DANIEL DE OLIVEIRA GOMES

Estudo da deleção do cromossomo 9p como fator prognóstico no carcinoma renal tipo células claras localizado

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

São Paulo
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Gomes, Daniel de Oliveira
Estudo da deleção do cromossomo 9p como fator prognóstico no carcinoma renal tipo células claras localizado / Daniel de Oliveira Gomes. -- São Paulo, 2013.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Urologia.
Orientador: Marcos Francisco Dall´Oglio.

Descritores: 1.Neoplasias renais 2.Carcinoma de células renais 3.Cromossomos humanos par 9 4.Deleção cromossômica 5.Prognóstico 6.Hibridização in situ fluorescente 7.Análise em microsséries

USP/FM/DBD-121/13

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Leila e Raimundo,

Pela transmissão das virtudes de um ser humano íntegro através do exemplo.

A minha esposa, Karine,

Pelo seu amor; pela presença constante e estímulo incondicional.

A minha irmã, Raquel,

Pelo carinho e atenção, torcendo sempre por minhas realizações.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A todos os mestres que me estimularam a buscar conhecimento.

"Não se pode ensinar coisa alguma a alguém; pode-se apenas ajudá-lo a encontrar a reposta por si mesmo".

Galileu Galilei (1564 – 1642)
"Pai da ciência moderna"

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcos Francisco Dall'Oglio, que me acolheu no Grupo de Uro-Oncologia e me transmitiu preciosos conceitos sobre como ser um bom médico e pessoa. Obrigado pela oportunidade de fazer parte deste time.

"O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre seu trabalho e o seu lazer, entre sua mente e seu corpo, entre sua educação e a sua recreação. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo"

Texto budista

À Profª. Drª. Kátia Ramos Moreira Leite, por sua paciência e dedicação no desenvolvimento deste trabalho. Sem você, ele não seria possível.

"Os que se encantam com a prática sem a ciência são como timoneiros que entram num navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino"

Leonardo da Vinci (1452-1519)

Ao Prof. Dr. Miguel Srougi, modelo no caráter e no comportamento; exemplo de chefe, médico, professor e pessoa. Sua personalidade e atitudes contagiam e direcionam aqueles que se iniciam na vida urológica.

"Somente seres humanos excepcionais e irrepreensíveis suscitam idéia generosas e ações elevadas"

Albert Einstein (1879-1955)

Ao Prof. Dr. Manoel Barral-Netto, a primeira pessoa que me apresentou à pesquisa científica e que me amparou durante minha iniciação científica na Fiocruz. Obrigado por instigar a ciência em mim.

"A orientação inicial que alguém recebe na sua educação marca sua conduta ulterior"

Platão (428a.C.-348a.C.)

Ao Dr. Alexandre Crippa, por seu profissionalismo, objetividade e incansável vontade de fazer o que é preciso; seu empenho na realização de objetivos e metas é estimulante.

"A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana"

Louis Pasteur (1822-1895)

À pesquisadora Sabrina Reis e Dr. José Pontes Júnior, pelo inestimável apoio nas várias fases deste projeto.

À citogeneticista Isida Souza pela dedicação e cordialidade ao me instruir sobre a técnica de hibridização *in situ*.

Ao Prof. Dr. Homero Bruschini, por me receber na Pós-graduação, acreditando na realização de uma tese de qualidade.

Ao Dr. Marcelo Zerati, por compartilhar comigo parte dos dados clínicos da sua tese.

Ao Dr. Adriano Nesrallah, Dr. Luiz Carlos Neves, Dr. Maurício Cordeiro, Dr. Fábio Ortega e todo grupo de Uro-Oncologia do ICESP, por me acomodarem tão bem nesta equipe. Vocês conseguem deixar o trabalho cotidiano muito mais prazeroso.

Ao Grupo de Apoio à Pesquisa da Uro-Oncologia (ICESP) – Sanarelly Pires, Francine Santos e Tatiana Thaller – pelo auxílio na concretização deste projeto.

Ao Dr. Valdecir Marvulle, pela precisão nos cálculos estatísticos.

Aos membros da Banca de Qualificação, Dr. Stênio Zequi, Dr. Pierre Gonçalves e Dr. José Roberto Colombo, pelas sugestões que sem dúvida agregaram precioso valor a minha tese.

Aos que me formaram urologista no Hospital Santa Marcelina, em especial ao Dr. Minori Saito, Dr. Auro Simões e Dr. Luiz Budib. E ainda, aos que lá se tornaram urologistas junto comigo, pois a exigência (principalmente a pessoal) num grupo de alto padrão é sempre maior. Em especial, ao Dr. Bruno Falcão, Dr. Matheus Roque e Dr. Fábio Luiz de Souza. Há poucas coisas tão legais na vida quanto trabalhar com amigos.

Aos meus pais e irmã, Leila, Raimundo e Raquel, pelos ensinamentos e carinho a mim dedicados, pelo incansável encorajamento na realização dos meus sonhos. Proporcionar-lhes orgulho e felicidade sempre me trará um bem-estar imenso e me guiará pelos caminhos a serem seguidos.

À minha esposa Karine, pelo seu amor, paciência e compreensão. Viver ao seu lado é um privilégio e dividir contigo cada angústia e cada alegria é simplesmente uma necessidade. Obrigado por existir em minha vida.

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: 2010/50667-3

EPÍGRAFE

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci (1452-1519)

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; 3ª Edição, São Paulo; 2011. Autores: Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli 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 Committe of Medical Journals Editors* (Grupo de Vancouver).

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos
Lista de Figuras
Lista de Gráficos
Lista de Tabelas
Resumo
Summary

1. INTRODUÇÃO 1
    1.1 Carcinoma renal 2
    1.2 Fatores prognósticos clássicos em carcinoma renal 6
    1.3 Modelos prognósticos pós-operatórios 10
    1.4 Fatores prognósticos moleculares e citogenéticos 15

2. OBJETIVOS 21
    2.1 Objetivo primário 22
    2.2 Objetivo secundário 22

3. MÉTODOS 23
    3.1 Casuística 24
    3.2 Microarranjo tecidual (TMA) 26
    3.3 Hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) 28
    3.4 FISH na lâmina de TMA 31
    3.5 Análise estatística 34
    3.6 Ética 35

4. RESULTADOS 36

5. DISCUSSÃO 46

6. CONCLUSÕES 64

7. ANEXOS 66
    7.1 Termo de consentimento livre e esclarecido 67
    7.2 Parecer CAPPesq 69

8. REFERÊNCIAS 70

Apêndice

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

9p	Braço curto do cromossomo 9
ANOVA	Análise de variância
B7-H1	Proteína de membrana da Família B7 tipo H1
B7-H4	Proteína de membrana da Família B7 tipo H4
Bcl-2	Proteína reguladora de apoptose tipo linfoma células-B 2
CA-IX	Anidrase carbônica tipo nove
CA-XII	Anidrase carbônica tipo doze
Cad-6	Caderina 6
CAPPesq	Comissão de Ética em Pesquisa do HCFMUSP
CD44	Receptor de superfície celular CD44
CDKN	Quinase inibidora dependente de ciclina
CEP	Sonda de enumeração cromossômica
CR	Carcinoma renal
ccRCC	*Clear cell renal cell carcinoma*
CRCC	Carcinoma renal do tipo células claras
CXCR3	Receptor de citocina CXC tipo 3
CXCR4	Receptor de citocina CXC tipo 4
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E2F	Fator de transcrição E2F
E-cad	E-caderina (epitelial)
ECOG	*Eastern Cooperative Oncology Group*
EpCAM	Molécula de adesão de células epiteliais

EphA2	Receptor 2 da família Eph tipo A
EPO	Eritropoetina
FISH	Hibridização *in situ* com fluorescência
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIF-1	Fator induzível pela hipóxia tipo um
HIF-1α	Fator induzível pela hipóxia tipo um, subunidade alfa
HIF-1β	Fator induzível pela hipóxia tipo um, subunidade beta
IFN-α	Interferon alfa
IFN-β	Interferon beta
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL-2	Interleucina 2
IMV	Invasão microvascular
Ki-67	Antígeno nuclear Ki-67
LSI	Sonda indicadora locus-específico
LOH	Perda de heterozigosidade
MSKCC	*Memorial Sloan Kettering Cancer Center*
p14	Proteína tumoral 14
p15	Proteína tumoral 15
p16	Proteína tumoral 16
p27	Proteína tumoral 27
p53	Proteína tumoral 53
PD-1	Proteína programadora de morte celular 1
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas

pH	Logaritmo decimal negativo da concentração de hidrogênio em uma solução
PS	*Performance Status*
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina no cromossomo dez
Rb	Retinoblastoma
Smac/Diablo	Segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria
Skp2	Proteína 2 associado a quinase de fase S
SPSS	*Statistical Package for Social Sciences*
SSC	Solução salina citrada
SSIGN	Estadio, tamanho, grau e necrose
TGF-α	Fator transformador de crescimento alfa
TMA	Microarranjo tecidual, do Inglês: *tissue microarray*
TNM	Tumor, Nódulo, Metástase
UCLA	Universidade da Califórnia em Los Angeles
UISS	UCLA *Integrated Staging System*
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGF-R	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular
VHL	von Hippel-Lindau
XIAP	Proteína inibidora de apoptose ligado a X

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Controle do fator induzido pela hipóxia 1 (HIF-1) pelo produto do gene *von Hippel-Lindau* (pVHL) 5

Figura 2: Representação esquemática da montagem do TMA 27

Figura 3: Bloco e lâmina de TMA 28

Figura 4: Ilustração demonstrativa da técnica de hibridização *in situ* com fluorescência 29

Figura 5: Exemplos de FISH normal e anormal 30

Figura 6: Célula anormal deletada do locus 9p21 31

Figura 7: Sonda Televysion 9p utilizada em TMA 32

Figura 8: Micrografias de fluorescência mostrando a presença de células com um ou dois sinais correspondentes ao cromossomo 9p 33

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Sobrevida câncer-específica estimada da coorte de acordo com a presença ou ausência da deleção do cromossomo 9p 40

Gráfico 2: Sobrevida livre de recorrência estimada da coorte de acordo com a presença ou ausência da deleção do cromossomo 9p 41

Gráfico 3: Sobrevida câncer-específica estimada de pacientes com tumores <7cm, sem IMV e com Fuhrman de baixo grau de acordo com a presença ou ausência da deleção do cromossomo 9p 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fatores prognósticos em carcinoma renal 6

