ, Dorey F, Said JW, Shvarts O, Quintana D, Gitlitz BJ, deKernion JB, Figlin RA, Belldegrun AS. Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. *J Clin Oncol* 2001 Mar 15;19(6):1649-57.
-

83. Han KR, Bleumer I, Pantuck AJ, Kim HL, Dorey FJ, Janzen NK, Zisman A, Dinney CP, Wood CG, Swanson DA, et al. Validation of an integrated staging system toward improved prognostication of patients with localized renal cell carcinoma in an international population. *J Urol*. 2003 Dec;170(6 Pt 1):2221-4.
 84. Patard JJ, Kim HL, Lam JS, Dorey FJ, Pantuck AJ, Zisman A, Ficarra V, Han KR, Cindolo L, De La TA, et al. Use of the University of California Los Angeles integrated staging system to predict survival in renal cell carcinoma: an international multicenter study. *J Clin Oncol* 2004 Aug 15;22(16):3316-22.
 85. Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2002 Jan 1;20(1):289-96.
 86. Wikipedia. Nomograma 2010 [cited 2010 Sep 19] Available from <http://es.wikipedia.org/wiki/Nomograma>.
 87. Kattan MW, Reuter V, Motzer RJ, Katz J, Russo P. A postoperative prognostic nomogram for renal cell carcinoma. *J Urol* 2001 Jul;166(1):63-7.
 88. Frank I, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score. *J Urol* 2002 Dec;168(6):2395-400.
 89. Thompson RH, Leibovich BC, Lohse CM, Cheville JC, Zincke H, Blute ML, Frank I. Dynamic outcome prediction in patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy: the D-SSIGN score. *J Urol* 2007 Feb;177(2):477-80.
 90. Sorbellini M, Kattan MW, Snyder ME, Reuter V, Motzer R, Goetzl M, McKiernan J, Russo P. A postoperative prognostic nomogram predicting recurrence for patients with conventional clear cell renal cell carcinoma. *J Urol* 2005 Jan;173(1):48-51.
 91. Kanao K, Mizuno R, Kikuchi E, Miyajima A, Nakagawa K, Ohigashi T, Nakashima J, Oya M. Preoperative prognostic nomogram (probability table) for renal cell carcinoma based on TNM classification. *J Urol* 2009 Feb;181(2):480-5.
 92. Kim HL, Seligson D, Liu X, Janzen N, Bui MH, Yu H, Shi T, Figlin RA, Horvath S, Belldegrun AS. Using protein expressions to predict survival in clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004 Aug 15;10(16):5464-71.
-

-
93. Kim HL, Seligson D, Liu X, Janzen N, Bui MH, Yu H, Shi T, Belldegrun AS, Horvath S, Figlin RA. Using tumor markers to predict the survival of patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol.* 2005 May;173(5):1496-501.
 94. True L, Grignon DJ. Pathology of Renal Cancers. In: Raghavan D, Scher HI, Leibel SA, et al., editors. *Principles and Practice of Genitourinary Oncology.* 1 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 799-811.
 95. Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993 May 28;260:1317-20.
 96. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1971 Apr;68(4):820-3.
 97. Lubensky IA, Gnarr JR, Bertheau P, Walther MM, Linehan WM, Zhuang Z. Allelic deletions of the VHL gene detected in multiple microscopic clear cell renal lesions in von Hippel-Lindau disease patients. *Am.J.Pathol.* 1996 Dec;149(6):2089-94.
 98. Zander R, Vaupel P. Proposal for using a standardized terminology on oxygen transport to tissue. *Adv.Exp.Med Biol.* 1985;191:965-70.
 99. Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl.Cancer Inst.* 2001 Feb 21;93(4):266-76.
 100. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002 Jan;2(1):38-47.
 101. Vaupel P, Hockel M. Blood supply, oxygenation status and metabolic micromilieu of breast cancers: characterization and therapeutic relevance. *Int.J Oncol* 2000 Nov;17(5):869-79.
 102. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol.Med.* 2002;8(4 Suppl):S62-S67.
 103. Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res.* 2000 Mar 15;60(6):1541-5.
 104. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 1999 Nov 15;59(22):5830-5.
-

105. Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol.* 2000 Jul;2(7):423-7.
106. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999 May 20;399(6733):271-5.
107. Maranchie JK, Vasselli JR, Riss J, Bonifacino JS, Linehan WM, Klausner RD. The contribution of VHL substrate binding and HIF1-alpha to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 2002 Apr;1(3):247-55.
108. Gnarr JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, Latif F, Liu S, Chen F, Duh FM, et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet.* 1994 May;7(1):85-90.
109. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N.Engl.J Med.* 2005 Dec 8;353(23):2477-90.
110. Kondo K, Klco J, Nakamura E, Lechpammer M, Kaelin WG, Jr. Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell* 2002 Apr;1(3):237-46.
111. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot.(Tokyo)* 1975 Oct;28(10):721-6.
112. Sabers CJ, Martin MM, Brunn GJ, Williams JM, Dumont FJ, Wiederrecht G, Abraham RT. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol.Chem.* 1995 Jan 13;270(2):815-22.
113. Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2005 Dec;17(6):596-603.
114. Kondo K, Yao M, Kobayashi K, Ota S, Yoshida M, Kaneko S, Baba M, Sakai N, Kishida T, Kawakami S, et al. PTEN/MMAC1/TEP1 mutations in human primary renal-cell carcinomas and renal carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 2001 Jan 15;91(2):219-24.
115. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol.Chem.* 1998 May 29;273(22):13375-8.
116. Maehama T, Dixon JE. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol.* 1999 Apr;9(4):125-8.