Tabela 2: Modelos prognósticos pós-operatórios 11

Tabela 3: Algoritmo do escore SSIGN 12

Tabela 4: Sistema de estadiamento integrado da UCLA 13

Tabela 5: Características da coorte e associação com deleção do cromossomo 9p 38

Tabela 6: Análise multivariada (Modelo de cox): sobrevida câncer-específica 42

Tabela 7: Análise multivariada (Modelo de cox): sobrevida livre de recorrência 43

Tabela 8: Sobrevida câncer-específica em pacientes de baixo risco, conforme status da deleção do cromossomo 9p 45

Resumo

Gomes DO. *Estudo da deleção do cromossomo 9p como fator prognóstico no carcinoma renal tipo células claras localizado* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: A deleção do cromossomo 9p tem sido encontrada em 14 a 36% dos pacientes com carcinoma renal tipo células claras (CRCC) e está associado a tumores de alto grau, estágio avançado, presença de metástases linfonodais e sistêmicas.
OBJETIVOS: Avaliar se a deleção do cromossomo 9p é fator preditor independente de pior sobrevida livre de recorrência e câncer-específica em pacientes com CRCC localizado.
MÉTODOS: Neste estudo de coorte retrospectivo, amostras tumorais de 94 pacientes com CRCC NX-0 M0, submetidos à nefrectomia radical ou cirurgia renal conservadora, foram analisadas através das técnicas de microarranjo tecidual e hibridização *in situ* com fluorescência.
RESULTADOS: O tempo de seguimento médio foi de 11,6 anos e a deleção do 9p foi encontrada em cerca de 15% dos casos. A sobrevida câncer-específica estimada em 5 e 10 anos foi respectivamente de 99% e 96% nos pacientes sem a referida perda cromossômica e de 71% e 57% naqueles com perda do 9p ($p<0,001$). A deleção do cromossomo 9p foi fator prognóstico independente na análise multivariada, aumentando o risco de morte pela doença em 28x (IC 95% 5-155, $p<0,001$). Tal deleção foi o preditor mais importante de mortalidade câncer específica, superior a qualquer fator patológico analisado, inclusive ao tamanho tumoral. Em pacientes com baixo risco de progressão, isto é, baixo escore SSIGN (0-2), baixo risco segundo a UISS e baixo risco segundo a Tríade Patológica da USP, tumores deletados do 9p estão significativamente associados com pior sobrevida câncer-específica em 10 anos: respectivamente 70%, 67% e 67% *versus* 98%, 97% e 98% naqueles sem a perda do 9p.
CONCLUSÃO: A deleção do cromossomo 9p estabelece independentemente um pior prognóstico para pacientes com CRCC localizado, fornece informação clínica relevante adicional e pode aperfeiçoar a habilidade preditora dos principais sistemas prognósticos atuais.

Descritores: Neoplasias renais, carcinoma de células renais, cromossomos humanos par 9, deleção cromossômica, prognóstico, hibridização *in situ* fluorescente, análise em microsséries

Summary

Gomes DO. *Study of chromosome 9p deletion as a prognostic factor in localized renal cell clear cell carcinoma* [thesis]. Sao Paulo: “Faculty of Medicine, University of Sao Paulo”; 2013.

INTRODUCTION: Deletion of chromosome 9p has been found in 14-36% of patients with clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and is associated with high grade tumors, advanced tumor stage, presence of lymph node involvement and metastases.
OBJECTIVES: To assess whether deletion of chromosome 9p is an independent predictor of worse recurrence-free and cancer-specific survival in patients with localized ccRCC.
METHODS: In this retrospective cohort study, tumor samples of 94 patients with NX-0 M0 ccRCC undergoing radical nephrectomy or renal conservative surgery, were analyzed using tissue microarray and fluorescence in situ hybridization.
RESULTS: Mean follow-up was 11.6 years and 9p deletion was found in near 15% of cases. Estimated cancer-specific survival at 5 and 10 years was, respectively, 99% and 96% in patients without such chromosomal loss and 71% and 57% in those with 9p loss ($p < 0.001$). Deletion of chromosome 9p is an independent prognostic factor in multivariate analysis, increasing the risk of disease-specific death in 28x (95% CI 5-155, $p < 0.001$). This deletion was the strongest predictor of cancer-specific mortality, superior to any analysed pathological factor, including tumor size. In patients at low risk of progression, namely low score (0-2) SSIGN, low risk UISS and low risk USP Pathological Triad, 9p-deleted tumors were associated with worse 10 years cancer-specific survival: respectively 70%, 67% and 67% versus 98%, 97% and 98% in those with no 9p loss.
CONCLUSIONS: Deletion of chromosome 9p independently establishes a worse prognosis for patients with localized ccRCC, provides relevant additional clinical information and can improve the predictive ability of the main current prognostic models.

Descriptors: Kidney neoplasms; carcinoma, renal cell; chromosomes, humans pair 9; chromosome deletion; prognosis; in situ hybridization, fluorescence; microarray analysis

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma renal

O carcinoma renal (CR) corresponde a 4% de todas as neoplasias malignas em adultos e é uma doença agressiva, considerada a mais letal dentre as neoplasias urológicas.[1] Sua incidência vem continuamente aumentando em todo o mundo. Nos Estados Unidos, por exemplo, a incidência de casos novos subiu de 10 para 15 casos por 100.000 habitantes/ano nos últimos 20 anos.[2] Neste país, estima-se que serão registrados 65.150 casos novos e 13.680 mortes por câncer de rim em 2013.[3] Na Europa, foram divulgados dados ainda mais alarmantes em 2008: 88.400 casos novos e 39.300 mortes.[4] No Brasil, a incidência descrita desta neoplasia – considerando-se os elevados índices de sub-registro nacionais – varia de 7 a 10 casos por 100.000 habitantes/ano nas áreas mais industrializadas, com taxas menores em regiões menos desenvolvidas.[5] Segundo o primeiro Estudo Nacional sobre Câncer de Rim do Brasil, a doença é mais comum em homens e na raça branca, 59% e 79% dos pacientes respectivamente, com idade média de 59 anos.[6]

A maior disponibilidade e aperfeiçoamento dos métodos de imagem levaram a um grande aumento na porcentagem de tumores renais incidentais. Atualmente, 30 a 60% dos carcinomas renais são diagnosticados casualmente por exames de imagem, ainda em fase assintomática.[7,8] Os sinais e sintomas mais comuns são hematúria, dor lombar ou no flanco e massa abdominal palpável, associados ou não a outros menos específicos

como perda ponderal, febre, sudorese noturna, anemia, hipertensão e varicocele.[8]

A base do tratamento dos tumores malignos do rim é a cirurgia, sendo o padrão-ouro a nefrectomia, radical ou parcial. A sobrevida em 5 anos de pacientes com tumores localizados submetidos ao tratamento cirúrgico é superior a 75%.[8] Nos pacientes com tumores metastáticos, o prognóstico a longo prazo é reservado, pois estes tumores apresentam resistência à radioterapia, quimioterapia e imunoterapia. A sobrevida, nestes casos, é menor que 10% em 5 anos.[8-12]

O CR é o protótipo do tumor quimio e radioresistente. Para casos de neoplasia renal metastática, a imunoterapia com interleucina-2 (IL-2) ou interferon-alfa (IFN-α) era historicamente considerada o tratamento padrão, com resposta tumoral objetiva em 11 a 15% dos pacientes. Entretanto, o ganho médio de sobrevida nos pacientes tratados com IFN-α era de 3,8 meses e apenas 2% dos pacientes apresentavam resposta completa, associado à elevada toxicidade.[9,10] Mais recentemente, terapias de alvo molecular como o sunitinib, sorafenib, temsirolimus e bevacizumab têm se mostrado superior a citocinas como terapia de primeira ou segunda linha na doença renal metastática, porém com ganho ainda discreto na sobrevida global.[11-13]

Com base em aspectos morfológicos, histoquímicos e citogenéticos, o carcinoma renal não se constitui numa neoplasia maligna única, mas num grupo compreendendo quatro subtipos tumorais principais: células claras, papilífero tipo I, papilífero tipo II e cromófobo; representando incidência de

75%, 5%, 10% e 5%, respectivamente. Dentre estes, o carcinoma renal tipo células claras (CRCC) é o de comportamento mais agressivo.[14]

A análise citogenética tem surgido como um poderoso recurso para o diagnóstico e classificação do CR.[15] A característica primordial do CRCC é a perda de material genético no cromossomo 3p, que o distingue de outros subtipos do carcinoma renal.[15,16] O gene *von Hippel-Lindau* (*VHL*), localizado no cromossomo 3p25-26, é um gene supressor tumoral cujo papel nas formas esporádicas e familiar do CRCC está confirmado.[17] A proteína VHL, produzida pelo gene *VHL*, se liga ao HIF-1 (fator induzido pela hipóxia 1) por intermédio da hidroxiprolina para promover sua degradação, mantendo os níveis de HIF-1 baixos sob condições normais. Esse processo é mediado pela ubiquitina, ao marcar o HIF-1 para degradação por um complexo multiproteico chamado proteassoma (figura 1). HIF-1 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. Deste modo, a perda da supressão de HIF-1 pelo gene *VHL* inativado ou mutado libera a ação desses fatores de crescimento pró-angiogênicos, contribuindo para o aumento da proliferação celular e para a pronunciada neovascularização associada ao CRCC.[14,18]

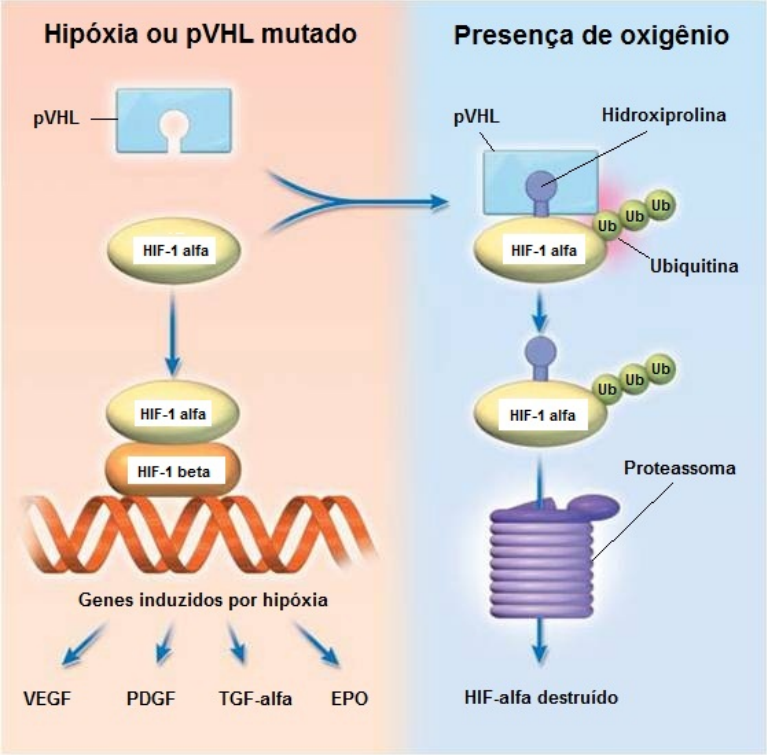


Figura 1. Controle do fator induzido pela hipóxia 1 (HIF-1) pelo produto do gene *von Hippel-Lindau* (pVHL). HIF-1 é um heterodímero constituído pela subunidade alfa e beta. Na presença de oxigênio o pVHL se liga ao HIF-1α, por intermédio da hidroxiprolina, para sua degradação mediada pela ubiquitina. Sob hipóxia, ou na presença de pVHL inativado ou mutado, HIF-1α se acumula e ao formar um complexo com sua subunidade β no núcleo celular ativa a transcrição de genes relacionados à angiogênese. VEGF - fator de crescimento do endotélio vascular; PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas; TGF-α - fator de crescimento transformador alfa; EPO – eritropoietina. Adaptado de George DJ, Kaelin WG [18]

A forma familiar do CRCC, de freqüência rara (1/36.000) e padrão autossômico dominante, se caracteriza pela herança germinativa da mutação de gene *VHL*, sendo chamada Doença de von Hippel-Lindau. O carcinoma renal ocorre em cerca de 50% dos indivíduos afetados, tem aparecimento mais precoce, em geral na terceira ou quarta década de vida, e são caracterizados pela multicentricidade e bilateralidade.[19]

1.2 Fatores prognósticos clássicos em carcinoma renal

Vários fatores prognósticos importantes em pacientes com CR têm sido descritos, incluindo fatores relacionados ao tumor, achados clínico-laboratoriais e informações moleculares (tabela 1).

Tabela 1. Fatores prognósticos em carcinoma renal

Anatômicos	**Histológicos**
Tamanho do tumor	Subtipo histológico
Extensão até gordura perirrenal ou do seio	Grau nuclear
Envolvimento adrenal	Presença de características sarcomatóides
Envolvimento venoso	Presença de necrose
Metástase linfonodal	Invasão microvascular
Metástase sistêmica	Invasão do sistema coletor
Extensão metastática da doença	
Clínicos	**Moleculares**
Performance status (Karnofsky, ECOG)	Fatores induzidos por hipóxia: CA-IX, CA-XII, CXCR3, CXCR4, HIF, IGF-1, VEGF, VEGFRs
Sintomas locais	Moléculas co-estimulatórias: B7-H1, B7-H4, PD-1
Sintomas sistêmicos (p.ex. perda de peso)	Reguladores do ciclo celular: p53, Bcl-2, PTEN, Ciclina A, p27, Skp2
Trombocitose	Moléculas de adesão: EpCAM/KSA, E-Cad, alfa-catenina, Cad-6
Anemia	Outros fatores: Ki-67, XIAP, Survinina, EphA2, Smac/DIABLO, CD44, Gelsolina, Vimentina, Caveolina-1,
Hipercalcemia	
Fosfatase alcalina elevado	
Proteina-C reativa elevado	
VHS elevado	

Adaptado de Lane BR, Kattan MW [20]

De modo geral, os fatores relacionados ao tumor como estadiamento patológico, tamanho do tumor, grau nuclear e subtipo histológicos são os de maior relevância, independentemente de outros elementos.

O estadiamento patológico é o fator prognóstico isolado mais importante.[20-22] O sistema TNM do CR claramente distingue grupos de pacientes com diferentes desfechos, confirmando que a extensão locorregional ou sistêmica da doença é o determinante primário de sobrevida nesta enfermidade.[23] A sobrevida câncer-específica nos estádios pT1 e pT2 é de 71 a 97%, enquanto nos tumores localmente avançados é de 20 a 53% e menor que 10% nos pacientes com doença metastática.[24] Estudos confirmaram que a modificação de 2002 do sistema TNM forneceu melhor habilidade prognóstica do que seus antecessores[25,26], e antecipadamente, já prevê-se que o novo sistema TNM de 2010 irá transmitir melhorias.[26-29] Vários estudos têm mostrado que o envolvimento ipsilateral direto ou metastático da glândula adrenal, apesar de raro, representa um fenótipo altamente agressivo com péssimas taxas de sobrevida;[29-31] motivo pelo qual o novo TNM reclassificou-o como T4 ou M1, respectivamente. A invasão direta da parede da veia cava inferior pelo trombo tumoral parece ter impacto prognóstico maior do que seu nível cefálico e está agora classificado como pT3c, independente do nível do trombo tumoral.[32,33] Uma análise de 1771 casos com CR localizado mostrou que as taxas de sobrevida câncer-específica em 10 anos para pacientes com tumores pT1a, pT1b e pT2 são de 95-90%, 85-80% e 75%, respectivamente.[34]

O tamanho do tumor é outra característica do CR que tem valor prognóstico independente, tanto para tumores restritos ao rim quanto para aqueles localmente avançados ou invasivos.[20,21] Em séries da *Cleveland Clinic* e da *Mayo Clinic*, tumores menores que 4cm estão associados com sobrevida câncer-específica em 5 anos superior a 95%, independente se foram tratados por nefrectomia parcial ou radical.[35-37]

Os tumores com invasão da gordura peri-renal e do seio renal são ambos considerados pT3; todavia, têm-se demonstrado que estes tumores apresentam maior risco de desenvolverem metástases do que aqueles, provavelmente devido à presença de grande quantidade de vasos sanguíneos no seio renal.[38] Há muito tempo, o envolvimento linfonodal tem sido reconhecido como um péssimo sinal prognóstico, uma vez que está associado a sobrevidas em 5 e 10 anos de 30-5% e 5-0%, respectivamente.[39-40]

O grau nuclear de Fuhrman baseia-se no grau de atipia nuclear das células tumorais, sendo avaliados sua forma e tamanho, além da evidência de nucléolo; e tem sido o principal sistema de graduação celular utilizado para CR. Apresenta boa correlação com o estadio patológico, tamanho do tumor, presença de trombo tumoral venoso e metástases linfonodais e sistêmicas, além de valor prognóstico independente.[41-43] Gudbjartsson et al. demonstraram sobrevida câncer-específica de 87%, 70%, 46% e 15% respectivamente para os graus I a IV.[44]

A presença de invasão microvascular (IMV) também constitui fator prognóstico importante em CR.[45-47] Van Poppel et al., estudando 180

pacientes com CR (estadio pT1-T4 NX-0 M0) encontraram êmbolos neoplásicos intravasculares em 28% dos casos, dos quais cerca de 40% apresentaram progressão da doença. Dos 129 pacientes sem IMV, apenas 8 (6%) tiveram progressão. A análise multivariada mostrou que IMV foi o preditor independente de progressão mais importante.[45] Gonçalves et al., exibiu achados semelhantes examinando 95 pacientes com CR localizado, estadio pT1-T2 Nx M0, com seguimento médio de 45 meses; ou seja, IMV foi preditor independente de recorrência e sobrevida câncer-específica.[46] Mais recentemente, um estudo envolvendo 5 instituições dos Estados Unidos e Europa com 2.596 pacientes, num seguimento médio de 22 meses, apontou que há forte correlação entre IMV e parâmetros anatomo-patológicos desfavoráveis como maior tamanho, Furhman de alto grau, presença de metástases linfonodais e a distância. Houve associação significante entre IMV e sobrevida câncer-específica à análise univariada, entretanto após o controle por sexo, *performance status* (ECOG), grau de Fuhrman e estadio TNM, essa significância estatística foi perdida, tanto na coorte global, quanto nos subgrupos de pacientes com CRCC (n= 2.078) e naqueles com CRCC N0M0.[47]

Devido a existência dessa variedade de importantes fatores prognósticos, a melhor abordagem seria combinar certos deles a fim de compor modelos que estratificassem com melhor acurácia pacientes com CR em diferentes categorias prognósticas.

1.3 Modelos prognósticos pós-operatórios

No passado, a identificação de pacientes em risco de progressão da doença após a nefrectomia era importante primariamente para aconselhá-los em relação ao prognóstico e para orientar a periodicidade do seguimento.[48] Contudo, com o surgimento de terapias adjuvantes mais eficazes, os modelos preditores têm um potencial de aplicação ainda maior. Algoritmos baseados apenas em variáveis pré-operatórias têm habilidade prognóstica inferior comparado aos modelos que incluem características patológicas do tumor.[49-51] Atualmente, vários modelos que avaliam o risco de progressão após a nefrectomia estão disponíveis; os mais utilizados podem ser visualizados na tabela 2.

O primeiro deles foi proposto por Kattan et al.[52] que estudando 601 pacientes com CR pT1-T3c NX-0 M0 incluiu o estadio TNM, tamanho do tumor, subtipo histológico e sintomas iniciais para compor um nomograma preditor de recorrência. Posteriormente, os mesmos autores produziram uma revisão deste nomograma para pacientes que tinham CRCC, baseado no estadio TNM, tamanho, grau nuclear, necrose, IMV e sintomas.[53]

Tabela 2. Modelos prognósticos pós-operatórios em portadores de carcinoma renal

Instituição, Estudo	Histologia	Cenário inicial	Época da nefrectomia	Variáveis clínicas	Variáveis patológicas	Informação prognóstica	Desfecho, em anos
MSKCC, Kattan et al. (2001)[52]	Todos os subtipos de CR	Localizado	1989 – 1998	Sintomas relacionados à doença	Subtipo histológico, tamanho, estadio pTNM	Recorrência	5
MSKCC, Soberllini et al. (2005)[53]	CRCC	Localizado	1989 – 2002	Sintomas relacionados à doença	Tamanho, estadio pTNM, grau nuclear, IMV, necrose	Recorrência	5
Mayo Clinic, Frank et al. (2002)[54]	CRCC	Localizado e metastático	1970 – 1998		Estadio pTNM, tamanho, grau nuclear, necrose (SSIGN)	Sobrevida	1,3,5,7,10
UCLA, Zisman et al. (2002)[57]	Todos os subtipos de CR	Localizado e metastático	1989 - 2000	ECOG	Estadio pTNM, grau nuclear (UISS)	Sobrevida	1,2,3,4,5

MSKCC – *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center;* UCLA – *University of California at Los Angeles*