-
117. Brenner W, Farber G, Herget T, Lehr HA, Hengstler JG, Thuroff JW. Loss of tumor suppressor protein PTEN during renal carcinogenesis. *Int J Cancer* 2002 May 1;99(1):53-7.
 118. van Diest PJ, Brugal G, Baak JP. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J.Clin.Pathol.* 1998 Oct;51(10):716-24.
 119. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J.Pathol.* 1992 Dec;168(4):357-63.
 120. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int.J.Cancer* 1983 Jan 15;31(1):13-20.
 121. Baak JP. Mitosis counting in tumors. *Hum.Pathol.* 1990 Jul;21(7):683-5.
 122. Kankuri M, Soderstrom KO, Pelliniemi TT, Vahlberg T, Pyrhonen S, Salminen E. The association of immunoreactive p53 and Ki-67 with T-stage, grade, occurrence of metastases and survival in renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2006 Sep;26(5B):3825-33.
 123. Yildiz E, Gokce G, Kilicarslan H, Ayan S, Goze OF, Gultekin EY. Prognostic value of the expression of Ki-67, CD44 and vascular endothelial growth factor, and microvessel invasion, in renal cell carcinoma. *BJU Int* 2004 May;93(7):1087-93.
 124. Tollefson MK, Thompson RH, Sheinin Y, Lohse CM, Cheville JC, Leibovich BC, Kwon ED. Ki-67 and coagulative tumor necrosis are independent predictors of poor outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma and not surrogates for each other. *Cancer* 2007 Aug 15;110(4):783-90.
 125. Levine AJ. The tumor suppressor genes. *Annu.Rev.Biochem.* 1993;62:623-51.
 126. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N.Engl.J.Med.* 1993 Oct 28;329(18):1318-27.
 127. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994 Jul 15;265(5170):346-55.
 128. Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ, Jr. A mammalian cell cycle
-

- checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 1992 Nov 13;71(4):587-97.
129. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992 Jul 2;358(6381):15-6.
130. Shvarts O, Seligson D, Lam J, Shi T, Horvath S, Figlin R, Belldegrun A, Pantuck AJ. p53 is an independent predictor of tumor recurrence and progression after nephrectomy in patients with localized renal cell carcinoma. *J Urol*. 2005 Mar;173(3):725-8.
131. Zigeuner R, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Langner C. Value of p53 as a prognostic marker in histologic subtypes of renal cell carcinoma: a systematic analysis of primary and metastatic tumor tissue. *Urology* 2004 Apr;63(4):651-5.
132. Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest* 1986 Aug;55(2):244-8.
133. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat.Med.* 1998 Jul;4(7):844-7.
134. Liou LS, Shi T, Duan ZH, Sadhukhan P, Der SD, Novick AA, Hissong J, Skacel M, Almasan A, DiDonato JA. Microarray gene expression profiling and analysis in renal cell carcinoma. *BMC.Urol.* 2004 Jun 22;4:9.
135. Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, Buerger H. Demystified ... Tissue microarray technology. *Mol Pathol* 2003 Aug 1;56(4):198-204.
136. Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Kochli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, et al. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am.J Pathol.* 2001 Dec;159(6):2249-56.
137. Pontes JrJ. Estudo de moléculas de adesão no tumor primário e em metástases ósseas e linfonodais de pacientes com câncer de próstata [Tese] [Doutorado São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.
138. Fedor HL, De Marzo AM. Practical Methods for Tissue Microarray Construction. In: Su GH, editor. *Pancreatic Cancer: Methods and Protocols*. New Jersey: Humana Press; 2005. p. 89-101.
139. Lehr HA, Mankoff DA, Corwin D, Santeusanio G, Gown AM. Application of photoshop-based image analysis to quantification of

- hormone receptor expression in breast cancer. *J Histochem.Cytochem.* 1997 Nov;45(11):1559-65.
140. Lehr HA, van der Loos CM, Teeling P, Gown AM. Complete chromogen separation and analysis in double immunohistochemical stains using Photoshop-based image analysis. *J Histochem.Cytochem.* 1999 Jan;47(1):119-26.
141. Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue Microarray Profiling of Cancer Specimens and Cell Lines: Opportunities and Limitations. *Lab Invest* 0 AD;81(10):1331-8.
142. Karlsson C, Bodin L, Piehl-Aulin K, Karlsson MG. Tissue Microarray Validation: A Methodologic Study with Special Reference to Lung Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2009 Jul;18(7):2014-21.
143. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of Tissue Microarray Technology in Breast Carcinoma. *Lab Invest* 2000;80(12):1943-9.
144. Gavrielides MA, Gallas BD, Lenz P, Badano A, Hewitt SM. Observer variability in the interpretation of HER2/neu immunohistochemical expression with unaided and computer-aided digital microscopy. *Arch.Pathol.Lab Med.* 2011 Feb;135(2):233-42.
145. Kohlberger PD, Obermair A, Sliutz G, Heinzl H, Koelbl H, Breiteneker G, Gitsch G, Kainz C. Quantitative immunohistochemistry of factor VIII-related antigen in breast carcinoma: a comparison of computer-assisted image analysis with established counting methods. *Am.J Clin Pathol.* 1996 Jun;105(6):705-10.
146. Goto M, Nagatomo Y, Hasui K, Yamanaka H, Murashima S, Sato E. Chromaticity analysis of immunostained tumor specimens. *Pathol.Res.Pract.* 1992 Jun;188(4-5):433-7.
147. Masmoudi H, Hewitt SM, Petrick N, Myers KJ, Gavrielides MA. Automated quantitative assessment of HER-2/neu immunohistochemical expression in breast cancer. *IEEE Trans.Med.Imaging* 2009 Jun;28(6):916-25.
148. Mofidi R, Walsh R, Ridgway PF, Crotty T, McDermott EW, Keaveny TV, Duffy MJ, Hill AD, O'Higgins N. Objective measurement of breast cancer oestrogen receptor status through digital image analysis. *Eur.J Surg.Oncol* 2003 Feb;29(1):20-4.
149. Brunner J, Krummenauer F, Lehr HA. Quantification of video-taped images in microcirculation research using inexpensive imaging software (Adobe Photoshop). *Microcirculation.* 2000 Apr;7(2):103-7.