Em 2002, pesquisadores da *Mayo Clinic* conceberam o escore SSIGN, no qual era atribuído um número de pontos para pacientes com CRCC, fundamentado em variáveis exclusivamente patológicas: TNM, tamanho, grau nuclear e necrose (tabela 3).[54] A sobrevida câncer-específica estimada para um paciente individual em 1 a 10 anos é fornecida baseada no escore. Por exemplo, pacientes com escore de 0-1, 4, 7 e ≥10 têm sobrevida estimada em 5 anos de aproximadamente 99%, 80%, 41% e 7%, respectivamente. O escore SSIGN foi desenvolvido utilizando-se dados de mais de 1800 pacientes e tem sido validado externamente em populações da Europa e Ásia, resultando em excelentes graus de acurácia prognóstica.[55,56]

Tabela 3. Algorítimo do escore SSIGN

Característica	Pontuação
pT1	0
pT2	1
pT3 ou T4	2
pNx ou N0	0
pN1 ou N2	2
pM0	0
pM1	4
Tumor < 5cm	0
Tumor > 5cm	2
Fuhrman 1 ou 2	0
Fuhrman 3	1
Fuhrman 4	3
Necrose ausente	0
Necrose presente	2

Adaptado de Frank et al.[54]

Outro modelo prognóstico de sobrevida após nefrectomia por CR, também aplicável a pacientes com doença localizada ou metastática, foi proposto por Zisman et al., o chamado Sistema de Estadiamento Integrado da Universidade da Califórnia em Los Angeles (UISS).[57] Analisando 814 casos, foi possível estratificá-los em três categorias - risco baixo, intermediário e alto – utilizando o *performance status* (ECOG), grau nuclear e TNM (tabela 4). Uma vez determinado o grupo de risco apropriado, o prognóstico do paciente pode ser previsto aplicando tabelas de sobrevidas estimadas em 1 a 5 anos produzidas neste estudo. Por exemplo, a sobrevida média estimada em 2 e 5 anos para pacientes com doença localizada (N0M0) de baixo risco é de 97 e 84%, respectivamente. O modelo UISS também foi validado externamente em diferentes continentes,[58-59] incluindo um estudo envolvendo 8 centros internacionais e mais de 4.200 pacientes.[60]

Tabela 4. Sistema de estadiamento integrado da UCLA (UISS)

Casos não-metastáticos (N0M0)										
Estadio	T1				T2	T3				T4
Fuhrman	1-2		3-4		↓	1		2-4		↓
ECOG	0	≥1	0	≥1		0	≥1	0	≥1	
Risco	Baixo	Intermediário							Alto	

Casos metastáticos									
Estadio	N1M0	N2M0 ou M1							
Fuhrman	↓	1		2		3		4	
ECOG		0	≥1	0	≥1	0	≥1	0	≥1
Risco	Baixo		INTM	Baixo	INTM (Intermediário)				Alto

Adaptado de Zisman et al.[57]

Pesquisadores da Universidade de São Paulo propuseram uma tríade patológica prognóstica baseada na IMV, no grau nuclear de Fuhrman e no tamanho tumoral.[61] Analisando 230 pacientes com CR pT1-T4 NX M0 submetidos a nefrectomia, num seguimento médio de 48 meses, a combinação das variáveis citadas resultaram em três grupos de risco: baixo, intermediário e alto. Tumores de baixo risco são aqueles sem IMV, com baixo grau de Fuhrman e menores que 7cm. O risco intermediário é aquele em que um ou dois dos três fatores desfavoráveis estão presentes. O terceiro grupo, de alto risco, é aquele no qual os tumores apresentam os três fatores desfavoráveis: presença de IMV, grau nuclear de Fuhrman 3 ou 4 e tamanho maior que 7 cm. A sobrevida-livre de doença em 5 anos nos grupos de risco baixo, intermediário e alto é de, respectivamente, 95%, 57% e 13%. As taxas de sobrevida câncer-específica seguem esta mesma tendência: 95% para o grupo de risco baixo, 62% para o de risco intermediário e 32% para o de alto risco.[61] O grande valor deste mais recente modelo prognóstico está na sua capacidade de discriminar com boa acurácia grupos de risco estatisticamente diferentes de forma simplificada, proporcionando seu uso mais rotineiramente na prática clínica.

Mesmo dispondo desta série de importantes fatores prognósticos para compor os modelos já citados, os grupos de pacientes permanecem por vezes heterogêneos, culminando no desenvolvimento inesperado de recorrência em alguns casos. Deste modo, a identificação de fatores prognósticos relacionados à biologia tumoral específica do paciente poderá oferecer uma abordagem terapêutica individualizada e estabelecer um prognóstico mais

apurado. Nesse intuito, a análise molecular e citogenética tem se mostrado um excelente recurso.

1.4 Fatores prognósticos moleculares e citogenéticos

Recentemente, a inclusão de marcadores moleculares aos modelos de estadiamento mostrou ser mais precisa do que o uso isolado de preditores clínico-patológicos.[62] Ou seja, informação prognóstica adicional pode ser obtida através de uma variedade de marcadores moleculares e citogenéticos. Além disso, o conhecimento crescente das vias carcinogênicas em câncer de rim tem facilitado o entendimento do comportamento biológico da doença, proporcionando sua utilização na confecção de terapias de alvo molecular (sunitinib, sorafenib, temsirolimus, etc).[63]

Muito do entendimento sobre a biologia do CRCC vem da descoberta da via defeituosa VHL / HIF-1 e dos genes envolvidos em tal processo. De fato a maioria dos marcadores moleculares provêm de efeitos induzidos pelo HIF-1α. Os que têm recebido mais destaque são a anidrase carbônica IX (CA-IX) e o fator de crescimento vascular derivado do endotélio (VEGF).[64]

A CA-IX é uma proteína transmembrana regulada pelo produto do gene *VHL* com papel na regulação do pH intracelular e extracelular em resposta a hipóxia tumoral e subsequente metabolismo anaeróbio, estando altamente expressa no CRCC. Estudos iniciais indicaram que a expressão diminuída de CA-IX está independentemente associada com pior sobrevida em

pacientes com CR metastático,[62,65] entretando esta associação não parece se manter em pacientes com doença localizada.[66,67]

A angiogênese é um evento essencial na gênese tumoral e facilita o crescimento precoce e o desenvolvimento de metástases, sendo o VEGF um dos mais potentes fatores de crescimento vascular.[68] Há no CRCC uma expressão acentuada de VEGF devido a desregulação de HIF-1α como resultado da inativação da proteína VHL, associado ao ambiente em hipóxia.[69] A concentração sérica de VEGF está correlacionada com o estadio e grau do tumor; e níveis elevados com sobrevida adversa.[70,71] A super-expressão de VEGF-A em células tumorais indica um subtipo de CRCC mais agressivo e um pior prognóstico no CR localizado e metastático.[72]

Outros marcadores em evidência são o Ki-67 e o B7-H1. Ki-67 é um anticorpo marcador de proliferação celular, identificando um antígeno expresso nas fases G1, S e G2 do ciclo celular.[73] Expressão elevada de Ki-67 está associada com graus nucleares mais elevados e pior prognóstico em CRCC.[74] Ele é um marcador independente de sobrevida livre de doença para o CRCC localizado.[75-77] O B7-H1 é uma molécula corregulatória de células T, forte preditora independente de progressão de doença em CR.[78] Esta associação se sustenta mesmo considerando-se outros fatores moleculares, clínicos e patológicos importantes.[78,79]

São exemplos de marcadores moleculares idenficados como fator prognóstico em pacientes com CR: survinina,[79,80] B7-H4,[81] PD-1,[82] IGF-1,[83,84] EpCAM/KSA,[85] PTEN,[86] vimentina,[87] p27,[86,88] Skp2,[88] e EphA2.[89]

Um grande número de genes que podem ter valor prognóstico e terapêutico tem sido identificados por diferentes métodos. O *p53* é um gene supressor tumoral localizado no cromossomo 17 e é o alvo mais freqüente de mutações em cânceres humanos.[90] A proteína p53 normal causa a expressão de genes cujos produtos interrompem o ciclo celular em G1. Uma mutação do *p53* codifica uma proteína p53 anormal que não causa a expressão desses genes e, como resultado, o ciclo celular não é interrompido, possibilitando a replicação de células com DNA defeituoso.[90,91] Pacientes com maior expressão de *p53* mutado apresentam fenótipo tumoral mais agressivo, com maior probalidade de metástases ao diagnóstico, maior risco de recidiva pós-nefrectomia para tumores localizados e pior sobrevida, fundamentalmente naqueles portadores de CRCC.[87,92-94]

Nos últimos 10 anos, alterações em outras regiões cromossômicas têm sido estudadas e, em particular, a relação entre tais alterações genéticas e sobrevida câncer-específica e livre de doença.

Gunawan et al.[95] avaliando 118 pacientes portadores de CRCC identificaram que ganho no cromossomo 5q, por polissomia ou rearranjo estrutural, prediz um fenótipo clínico distinto com prognóstico favorável. Pacientes com este perfil tinham sobrevida em 5 anos significativamente maior do que aqueles que não a possuíam, independentemente de qualquer outra variável clínico-patológica clássica. Esta diferença de sobrevida não era influenciada até mesmo pela doença avançada. Entre pacientes com estadio avançado (III e IV), aqueles com ganho no 5q tinham taxas de sobrevida comparáveis aos pacientes com estádio clinico mais baixo (I e II),

enquanto aqueles sem ganho no 5q tinham sobrevida global ainda pior. Num recente estudo norte-americano,[96] contendo 246 pacientes com CRCC submetidos à nefrectomia radical, aqueles com perda do cromossomo 3p (52%) estavam significativamente associados com menor estágio pT, menor grau nuclear e menor risco de metástases linfonodal e sistêmica. Além disso, no grupo de pacientes com doença metastática (N+M0 ou M1) uma perda do cromossomo Y significava melhor sobrevida-livre de progressão e melhor sobrevida câncer-específica (p=0,016 e p=0,09, respectivamente).

Se por um lado, há marcadores citogenéticos de bom prognóstico, existem também marcadores de evolução clínica desfavorável. Schullerus et al.[97], detectaram a perda de heterozigosidade (LOH) dos cromossomos 8p, 9p e 14q em 33%, 33% e 45% de 105 pacientes portadores de CRCC, respectivamente. A perda de regiões dos cromossomos 8p, 9p e, especialmente, 14q estava significativamente associada com maior grau tumoral e a LOH combinada nesses sítios cromossômicos com estadio tumoral avançado. Já havia sido demonstrado a associação de deleções nos cromossomos 8p, 9p e 14q com estadio avançado em CRCC em outro estudo.[98] A partir daí, entretanto, levanta-se a questão se alterações genéticas específicas, independentemente do estadio, poderiam indicar progressão tumoral. Wu et al.[99] empregaram a técnica de FISH para avaliação da região do cromossomo 14q num estudo retrospectivo de CRCC com seguimento de 5 anos e demonstraram a utilidade desse marcador genético para estimar o prognóstico, que foi independente do grau e estadio.

Em pacientes com CRCC localmente avançado também foi correlacionada a perda alélica nos cromossomos 8p, 9p e 14q com a evolução clínica. Espécimes de nefrectomia radical de 72 pacientes estadio pT3aN0M0 foram analisados pela técnica de microarranjo tecidual para LOH nos cromossomos 8p, 9p e 14q. Pacientes com tumores demonstrando LOH nos cromossomos 8p e 9p tinham maior risco de recorrência, o que não foi observado para LOH no cromossomo 14q. A LOH concomitante nos cromossomos 8p e 9p mostrou ser um excelente preditor de recorrência, sendo superior até mesmo ao grau tumoral nesse sentido.[100]

O cromossomo 9p é um candidato a abrigar importantes genes supressores tumorais com relevância para a progressão do carcinoma renal. Há algum tempo sabe-se que perdas no cromossomo 9p, em particular deleção da região 9p21-22, são freqüentes em muitos tipos de tumores humanos como leucemias, melanoma, câncer de pulmão, bexiga e de cabeça e pescoço.[101-105]

A LOH no cromossomo 9 é encontrada em mais de 50% de todos os carcinomas de células transicionais de bexiga, independente do grau e estadio,[106-108] sendo a alteração genética mais frequente.[109] Não há consenso se a deleção homozigota de 9p21 está relacionado com grau e estadio nesta neoplasia. LOH de 9p21 é tão comum em casos pTa de baixo grau quanto naqueles invasivos (≥pT2), apesar que a deleção homozigota tem sido relacionada com tamanho tumoral maior e intervalo livre de recorrência reduzido.[110]

Tratando-se de rim, e em especial CRCC, alguns estudos recentes têm implicado a deleção do cromossomo 9p com pior prognóstico.[96,111-114] Entretanto, todos estes estudos incluíram pacientes com doença metastática (linfonodal ou sistêmica) na época da nefrectomia, o que limita sua aplicabilidade como preditor de progressão da doença após a cirurgia para tumores patologicamente localizados.

Um dos mais importantes desafios na pesquisa oncológica é prever a agressividade e potencial metastático do câncer num estágio inicial. Um marcador que pudesse se relacionar com tal comportamento seria de grande valor para o prognóstico do CRCC.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Correlacionar a deleção do cromossomo 9p com sobrevida livre de recorrência e câncer-específica em portadores de CRCC localizado (NX-0 M0) submetidos à nefrectomia com intuito curativo.

2.2 Objetivo secundário

Correlacionar a deleção do cromossomo 9p com sobrevida câncer-específica em portadores de CRCC localizado (NX-0 M0) com baixo risco de progressão, segundo critérios dos modelos da UCLA (UISS), da *Mayo Clinic* (escore SSIGN) e da USP (Tríade Patológica).

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

O estudo consistiu na análise de espécimes cirúrgicos de 135 pacientes com diagnóstico de CRCC submetidos à nefrectomia radical ou cirurgia renal conservadora (nefrectomia parcial ou enucleação) entre janeiro de 1988 e fevereiro de 2006 no Hospital Sírio Libanês, todas realizadas pelo mesmo cirurgião (Prof. Dr. Miguel Srougi).

Dentre os 135 portadores de CRCC, trinta e dois foram censurados por impossibilidade de localização de material anatomo-patológico disponível ou por não apresentarem dados de prontuário completos para análise. Finalmente, foram excluídos do estudo 9 casos de CRCC com envolvimento linfonodal ou metástase sistêmica, resultando 94 pacientes que tiveram seu material incluído no TMA.

Os critérios de inclusão foram: diagnóstico anatomo-patológico de CRCC, nefrectomia radical ou parcial com intuito curativo, margens cirúrgicas livres de comprometimento neoplásico, disponibilidade e adequação dos blocos de parafina para análise citogenética.

Todos os pacientes foram tratados e acompanhados até o óbito ou permanecem em acompanhamento pela equipe do Prof. Dr. Miguel Srougi. Simultaneamente, todas as análises anatomo-patológicas e citogenéticas foram elaboradas pela mesma patologista (Prof^{a}. Dr^{a}. Katia Leite), sem conhecimento sobre a evolução de cada paciente em particular.

Delineou-se portanto um estudo de coorte retrospectivo, também chamado estudo de coorte histórica, no qual o grupo de pacientes com as

características descritas foi identificado a partir de registros passados e acompanhado daquele momento em diante até o presente.

As variáveis clínicas analisadas foram idade, sexo, *performance status*, e sintomas à apresentação inicial; as patológicas incluíram tamanho tumoral (maior diâmetro em cm), estadio pT de acordo com o TNM 2010, grau nuclear de Fuhrman, necrose coagulativa tumoral, invasão microvascular e envolvimento da gordura perirrenal ou do seio renal pelo tumor. Para identificar os pacientes com baixo risco de progressão da doença, foram utilizados três sistemas prognósticos pós-operatórios: o modelo da USP (Tríade Patológica), da *Mayo Clinic* (escore SSIGN) e da UCLA (UISS).

Após a cirurgia, todos os pacientes foram acompanhados regularmente de acordo com seu estadiamento. A maioria submeteu-se a consulta e creatinina sérica semestral, além de RX tórax e tomografia computadorizada de abdome anual. Tomografia de tórax, de crânio e cintilografia óssea eram solicitadas apenas na presença de sintomas relacionados ou suspeita clínica de metástase. Recidiva foi definida como o aparecimento de lesões suspeitas e em crescimento, em locais típicos de progressão do CR (linfonodos retroperitoneais ou mediastinais, pulmões, fígado, ossos, cérebro) ou locais atípicos com biópsia diagnóstica. O tempo de sobrevida foi calculado como o intervalo de tempo entre a cirurgia e o último acompanhamento conhecido.

Nenhum procedimento cirúrgico foi realizado com objetivo único e exclusivo de coletar material para o referido estudo. Todo o material necessário já se encontrava disponível em arquivo. O estudo não causou

nenhuma mudança no tratamento que os pacientes receberam ou recebem no seu acompanhamento pós-operatório. Deles ou de seus representantes legais foi obtido o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A). A confidencialidade dos dados foi preservada.

3.2 Microarranjo tecidual (TMA)

Microarranjo tecidual ou *"tissue microarray"* (TMA) é a construção de um bloco de parafina contendo dezenas ou mesmo centenas de fragmentos de tecidos normais e/ou tumorais que serão analisados lado a lado, permitindo maior padronização das reações e maior rapidez nas análises. A principal vantagem do TMA reside na análise simultânea de vários cortes histológicos arranjados em apenas uma lâmina.[115,116]

O primeiro passo da confecção do TMA é a separação dos blocos de parafina contendo o CRCC e da sua respectiva lâmina corada em hematoxilina-eosina. A lâmina é analisada em microscópio óptico para localização e marcação da área representativa do tumor a ser amostrada. Por justaposição da lâmina com o respectivo bloco, marca-se neste último a área de interesse.

Em seguida, esta área de interesse do bloco doador é puncionada com um instrumento de precisão, obtendo-se um cilindro de tecido com diâmetro variável de 0,6 a 2 milímetros, dependendo do diâmetro do aparelho de punção. Este cilindro é transferido para um bloco de parafina receptor. Em nosso estudo empregamos um sistema mecanizado de precisão da marca

Beecher (Sun Prairie, WI, EUA) que coleta cilindros de 1mm de diâmetro e os insere no bloco receptor em intervalos de 0,3mm (Figura 2).

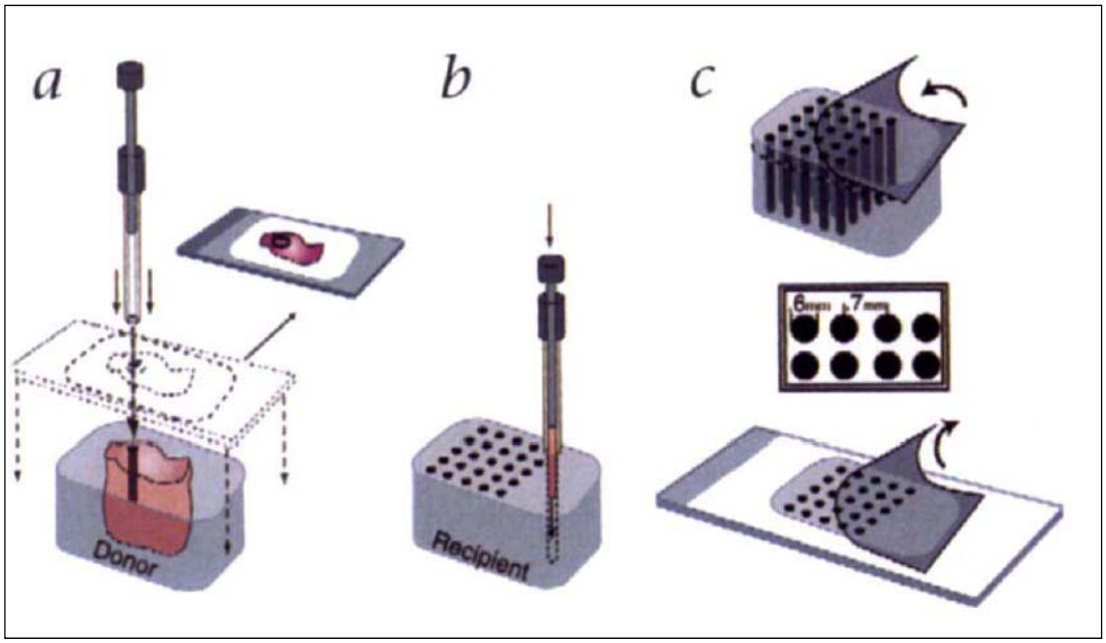


Figura 2. Representação esquemática da montagem do TMA. a) punção do bloco doador em posição correspondente à lamina em hematoxilina-eosina; *b*) transferência do cilindro de tecido para o bloco receptor do TMA; *c*) corte do bloco de TMA e obtenção das lâminas de TMA. Donor: Doador; Recipient: Receptor. Adaptado de Kononen et al.[115]

O procedimento é repetido para cada paciente até que no final do procedimento centenas de espécimes estarão representados no bloco receptor (Figura 3). Cada cilindro amostral é alocado numa posição do bloco receptor definida em um sistema cartesiano de coordenadas (Apêndice 1), e o conjunto das amostras constitui o que se denomina de TMA. O bloco receptor do TMA é então cortado em secções histológicas numeradas e consecutivas de 3 µm (Figura 3). Na sequência as lâminas são preparadas de acordo com a técnica a ser adotada, seja coloração hematoxilina-eosina, imunohistoquímica ou testes de hibridização.