150. Saad HA, Terry MA, Shamie N, Chen ES, Friend DF, Holiman JD, Stoeger C. An easy and inexpensive method for quantitative analysis of endothelial damage by using vital dye staining and Adobe Photoshop software. *Cornea* 2008 Aug;27(7):818-24.
 151. Tunuguntla HS, Jorda M. Diagnostic and prognostic molecular markers in renal cell carcinoma. *J Urol.* 2008 Jun;179(6):2096-102.
 152. Atkins MB, Choueiri TK, Cho D, Regan M, Signoretti S. Treatment selection for patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 2009 May 15;115(10 Suppl):2327-33.
 153. Gilbert SM, Whitson JM, Mansukhani M, Buttyan R, Benson MC, Olsson CA, Sawczuk IS, McKiernan JM. Detection of carbonic anhydrase-9 gene expression in peripheral blood cells predicts risk of disease recurrence in patients with renal cortical tumors. *Urology* 2006 May;67(5):942-5.
 154. Hong YS, Cho HJ, Kim SY, Jung KH, Park JW, Choi HS, Oh JH, Kim BC, Sohn DK, Kim DY, et al. Carbonic anhydrase 9 is a predictive marker of survival benefit from lower dose of bevacizumab in patients with previously treated metastatic colorectal cancer. *BMC.Cancer* 2009 Jul 21;9(1):246.
 155. Bui MH, Seligson D, Han KR, Pantuck AJ, Dorey FJ, Huang Y, Horvath S, Leibovich BC, Chopra S, Liao SY, et al. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res* 2003 Feb;9(2):802-11.
 156. Bui MH, Visapaa H, Seligson D, Kim H, Han KR, Huang Y, Horvath S, Stanbridge EJ, Palotie A, Figlin RA, et al. Prognostic value of carbonic anhydrase IX and Ki67 as predictors of survival for renal clear cell carcinoma. *J Urol.* 2004 Jun;171(6 Pt 1):2461-6.
 157. Pastorekova S, Zavada J. Carbonic anhydrase IX (CA IX) as a potential target for cancer therapy. *Cancer Therapy* 2004 Jul;2:245-62.
 158. Sandlund J, Oosterwijk E, Grankvist K, Oosterwijk-Wakka J, Ljungberg B, Rasmuson T. Prognostic impact of carbonic anhydrase IX expression in human renal cell carcinoma. *BJU Int* 2007 Sep;100(3):556-60.
 159. Soyupak B, Erdogan S, Ergin M, Seydaoglu G, Kuzgunbay B, Tansug Z. CA9 expression as a prognostic factor in renal clear cell carcinoma. *Urol.Int* 2005;74(1):68-73.
-

-
160. Papworth K, Sandlund J, Grankvist K, Ljungberg B, Rasmuson T. Soluble carbonic anhydrase IX is not an independent prognostic factor in human renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2010 Jul;30(7):2953-7.
 161. Leibovich BC, Sheinin Y, Lohse CM, Thompson RH, Cheville JC, Zavada J, Kwon ED. Carbonic anhydrase IX is not an independent predictor of outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2007 Oct 20;25(30):4757-64.
 162. Klatte T, Seligson DB, LaRochelle J, Shuch B, Said JW, Riggs SB, Zomorodian N, Kabbinavar FF, Pantuck AJ, Belldegrun AS. Molecular signatures of localized clear cell renal cell carcinoma to predict disease-free survival after nephrectomy. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2009 Mar;18(3):894-900.
 163. Sargent ER, Gomella LG, Belldegrun A, Linehan WM, Kasid A. Epidermal growth factor receptor gene expression in normal human kidney and renal cell carcinoma. *J Urol* 1989 Nov;142(5):1364-8.
 164. Uhlman DL, Nguyen P, Manivel JC, Zhang G, Hagen K, Fraley E, Aeppli D, Niehans GA. Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in papillary and nonpapillary renal cell carcinoma: correlation with metastatic behavior and prognosis. *Clin Cancer Res.* 1995 Aug;1(8):913-20.
 165. Lager DJ, Slagel DD, Palechek PL. The expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in renal cell carcinoma. *Mod.Pathol.* 1994 Jun;7(5):544-8.
 166. Cohen D, Lane B, Jin T, Magi-Galluzzi C, Finke J, Rini BI, Bukowski RM, Zhou M. The prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in clear-cell renal cell carcinoma: a call for standardized methods for immunohistochemical evaluation. *Clin Genitourin.Cancer* 2007 Mar;5(4):264-70.
 167. Moch H, Sauter G, Buchholz N, Gasser TC, Bubendorf L, Waldman FM, Mihatsch MJ. Epidermal growth factor receptor expression is associated with rapid tumor cell proliferation in renal cell carcinoma. *Hum.Pathol.* 1997 Nov;28(11):1255-9.
 168. Yoshida K, Tosaka A, Takeuchi S, Kobayashi N. Epidermal growth factor receptor content in human renal cell carcinomas. *Cancer* 1994 Apr 1;73(7):1913-8.
 169. Hofmockel G, Riess S, Bassukas ID, Dammrich J. Epidermal growth factor family and renal cell carcinoma: expression and prognostic impact. *Eur.Urol* 1997;31(4):478-84.
-

170. Langner C, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Zigeuner R. Are heterogenous results of EGFR immunoreactivity in renal cell carcinoma related to non-standardised criteria for staining evaluation? *J Clin Pathol.* 2004 Jul;57(7):773-5.
 171. Pu YS, Huang CY, Kuo YZ, Kang WY, Liu GY, Huang AM, Yu HJ, Lai MK, Huang SP, Wu WJ, et al. Characterization of membranous and cytoplasmic EGFR expression in human normal renal cortex and renal cell carcinoma. *J Biomed.Sci.* 2009;16:82.
 172. Weber KL, Doucet M, Price JE, Baker C, Kim SJ, Fidler IJ. Blockade of epidermal growth factor receptor signaling leads to inhibition of renal cell carcinoma growth in the bone of nude mice. *Cancer Res* 2003 Jun 1;63(11):2940-7.
 173. Staehler M, Rohrmann K, Haseke N, Stief CG, Siebels M. Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Curr.Drug Targets.* 2005 Nov;6(7):835-46.
 174. Stadler WM. Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Cancer* 2005 Dec 1;104(11):2323-33.
 175. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 1990 Apr;5(4):519-24.
 176. de VC, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992 Feb 21;255(5047):989-91.
 177. Yang X, Cepko CL. Flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF), is expressed by retinal progenitor cells. *J.Neurosci.* 1996 Oct 1;16(19):6089-99.
 178. Shibuya M, Seetharam L, Ishii Y, Sawano A, Gotoh N, Matsushime H, Yamaguchi S. Possible involvement of VEGF-FLT tyrosine kinase receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Princess Takamatsu Symp.* 1994;24:162-70.
 179. Gitay-Goren H, Halaban R, Neufeld G. Human melanoma cells but not normal melanocytes express vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1993 Feb 15;190(3):702-8.
 180. Takanami I, Tanaka F, Hashizume T, Kodaira S. Vascular endothelial growth factor and its receptor correlate with angiogenesis and survival in pulmonary adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 1997 Jul;17(4A):2811-4.
-

-
181. Xie B, Tam NN, Tsao SW, Wong YC. Co-expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (flk-1 and flt-1) in hormone-induced mammary cancer in the Noble rat. *Br.J.Cancer* 1999 Dec;81(8):1335-43.
 182. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am.J.Pathol.* 1995 May;146(5):1029-39.
 183. Reuter CW, Morgan MA, Grunwald V, Herrmann TR, Burchardt M, Ganser A. Targeting vascular endothelial growth factor (VEGF)-receptor-signaling in renal cell carcinoma. *World J.Urol.* 2007 Mar;25(1):59-72.
 184. Unnithan J, Rini BI. The role of targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma. *ScientificWorldJournal.* 2007;7:800-7.
 185. Ljungberg BJ, Jacobsen J, Rudolfsson SH, Lindh G, Grankvist K, Rasmuson T. Different vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-receptor 1 and -2 mRNA expression profiles between clear cell and papillary renal cell carcinoma. *BJU.Int.* 2006 Sep;98(3):661-7.
 186. Alamdari FI, Rasmuson T, Grankvist K, Ljungberg B. Angiogenesis and other markers for prediction of survival in metastatic renal cell carcinoma. *Scand.J Urol.Nephrol.* 2007;41(1):5-9.
 187. Minardi D, Lucarini G, Mazzucchelli R, Milanese G, Natali D, Galosi AB, Montironi R, Biagini G, Muzzonigro G. Prognostic role of Fuhrman grade and vascular endothelial growth factor in pT1a clear cell carcinoma in partial nephrectomy specimens. *J Urol.* 2005 Oct;174(4 Pt 1):1208-12.
 188. Rioux-Leclercq N, Turlin B, Bansard J, Patard J, Manunta A, Moulinoux JP, Guille F, Ramee MP, Lobel B. Value of immunohistochemical Ki-67 and p53 determinations as predictive factors of outcome in renal cell carcinoma. *Urology* 2000 Apr;55(4):501-5.
 189. Phuoc NB, Ehara H, Gotoh T, Nakano M, Yokoi S, Deguchi T, Hirose Y. Immunohistochemical analysis with multiple antibodies in search of prognostic markers for clear cell renal cell carcinoma. *Urology* 2007 May;69(5):843-8.
 190. Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ, Jr. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 1992 Nov 13;71(4):587-97.
-

191. Bot FJ, Godschalk JC, Krishnadath KK, van der Kwast TH, Bosman FT. Prognostic factors in renal-cell carcinoma: immunohistochemical detection of p53 protein versus clinico-pathological parameters. *Int J Cancer* 1994 Jun 1;57(5):634-7.
 192. Parsons R, Simpson L. PTEN and cancer. *Methods Mol.Biol.* 2003;222:147-66.
 193. Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp.Cell Res* 2001 Mar 10;264(1):29-41.
 194. Ferrara N, vis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr.Rev* 1997 Feb;18(1):4-25.
 195. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002 Oct;2(10):795-803.
 196. Dor Y, Porat R, Keshet E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am.J Physiol Cell Physiol* 2001 Jun;280(6):C1367-C1374.
 197. Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem.Pharmacol.* 2002 Sep;64(5-6):993-8.
 198. Mole DR, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing. *IUBMB.Life* 2001 Jul;52(1-2):43-7.
 199. Siemeister G, Weindel K, Mohrs K, Barleon B, Martiny-Baron G, Marme D. Reversion of deregulated expression of vascular endothelial growth factor in human renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Cancer Res* 1996 May 15;56(10):2299-301.
 200. Bensalah K, Rioux-Leclercq N, Vincendeau S, Guille F, Patard JJ. [Is tumour expression of VEGF associated with venous invasion and survival in pT3 renal cell carcinoma?]. *Prog.Urol.* 2007 Apr;17(2):189-93.
-