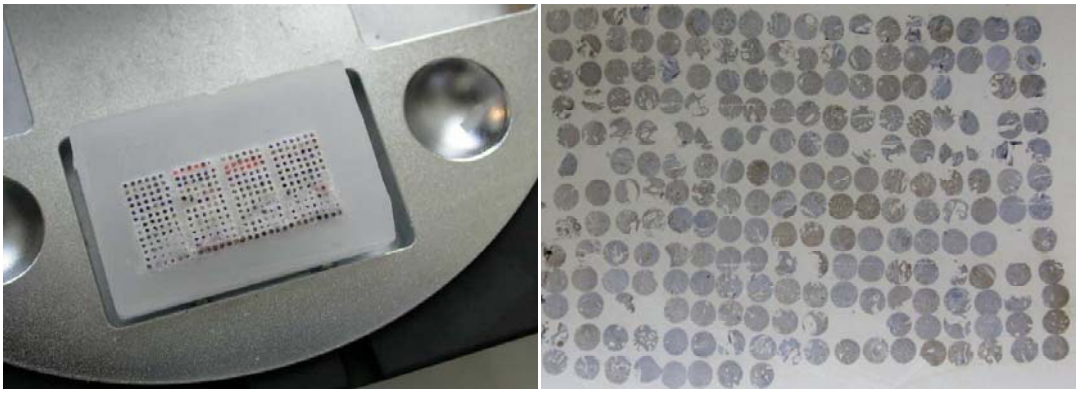


Figura 3. Bloco receptor do TMA contendo os cilindros com as amostras dos tecidos a serem estudados (à esquerda). Lâmina de TMA (à direita)

Embora não haja consenso sobre o número ideal de fragmentos amostrados, recomenda-se comumente a coleta de mais de um fragmento por caso, no intuito de menor perda de casos e maior representatividade.[117] Neste trabalho, foi optado por duas amostras por paciente, pois é comprovado que a análise de duas amostras em TMA é comparável ao observado na secção tecidual em 95% das vezes.[118]

3.3 Hibridização *in situ* com fluorescência (FISH)

As deleções do cromossomo 9p serão estudadas pela metodologia de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) sobre as lâminas de TMA. FISH é uma técnica que usa sondas de DNA (seqüências de oligonucleotídeos) marcados com moléculas fluorescentes para reconhecer um segmento específico de DNA e, por isso, avalia células quanto a alterações genéticas (figura 4).[119]

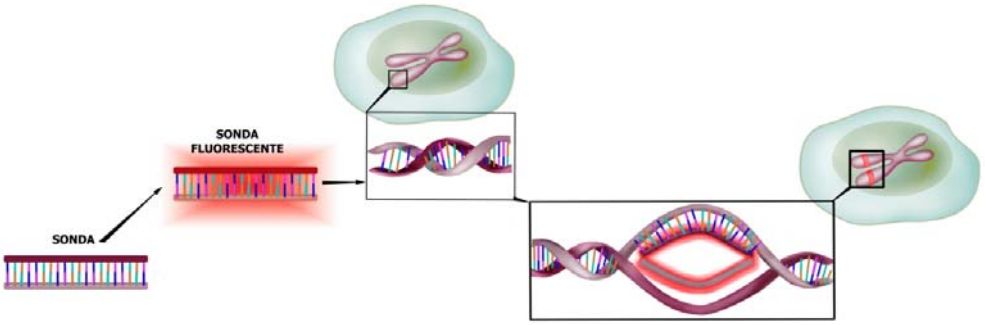


Figura 4. Ilustração demonstrativa da técnica de hibridização *in situ* com fluorescência[120]

Câncer é uma desordem genética e existe no tecido carcinomatoso renal uma rica e complexa rede de anormalidades cromossômicas (deleções e ganhos). Em geral, há dois tipos de sondas no FISH: sonda de enumeração cromossômica (CEP) que hibridiza o centrômero e a sonda indicadora locus-específico (LSI) que hibridiza um gene de interesse, como por exemplo *HER-2*, *p53* ou outros genes.

Utilizando um microscópio fluorescente, permite-se determinar quantas cópias de um dado gene ou cromossomo estão presentes no núcleo da célula, detectando ou não o segmento de DNA de interesse.[119] Células normais devem apresentar 2 cópias de uma dada sonda (dissomia) - figura 5A. A utilização das sondas CEP permite a identificação de anormalidades cromossômicas numéricas, como monossomia, trissomia, tetrassomia ou polissomia (ganhos de dois ou mais diferentes cromossomos numa mesma célula) – figura 5B.

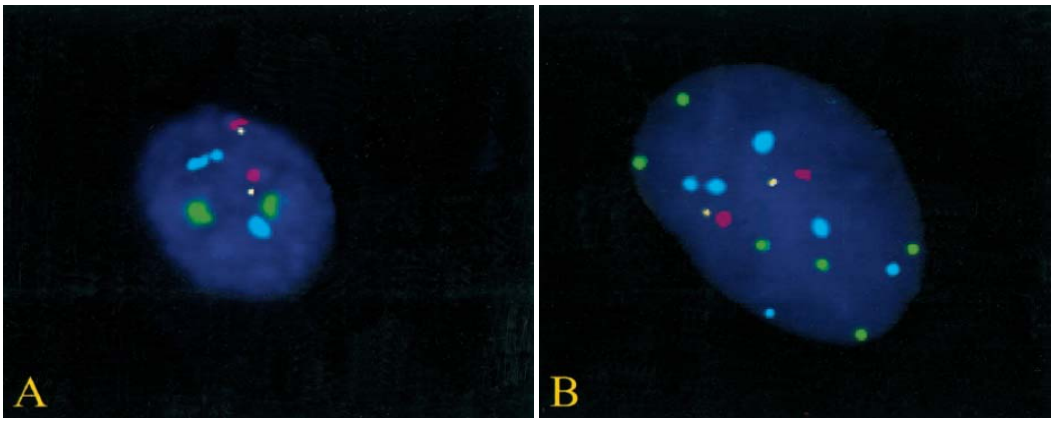


Figura 5. Exemplos de FISH normal e anormal utilizando um conjunto de quatro sondas: CEP 7 (verde), CEP 3 (vermelho), CEP 17 (azul), LSI 9p21 (amarelo). Em A – FISH normal com célula dissômica. Em B – FISH anormal com célula com polissomia dos cromossomos 7 e 17.

Já as sondas LSI servem para identificar a ausência ou presença de um gene, ou região cromossômica (locus), também através do sinal fluorescente à microscopia: a ausência deste sinal indica a deleção da respectiva região cromossômica. Células normais também possuem dois sinais fluorescentes, representando os dois alelos de um dado gene ou os dois locus semelhantes de um cromossomo. Portanto, serão utilizados neste estudo as sondas LSI 9p. A ausência completa de sinal fluorescente indica a deleção homozigota, ou seja, ambos os locus 9p foram perdidos. Já a presença de apenas um sinal fluorescente assinala a deleção heterozigota do locus 9p (figura 6).

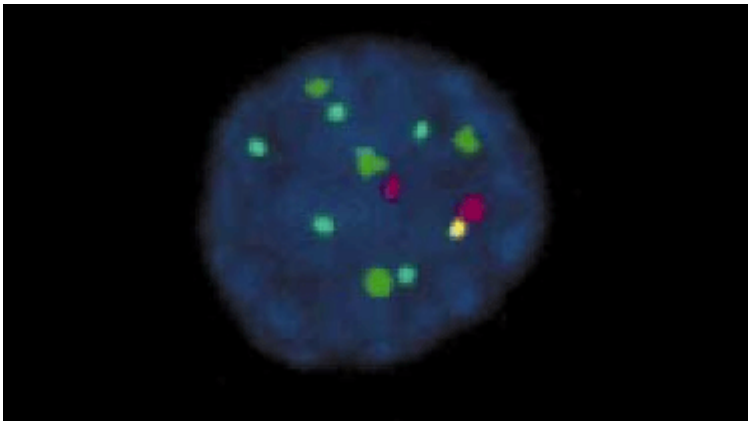
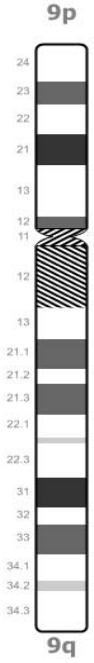


Figura 6. Célula anormal hibridizada com o mesmo conjunto de sondas (kit) da figura 5: a sonda de espectro amarelo representa a LSI 9p21. Há, portanto, a deleção heterozigota do locus 9p21, como indicado pelo único sinal amarelo.

3.4 FISH na lâmina de TMA

Finalmente, unindo-se as duas técnicas descritas, ou seja, preparando-se a lâmina de TMA de acordo com a técnica adotada (hibridização *in situ* com fluorescência), tem-se a possibilidade de estudar alterações cromossômicas específicas, em um grande número de casos, com economia de tecidos, material, pessoal e custos.

A sonda inicialmente utilizada para o estudo foi adquirida da empresa Abbott (Des Plaines, IL, EUA) (Figura 7) e as reações seguiram as recomendações sugeridas.[121]



Product Name
Vysis LSI 9q34
Vysis CDKN2A / CEP 9 FISH Probe Kit
Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe
Vysis LSI BCR/ABL ES Dual Color Translocation Probe
Vysis BCR/ABL1/ASS1 Tri-Color DF FISH Probe Kit
Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Single Fusion Translocation Probe
Esophageal Probe Kit
Vysis D5S23, D5S721/CEP 9/CEP 15 FISH Probe Kit - CE
UroVysion
CEP 9
Vysis ToTelVysion
TelVysion 9p
TelVysion 9q

Figura 7. Sonda Televysion 9p – Vysis (Abbott) – utilizada em TMA de carcinoma de células renais do tipo células claras.