9 APÊNDICES

9.2 Apêndice 2: Folha de Dados da Casuística

pac_nº	registro	reg_ap	TMA	sexo	idade	lado	data_SO	tam_cm	tipo_cel	grau	gordur	gangl	microv	estadio	FECH SEG	STATUS
82	26595	104/966	A01	1	47	3	5/2/2004	2,8	1,0	2	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
51	26020	101/903	A03	1	53	2	9/9/2003	4,5	1,0	2	0	0	0	t1b	01/01/08	vivo sed
64	26452	104/911	A05	2	23	2	3/2/2004	2,0	1,0	2	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
91	28070	114/926	A07	2	35	2	4/5/2005	8,0	1,0	2	1	0	1	T3a	01/01/08	vivo sed
224	22876	102/828	A09	1	71	2	21/10/2003	2,6	1,0	2	0	0	0	t1a	22/06/07	obito doença
10	29058	121/982	A11	2	67	2	18/2/2006	7,0	1,0	3	1	0	1	t3a	01/01/08	vivo sed
17	26081	101/739	A13	1	56	2	2/9/2003	3,0	1,0	1	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
194	8108	11843	A15	1	54	2	18/8/1988	9,0	1,0	2	0	0	0	t2	01/01/08	vivo sed
44	26910	106/680	B01	1	44	2	24/4/2004	3,0	1,0	3	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
204	25555	110/670	B03	1	55	2	21/3/2003	11,0	1,0	3	1	0	1	t3b	01/01/08	vivo sed
93	27184	108/656	B05	1	42	2	22/7/2004	1,5	1,0	1	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
136	27823	113/681	B07	2	69	1	8/3/2005	2,6	1,0	2	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
119	26888	106/572	B09	1	41	2	20/4/2004	2,5	1,0	1	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
70	26597	109/568	B11	2	75	2	31/8/2004	6,2	1,0	4	0	0	1	t1b	01/03/05	obito outras causas
192	28304	116/567	B13	1	44	1	9/7/2005	3,6	1,0	3	0	0	0	T1a	01/01/08	vivo sed
109	28837	sl120/500	B15	1	49	2	15/12/2005	4,5	1,0	1	0	0	0	T1b	01/05/06	obito outras causas
190	26227	102/419	C01	1	61	1	2/10/2003	4,3	1,0	3	0	0	1	t1b	01/01/08	vivo sed
12	26380	103/393	C03	1	50	2	17/11/2003	2,3	1,0	3	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
193	24844	111/407	C05	1	54	1	23/11/2004	2,5	1,0	2	0	0	0	T1a	01/01/08	vivo sed
15	28256	116/419	C07	1	62	2	5/7/2005	1,2	1,0	1	0	0	0	T1a	01/01/08	vivo sed

115	6272	103/348	C09	1	77	2	14/11/2003	1,2	1,0	3	0	0	1	t1a	01/01/08	vivo sed
54	11672	sl110-317	C11	1	81	2	4/10/2004	3,0	1,0	2	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
215	27259	110/240	C13	1	47	2	30/9/2004	10,0	1,0	4	1	0	1	t3b	01/01/08	vivo sed
74	28998	122/246	C15	2	79	1	4/3/2006	2,5	1,0	1	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
164	28773	120/235	D01	1	60	2	6/12/2005	3,5	1,0	3	1	0	1	t3a	01/01/08	vivo sed
177	27072	108/211	D03	1	72	2	1/7/2004	3,4	1,0	1	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
46	28189	116/163	D05	1	65	1	23/6/2005	2,4	1,0	2	0	0	0	T1a	01/01/08	vivo sed
149	25787	100/039	D07	2	73	2	13/6/2003	4,0	1,0	2	0	0	0	t1b	01/01/08	vivo sed
34	28600	118/843	D09	1	52	2	13/10/2005	3,0	1,0	3	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
31	8371	12426	D11	1	76	2	4/11/1988	3,5	1,0	2	0	0	0	t1a	01/09/99	obito outras causas
117	11737	23452	D13	1	57	1	10/12/1991	8,5	1,0	2	1	0	1	t3a	01/01/08	vivo sed
32	12788	sl27714	E01	1	81	2	19/11/1992	10,5	1,0	2	1	0	0	t3a	01/01/08	vivo sed
29		29866	E03	2	73	2	6/5/1993	2,5	1,0	2	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
200	13752	31177	E05	2	39	1	21/8/1993	7,0	1,0	1	0	0	0	t1b	01/01/08	vivo sed
147	14127	32717	E07	2	74	1	15/12/1993	3,2	1,0	3	1	0	0	t3a	01/01/08	vivo sed
170	14690	35723	E09	1	80	1	4/7/1994	4,2	1,0	1	1	0	0	t3a	01/01/08	vivo sed
56	16104	41577	E11	1	66	3	13/5/1995	12,0	1,0	2	0	0	0	t2	01/01/08	vivo sed
154	17631	47516	E13	1	69	1	15/5/1996	7,5	1,0	3	1	0	1	t3a	01/01/08	vivo sed
203	18003	48831	F01	1	62	2	27/7/1996	4,0	1,0	3	0	0	1	t1b	01/01/08	vivo sed
39	18065	sl49198	F03	1	53	2	15/8/1996	4,0	1,0	2	0	0	0	t1b	01/01/08	vivo sed
142	16718	49405	F05	1	68	2	24/8/1996	6,5	1,0	1	0	0	0	t1b	01/01/08	vivo sed
146	18263	50045	F07	2	63	2	1/10/1996	3,5	1,0	2	1	0	0	t3a	01/01/08	vivo sed
95	18658	52375	F09	1	35	1	20/2/1997	3,7	1,0	1	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
63	7338	55012	F11	1	66	2	8/7/1997	2,0	1,0	1	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed

80	19253	55071	F13	1	67	1	10/7/1997	10,0	1,0	2	0	0	0	t2	01/01/08	vivo sed
24	19548	56154	F15	1	48	2	2/9/1997	3,0	1,0	2	1	0	0	t3a	01/01/08	vivo sed
196	19470	56196	G01	1	59	2	4/9/1997	1,8	1,0	2	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
79	19686	56960	G03	2	50	1	9/10/1997	5,6	1,0	1	0	0	0	t1b	01/01/08	vivo sed
2	19818	57882	G05	1	48	1	22/11/1997	2,0	1,0	1	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
162	20007	58824	G07	1	76	1	17/1/1998	4,0	1,0	3	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
113	20142	59627	G09	1	70	1	5/3/1998	5,4	1,0	2	0	0	0	t1b	01/01/08	vivo sed
151	hbp	61554	G11	2	68	1	5/9/1995	6,5	1,0	3	0	0	1	t1b	01/01/08	vivo sed
169	20566	61992	G13	1	76	1	4/7/1998	6,5	1,0	4	0	0	0	t1b	01/01/08	vivo sed
40	20741	sl62921	G15	1	48	2	20/8/1998	4,0	1,0	1	0	0	0	t1b	01/01/08	vivo sed
191	21075	65221	H01	2	9	2	5/12/1998	6,5	1,0	3	1	0	0	t3a	01/01/08	vivo sed
218	21161	65447	H03	2	50	2	15/12/1998	6,5	1,0	3	0	0	0	t1b	01/01/08	vivo sed
126	hbp	65621	H05	1	75	1	20/12/1995	3,5	1,0	1	0	0	0	t1b	01/06/03	obito doença
18	21231	65879	H07	1	51	1	14/1/1999	3,3	1,0	1	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
125	21452	66939	H09	2	32	2	9/3/1999	5,0	1,0	1	0	0	0	t1b	01/01/08	vivo sed
153	21436	66959	H11	1	64	1	9/3/1999	6,5	1,0	3	0	0	1	t2b	01/10/05	obito doença
223	21569	67723	H13	2	63	2	13/4/1999	5,0	1,0	2	0	0	0	t1b	01/01/08	vivo sed
144	hbp	67849	H15	2	67	1	27/2/1996	4,5	1,0	2	0	0	0	t1b	01/01/08	vivo sed
1	21538	68853	I01	1	67	2	8/6/1999	2,5	1,0	1	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
198	21803	69472	I03	1	68	2	3/7/1999	6,0	1,0	3	0	0	1	t1b	01/03/05	obito doença
132	22117	sl71700	I05	1	49	1	9/10/1999	5,5	1,0	2	0	0	0	t1b	01/01/08	vivo sed
52	22473	74505	I07	1	73	1	22/2/2000	19,5	1,0	2	1	0	0	t3a	01/07/06	obito doença
152	22634	75593	I09	2	71	1	8/4/2000	6,0	1,0	3	0	0	1	t1b	01/01/08	vivo sed
86	22698	75873	I11	1	62	2	22/4/2000	10,5	1,0	2	1	0	1	t3a	01/01/08	vivo sed

140	22891	77539	I15	1	51	2	5/7/2000	7,0	1,0	4	0	0	1	t2	01/05/01	obito doença
213	22928	77881	J01	1	49	1	20/7/2000	7,5	1,0	2	0	0	0	t2	01/01/08	vivo sed
71	23080	79101	J03	1	67	1	9/9/2000	7,5	1,0	3	0	0	1	t2	01/01/08	vivo sed
14	23093	IH/8877	J05	1	52	1	12/9/2000	3,0	1,0	2	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
179	23242	80529	J07	1	60	1	8/11/2000	3,5	1,0	3	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
220	23255	81035	J09	1	63	2	29/11/2000	3,5	1,0	2	0	0	0	t1a	01/01/04	obito doença
145	23342	81457	J11	2	66	1	14/12/2000	3,0	1,0	2	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
166	23432	82209	J13	1	39	2	18/1/2001	2,5	1,0	1	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
89	hbp	81885	L01	1	46	2	10/3/1997	3,2	1,0	1	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
72	11482	84438	L03	1	70	1	11/4/2001	1,5	1,0	1	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
137	hbp	85091	L05	2	67	1	9/6/1997	6,0	1,0	3	0	0	0	t1b	01/12/03	obito outras causas
38	23732	85556	L07	1	65	1	25/5/2001	1,5	1,0	1	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
175	hbp	86431	L09	2	58	1	15/7/1997	4,5	1,0	3	0	0	1	t1b	01/01/08	vivo sed
123	23908	87104	L11	1	62	2	14/8/2001	3,0	1,0	4	0	0	1	t1a	01/01/08	vivo sed
143	hbp	87189	L13	2	60	2	5/8/1997	9,5	1,0	1	0	0	0	t2	01/12/00	obito doença
68	23244	87402	L15	2	74	2	28/8/2001	1,2	1,0	1	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
94	24331	89543	M01	1	44	2	10/12/2001	12,0	1,0	3	1	0	1	t3a	01/01/08	vivo sed
65	24398	90050	M03	1	51	1	12/1/2002	2,0	1,0	1	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
183	24556	sl91170	M05	1	48	2	12/3/2002	6,5	1,0	2	0	0	0	t1b	01/01/08	vivo sed
212	hbp	91630	M07	1	50	2	28/11/1997	4,2	1,0	2	0	0	0	t1b	01/01/08	vivo sed
163	17553	92885	M09	1	64	2	11/6/2002	8,0	1,0	2	1	0	0	t3a	01/01/08	vivo sed
75	24955	93818	M11	2	52	2	30/7/2002	3,0	1,0	1	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
178	9668	94146	M13	1	57	1	15/8/2002	2,2	1,0	3	0	0	0	t1a	01/01/08	obito outras causas
225	25020	94398	M15	2	68	1	27/8/2002	9,0	1,0	3	1	0	1	t3b	24/01/04	obito outras causas

210	25274	95827	N01	1	52	2	28/11/2002	10,5	1,0	2	1	0	1	t3b	01/01/08	vivo sed
26	25218	96086	N03	1	60	3	15/11/2002	6,0	1,0	2	0	0	0	t1b	01/01/08	vivo sed
161	10964	96934	N05	1	72	2	7/1/2003	8,0	1,0	3	1	0	1	t1a	01/01/08	vivo sed
199	hbp	97116	N07	1	76	2	14/5/1998	3,5	1,0	2	0	0	0	t1a	01/01/08	vivo sed
77	24944	97297	N09	2	61	1	27/7/2002	3,8	1,0	4	0	0	1	t1a	01/01/08	vivo sed
195	25464	97720	N11	1	53	1	18/2/2003	3,2	1,0	4	0	0	1	t1a	17/11/03	obito doença
207	25544	98774	N13	1	68	1	10/4/2003	5,0	1,0	2	0	0	0	t1b	01/01/08	vivo sed

9.3 Apêndice 3: Folha de Dados dos Resultados Observados

pac_nº	registro	reg_ap	TMA	p53	PTEN	KI-67	CAIX	EGF-R	VEGF	VEGF-R
				MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA
				%	%	%	pixels	pixels	pixels	pixels
82	26595	104/966	A01	0,00%	0,00%	0,00%	18718	0	0	18286
51	26020	101/903	A03	x	x	x	x	x	x	x
64	26452	104/911	A05	0,00%	0,00%	3,45%	50392	0	7227	5269
91	28070	114/926	A07	0,00%	3,35%	10,96%	0	0	31158	44499
224	22876	102/828	A09	0,00%	0,00%	0,00%	32617	0	6919	15648
10	29058	121/982	A11	0,00%	0,00%	0,00%	8572	0	103429	67003
17	26081	101/739	A13	0,00%	3,00%	0,00%	4903	0	82677	5767
194	8108	11843	A15	0,00%	0,00%	0,00%	2634	0	31072	72568
44	26910	106/680	B01	0,00%	0,00%	0,00%	68780	0	41594	41547
204	25555	110/670	B03	0,59%	45,43%	9,35%	12933	0	31635	49188
93	27184	108/656	B05	1,51%	3,09%	6,64%	21262	0	5503	17783
136	27823	113/681	B07	0,71%	0,00%	4,76%	14599	0	72135	60251
119	26888	106/572	B09	1,50%	0,00%	5,87%	20336	0	22460	x
70	26597	109/568	B11	0,00%	0,40%	4,66%	21593	0	35464	97583
192	28304	116/567	B13	0,00%	0,00%	3,84%	14008	0	x	56978
109	28837	sl120/500	B15	0,00%	25,77%	5,32%	14198	0	x	43299
190	26227	102/419	C01	0,00%	0,00%	3,19%	27743	0	16753	58501
12	26380	103/393	C03	0,57%	36,02%	7,42%	8616	0	72803	51586
193	24844	111/407	C05	0,00%	9,80%	2,70%	19368	0	31545	32180

15	28256	116/419	C07	10,15%	0,00%	18,58%	17101	0	43706	48961
115	6272	103/348	C09	0,00%	0,00%	2,27%	20924	0	8550	23306
54	11672	sl110-317	C11	0,00%	18,18%	3,81%	11100	0	1969	17662
215	27259	110/240	C13	5,00%	41,45%	18,08%	25787	0	38066	19843
74	28998	122/246	C15	x	27,82%	x	x	0	x	34120
164	28773	120/235	D01	0,00%	37,79%	8,00%	34555	0	25481	37692
177	27072	108/211	D03	0,00%	0,00%	0,00%	7946	0	44103	47360
46	28189	116/163	D05	9,23%	59,33%	10,96%	35075	0	74614	66938
149	25787	100/039	D07	0,00%	67,33%	2,13%	0	0	1769	24207
34	28600	118/843	D09	0,00%	36,31%	8,98%	15095	0	26404	63920
31	8371	12426	D11	0,00%	76,04%	1,56%	19057	0	62565	55194
117	11737	23452	D13	0,00%	0,00%	0,00%	20629	0	57248	58569
32	12788	sl27714	E01	1,31%	0,00%	8,33%	0	0	51152	53124
29		29866	E03	0,00%	0,00%	0,52%	10588	0	9990	56855
200	13752	31177	E05	0,00%	29,80%	3,72%	17921	0	4520	49995
147	14127	32717	E07	0,00%	0,00%	0,00%	25096	96428	19255	54041
170	14690	35723	E09	6,64%	32,53%	3,41%	11047	0	60652	44396
56	16104	41577	E11	0,00%	28,39%	3,53%	12637	0	2350	22861
154	17631	47516	E13	0,00%	37,02%	3,68%	33515	0	3981	62238
203	18003	48831	F01	2,63%	0,00%	0,00%	12588	117108	39297	50266
39	18065	sl49198	F03	0,00%	0,00%	0,00%	53536	0	14532	80212
142	16718	49405	F05	0,00%	22,88%	0,00%	11597	0	26815	23607
146	18263	50045	F07	0,00%	20,08%	0,00%	7677	99255	15045	12254
95	18658	52375	F09	0,00%	0,00%	0,00%	35346	0	51454	15987