Resumidamente: a lâmina foi desidratada em soluções de etanol a 70, 85 e 100%, 2 minutos em cada, seguido por banho de 2xSSC (pH 7,0) a 75ºC por 10 min. Posteriormente, a lâmina foi sequencialmente imersa em solução de Proteinase K / 2xSSC (0,25mg/ml) a 37ºC por 10 min e em solução 2xSCC à temperatura ambiente por 5 min. As amostras teciduais foram colocadas novamente em soluções de etanol a 70, 85 e 100%, 2 minutos em cada, secas ao ar e expostas à sonda Televysion 9p (8 µL). A lâmina foi então coberta por lamínula 24 x 32mm e selada com cola (*rubber cement*). A hibridização ocorreu colocando a lâmina em placa a 80ºC por 10min e, em seguida, incubando-a em câmara úmida a 37ºC *overnight*. Completado o tempo de hibridização, a cola e a lamínula foram gentilmente removidos e a lâmina foi imediatamente imersa em tampão Uréia/0,1xSCC a

45ºC por 30 min. Após lavagem em 2xSCC em temperatura ambiente por 2 min, nova desidratação com etanol seriado e secagem ao ar, finalmente a lâmina foi contracorada com 10µL de DAPI/Antifade e coberta com lamínula.

A análise foi efetuada com o microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E600 usando para documentação o sistema Cytovysion. Todas as células de cada fragmento tumoral (cilindro amostral) foram analisadas, sendo considerado existente a deleção do cromossomo 9p quando não havia nenhum sinal detectável no fragmento, ou seja, foram considerados como positivos apenas os casos com deleção homozigota. Havendo sinal, mesmo em pequeno número de células, o caso foi considerado como negativo para a perda de 9p (Figura 8).

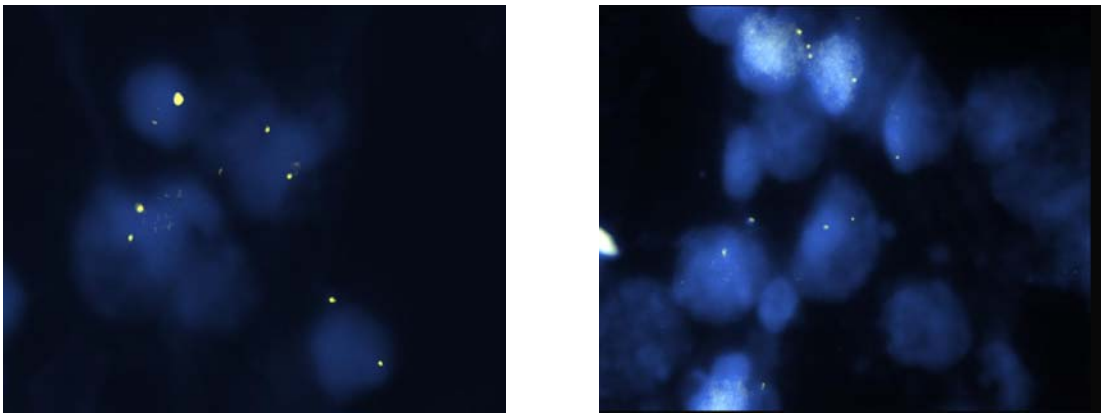


Figura 8. Micrografias de fluorescência mostrando a presença de células com um ou dois sinais correspondentes ao braço curto do cromossomo 9

Focou-se na deleção homozigota do 9p como critério de positividade devido à frequência muito incomum deste evento na população de células normais quando comparado à deleção heterozigota.[122] Portanto, seria

esperado encontrar também células com deleção heterozigota do 9p nos carcinomas renais. Além do mais, a deleção do 9p é uma mutação em que existe a perda de função de genes supressores tumorais,[102-109] fazendo parte das mutações consideradas recessivas ao nível genético. Ou seja, ambas as cópias destes genes precisam ser eliminadas ou inativadas para causar o fenótipo mutante.[123]

3.5 Análise estatística

Os dados foram analisados por regressão de Cox univariada para identificação de fatores preditores de sobrevida, e por regressão de Cox multivariada para identificação de fatores prognósticos independentes.

Curvas de sobrevida câncer-específica e sobrevida livre de recorrência foram obtidas pelo método de Kaplan-Meier. As diferenças entre as curvas foram caracterizadas pelo teste log-rank.

Foram empregados os testes t-Student e ANOVA quando os dados exibiam distribuição normal, e o teste de Mann-Whitney para dados com distribuição anormal. Utilizou-se o teste Qui-quadrado para a análise de variáveis categóricas.

Para análise estatística foi utilizado o software SPSS 16.0. Em toda a análise foi adotado um nível de significância de 5%, ou seja, foram considerados como estatisticamente significantes os resultados que apresentaram p-valor inferior a 5% ($p<0,05$).

3.6 Ética

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram codificadas, garantindo sua confidencialidade. Este projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisas do HCFMUSP, tendo sido aprovado na reunião de 09/06/2010 sob o protocolo nº 0177/10 (Anexo B)

4 RESULTADOS

Uma coorte formada por 94 pacientes portadores de CRCC localizado (NX-0 M0) foi analisada quanto à presença de deleção do cromossomo 9p pela técnica de FISH descrita. Nefrectomia radical foi realizada em 43 pacientes (46%) e cirurgia renal conservadora, seja enucleação ou nefrectomia parcial, em 51 (54%). Deleções do cromossomo 9p foram detectadas em 14 tumores (14,9%) e o seguimento médio foi superior a 11 anos (139 meses, com IC95%= 127-152 e variação de 7 - 288]. As características patológicas dos pacientes portadores de tumores com e sem deleção do cromossomo 9p estão dispostos na tabela 5.

A média de idade foi de 60 anos [variação de 23 a 90] e 71% dos pacientes eram do sexo masculino. Sessenta tumores (64%) foram detectados incidentalmente, representando pacientes assintomáticos, e a média de tamanho tumoral foi de 4,7cm [DP= 2,6]. O estadio patológico dos carcinomas renais foi: pT1a, 47 pacientes (50%); pT1b, 23 pacientes (25%); pT2a, 5 (5%); pT2b, 2 (2%); pT3a, 16 (17%); pT3b, 1 (1%); pT4, 0 (0%). O grau nuclear de Fuhrman era 1-4, respectivamente, em 23 (24%), 42 (45%), 26 (28%) e 3 pacientes (3%). A presença de necrose foi observada em 18 pacientes (19%), enquanto invasão microvascular tumoral (IMV) e da gordura - perirrenal ou do seio renal - em 21 (22%) e 17 pacientes (18%), respectivamente.

Tabela 5. Características da coorte e associação com deleção do cromossomo 9p

	Todos os pacientes n= 94 (100%)	Com deleção do 9p n= 14 (14,9%)	Sem deleção do 9p n= 80 (85,1%)	Valor de p*
Idade, anos				
Média (DP)	59,7 (12,3)	60,3 (11,6)	59,5 (12,5)	0,838**
Variação [min-max]	[23 – 90]	[32 – 76]	[23 – 90]	
Sexo				
Masculino	67 (71,3%)	9 (64,3%)	58 (72,5%)	0,531***
Feminino	27 (28,7%)	5 (35,7%)	22 (27,5%)	
Performance Status				
ECOG 0	82 (87,2%)	12 (85,7%)	70 (87,5%)	0,426***
ECOG ≥ 1	12 (12,8%)	2 (14,3%)	10 (12,5%)	
Tamanho médio, cm				
Média (DP)	4,7 (2,6)	5,1 (3,0)	4,6 (2,5)	0,599****
Variação [min-max]	[1,2 – 12]	[1,5 – 12]	[1,2 – 12]	
Apresentação Inicial				
Assintomático	60 (63,8%)	8 (57,1%)	52 (65%)	0,572***
Sintomático	34 (36,2%)	6 (42,9%)	28 (35%)	
Classificação pT				
pT1 ou pT2	77 (81,9%)	12 (85,7%)	65 (81,3%)	0,689***
pT3	17 (18,1%)	2 (14,3%)	15 (18,7%)	
Fuhrman				
Baixo grau: 1 e 2	65 (69,1%)	10 (71,4%)	55 (68,8%)	0,841***
Alto grau: 3 e 4	29 (30,9%)	4 (28,6%)	25 (31,2%)	
Necrose				
Ausente	76 (80,1%)	12 (85,7%)	64 (80%)	0,616***
Presente	18 (19,1%)	2 (14,3%)	16 (20%)	
IMV				
Ausente	73 (77,7%)	12 (85,7%)	61 (76,3%)	0,433***
Presente	21 (22,3%)	2 (14,3%)	19 (23,7%)	
Invasão de Gordura				
Ausente	77 (81,9%)	12 (85,7%)	65 (81,3%)	0,689***
Presente	17 (18,1%)	2 (14,3%)	15 (18,7%)	

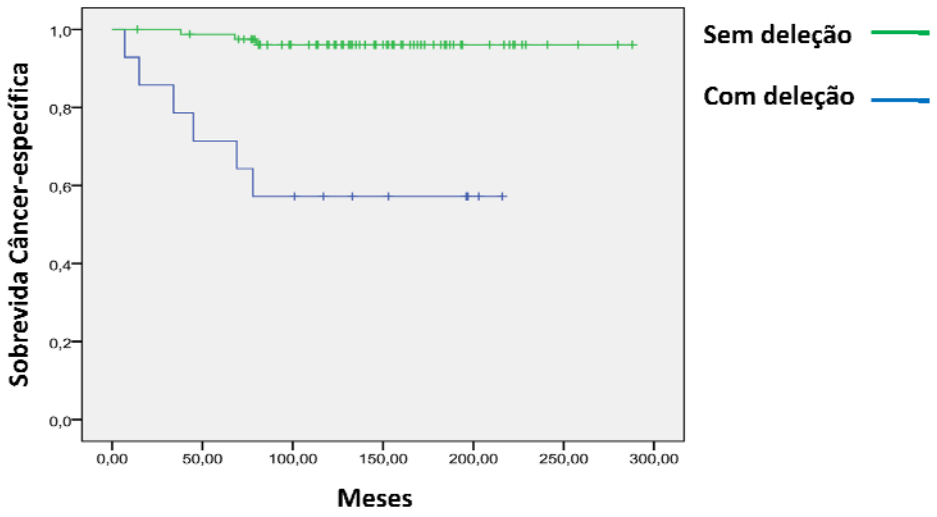
* valor de p entre grupos sem deleção e com deleção do 9p
** teste t-Student
*** teste Qui-quadrado
**** teste de Mann-Whitney

Ao se analisar estas mesmas características em vista à presença ou ausência de deleção do cromossomo 9p, não pôde ser observado nenhuma diferença, estatisticamente significante, entre os dois grupos. Pacientes portadores de tumores com deleção do 9p tinham idade, proporções de sexo e apresentação clínica inicial semelhantes àqueles não portadores de tal deleção (p= 0,83; 0,53 e 0,57 respectivamente). O tamanho médio do tumor foi semelhante nos tumores com e sem deleção do 9p (5,1cm x 4,6cm; p=0,59). Quando os tumores foram divididos quanto à classificação pT (T1 ou T2 x T3 ou T4), não se notou diferença entre aqueles com e sem deleção (p= 0,69). A frequência de outras variáveis patológicas - como classificação nuclear de Fuhrman, necrose, IMV e invasão de gordura – também eram estatisticamente semelhantes entre os dois grupos.