63	7338	55012	F11	0,00%	0,00%	0,00%	11735	0	41728	x
80	19253	55071	F13	0,00%	0,00%	4,69%	49775	0	65670	67357
24	19548	56154	F15	0,00%	0,00%	0,43%	0	0	57299	57003
196	19470	56196	G01	13,06%	30,07%	0,00%	0	0	55822	44610
79	19686	56960	G03	0,00%	0,00%	0,00%	46138	54555	65014	2409
2	19818	57882	G05	0,00%	30,05%	0,00%	38861	0	58337	24872
162	20007	58824	G07	0,00%	0,00%	0,86%	26132	0	31790	33078
113	20142	59627	G09	4,39%	0,00%	5,10%	41383	0	19701	26093
151	hbp	61554	G11	0,00%	0,00%	0,00%	51698	0	39857	42684
169	20566	61992	G13	15,57%	0,00%	1,68%	42768	0	93020	61857
40	20741	sl62921	G15	x	0,00%	x	x	0	x	58317
191	21075	65221	H01	0,00%	0,00%	0,00%	6619	108857	61378	3971
218	21161	65447	H03	0,00%	0,00%	10,21%	60552	0	19226	36010
126	hbp	65621	H05	0,00%	0,00%	0,00%	34401	0	23075	47573
18	21231	65879	H07	1,13%	6,28%	1,11%	49021	0	74010	38915
125	21452	66939	H09	0,00%	0,00%	0,00%	18416	0	11281	13034
153	21436	66959	H11	0,00%	0,00%	0,00%	42656	0	43506	45444
223	21569	67723	H13	0,00%	23,07%	2,50%	36485	0	58569	28727
144	hbp	67849	H15	0,00%	24,23%	0,00%	8814	0	63497	x
1	21538	68853	I01	22,41%	21,74%	0,00%	3331	0	52067	33331
198	21803	69472	I03	0,00%	0,00%	0,00%	61790	0	36247	67364
132	22117	sl71700	I05	0,00%	15,38%	0,00%	15393	0	33990	7491
52	22473	74505	I07	0,00%	15,94%	2,99%	20137	0	17985	48254
152	22634	75593	I09	0,00%	0,00%	0,00%	41042	0	48355	64525

86	22698	75873	I11	0,00%	9,65%	0,00%	47459	0	60369	56451
140	22891	77539	I15	0,00%	0,00%	0,00%	16223	0	60929	75633
213	22928	77881	J01	0,00%	0,00%	0,00%	30139	0	46841	88128
71	23080	79101	J03	0,91%	0,00%	0,00%	0	0	87755	67592
14	23093	IH/8877	J05	0,00%	0,00%	0,00%	36309	0	13172	x
179	23242	80529	J07	0,00%	0,00%	0,00%	21238	0	12397	39371
220	23255	81035	J09	0,00%	6,25%	2,32%	35853	0	22833	19641
145	23342	81457	J11	0,00%	8,23%	0,00%	42911	0	57918	51127
166	23432	82209	J13	0,00%	0,00%	0,00%	41877	0	23722	53756
89	hbp	81885	L01	0,00%	17,26%	0,00%	15982	0	41932	x
72	11482	84438	L03	0,70%	6,94%	0,00%	26711	0	16833	x
137	hbp	85091	L05	0,00%	6,98%	0,00%	34088	0	69473	49639
38	23732	85556	L07	14,90%	5,00%	10,55%	13850	0	38533	16773
175	hbp	86431	L09	0,00%	28,99%	0,00%	25730	0	60479	x
123	23908	87104	L11	0,00%	0,00%	6,08%	42023	0	29368	47363
143	hbp	87189	L13	0,00%	29,47%	0,00%	15511	0	40146	11866
68	23244	87402	L15	7,02%	18,57%	0,00%	15113	0	78172	76088
94	24331	89543	M01	0,00%	0,00%	0,00%	15596	0	27892	39576
65	24398	90050	M03	0,00%	32,15%	3,16%	29328	0	49308	12649
183	24556	sl91170	M05	1,16%	36,52%	0,00%	28172	0	49603	1745
212	hbp	91630	M07	0,00%	25,60%	0,00%	29995	0	64030	34652
163	17553	92885	M09	0,00%	35,29%	5,78%	24157	0	55486	39362
75	24955	93818	M11	0,00%	31,62%	0,00%	23246	0	60241	39525
178	9668	94146	M13	0,70%	32,17%	0,00%	545	0	46410	51291

225	25020	94398	M15	x	x	x	x	x	x	33911
210	25274	95827	N01	0,00%	0,00%	0,00%	26843	0	49844	85843
26	25218	96086	N03	0,00%	0,00%	0,00%	24680	0	31855	65589
161	10964	96934	N05	0,00%	0,00%	15,63%	23281	0	28372	40048
199	hbp	97116	N07	4,32%	16,37%	0,00%	20123	0	87672	55844
77	24944	97297	N09	0,00%	13,97%	0,00%	0	0	74174	47090
195	25464	97720	N11	0,00%	0,00%	0,00%	0	0	73729	41445
207	25544	98774	N13	0,00%	23,08%	0,00%	37336	0	47569	x

9.4 Apêndice 4: Certificado de Apresentação