No seguimento de toda a coorte, 85 pacientes (83%) estavam vivos e sem doença, enquanto nove (9,5%) morreram devido à progressão do carcinoma renal e dois (2%) por outras causas. A sobrevida câncer-específica estimada em de 5 e 10 anos foi de 94,6% e 90,1%, respectivamente; já a sobrevida a sobrevida livre de recorrência estimada em 5 e 10 anos foi de 90,4% e 86%, respectivamente.

Em 5 anos, 28,6% dos pacientes com deleção do 9p morreram por câncer comparado com 1,3% dos pacientes sem deleção do cromossomo 9p. Em 10 anos, a mortalidade nos grupos com e sem deleção sobe para 42,9% e 3,8%, respectivamente. Em outras palavras, a sobrevida câncer-específica estimada em 5 e 10 anos foi respectivamente de 71,4% e 57,1% nos pacientes com a referida perda cromossômica e de 98,7% e 96,1% naqueles sem perda do 9p (teste log-rank p<0,001; gráfico 1). O tempo de sobrevida média estimada foi de 141 meses (IC95%= 95-187) e de 279 meses (IC95%= 269-289) para os pacientes com e sem deleção do 9p, respectivamente (p<0,001). Não houve diferença estatística em relação ao tempo de evolução para o óbito, dentre os que assim evoluíram, entre os dois grupos.

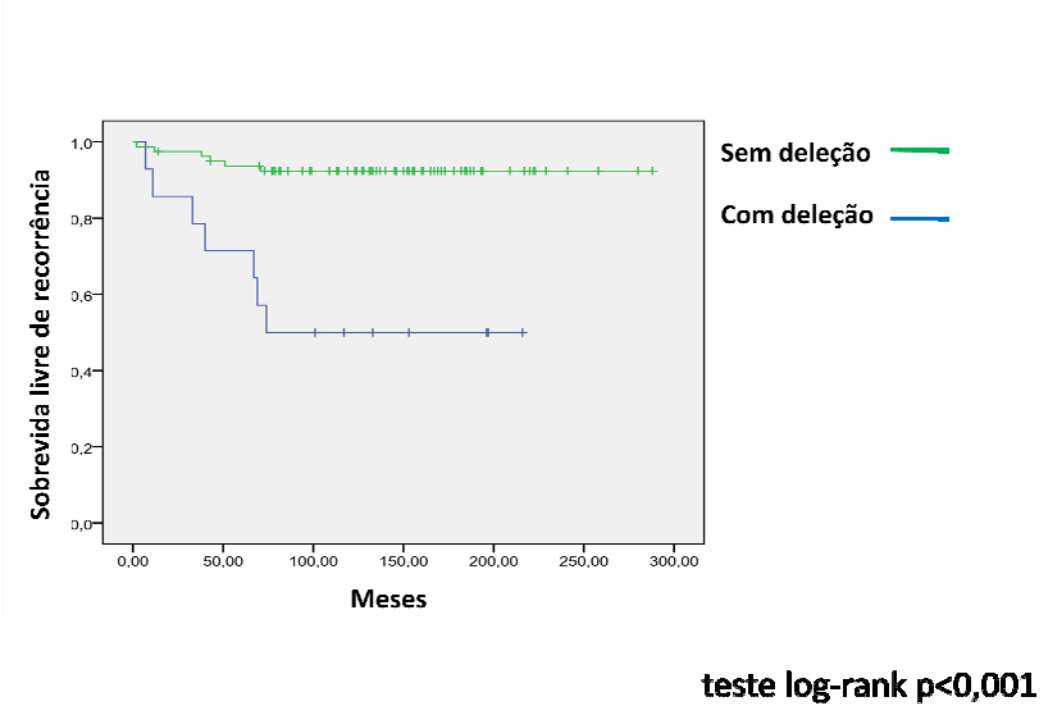
Gráfico 1. Sobrevida câncer-específica estimada da coorte de acordo com a presença (linha azul) ou ausência (linha verde) de deleção do cromossomo 9p.



teste log-rank p<0,001

Simultaneamente, houve 13 recorrências entre os 94 pacientes do estudo, sendo 7 no grupo de pacientes com deleção e 6 naqueles sem deleção do 9p (50% x 7,5%). A sobrevida livre de recorrência estimada em 5 e 10 anos foi respectivamente de 71,4% e 50% naqueles com deleção e de 93,7% e 92,4% naqueles sem deleção (teste log-rank p<0,001; gráfico 2).

Gráfico 2. Sobrevida livre de recorrência estimada da coorte de acordo com a presença (linha azul) ou ausência (linha verde) de deleção do cromossomo 9p.



Na análise multivariada pelo modelo de Cox (tabela 6), que incluiu a classificação pT [T1/T2 x T3/T4], Fuhrman [baixo x alto grau], necrose [ausente x presente], IMV [ausente x presente], tamanho [<7 x ≥7cm] e status do cromossomo 9p [sem x com deleção], na coorte dos 94 pacientes, apenas as variáveis tamanho e deleção do 9p tiveram efeito independente na sobrevida câncer-específica. Observou-se que pacientes com tumores ≥7cm têm um risco relativo de Cox 7 vezes maior de morrer do que aqueles que possuem tumores <7cm. Este risco é 28 vezes maior naqueles com deleção do 9p comparado aos tumores sem deleção.

Tabela 6. Análise multivariada (Modelo de Cox): sobrevida câncer-específica

Variáveis patológicas	Categoria	HR	IC 95%	*p*
Classificação do tumor	pT1/T2 x pT3/T4	0,22	0,20 – 0,47	0,222
Grau de Fuhrman	Baixo x alto	0,68	0,05 – 8,90	0,769
IMV	Ausente x presente	2,44	0,46 – 12,89	0,291
Necrose	Ausente x presente	2,98	0,43 – 20,34	0,265
Tamanho	<7cm x ≥ 7cm	7,23	1,29 – 40,3	0,024
Deleção do 9p	Sim x não	28,86	5,3 – 155,5	<0,001

HR indica *hazard ratio*; IC, intervalo de confiança

Por sua vez, na análise multivariada pelo modelo de Cox para sobrevida livre de recorrência (tabela 7), que incluiu as mesmas variáveis patológicas, novamente apenas tamanho e deleção do 9p foram preditores independentes. Houve associação significante entre IMV e sobrevida livre de recorrência à análise univariada (HR= 3,47; p=0,026), entretanto essa significância estatística foi perdida após análise multivariada.

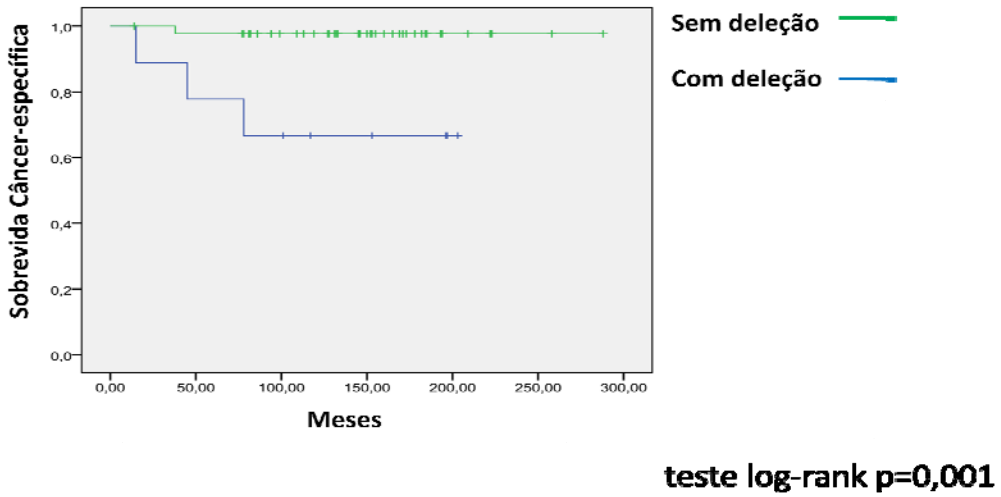
Tabela 7. Análise multivariada (Modelo de Cox): sobrevida livre de recorrência

Variáveis patológicas	Categoria	HR	IC 95%	*p*
Classificação do tumor	pT1/T2 x pT3/T4	0,89	0,18 – 4,37	0,891
Grau de Fuhrman	Baixo x alto	0,72	0,16 – 3,27	0,670
IMV	Ausente x presente	3,35	0,93 – 12,06	0,064
Necrose	Ausente x presente	1,41	0,33 – 5,92	0,636
Tamanho	<7cm x ≥ 7cm	10,13	2,74 – 37,47	0,001
Deleção do 9p	Sim x não	17,65	4,80 – 64,86	<0,001

HR indica *hazard ratio*; IC, intervalo de confiança

Examinando-se o subgrupo de pacientes de baixo risco, segundo a Tríade Patológica previamente descrita,[61] obteve-se para análise 53 pacientes com tumores menores que 7cm, sem IMV e com Fuhrman de baixo grau (1 e 2). Foi verificada a manutenção da diferença nas taxas de sobrevida câncer-específica e livre de recorrência ao serem estratificados quanto ao status da deleção do 9p. Nesses 53 casos, um terço dos pacientes (3/9) com deleção do 9p morreram, enquanto apenas 1 de 44 pacientes (2%) sem tal deleção assim evoluiram (p<0,01). Portanto, a sobrevida câncer-específica estimada em 5 e 10 anos foi significativamente diferente nestes dois grupos: respectivamente de 77,8 e 66,7% nos pacientes com a referida perda cromossômica e de 97,7% e 97,7% naqueles sem perda do 9p (teste log-rank p=0,001; gráfico 3).

Gráfico 3. Sobrevida câncer-específica estimada dos pacientes com tumores <7cm, sem IMV e com Fuhrman de baixo grau (I/II) de acordo com a presença (linha azul) ou ausência (linha verde) de deleção do cromossomo 9p.



De acordo com o modelo prognóstico da *Mayo Clinic* para CRCC (escore *SSIGN*), os pacientes do estudo foram assim classificados: 0-2, sessenta pacientes; 3-4, vinte e dois; 5-6, nove; 7-9, três; ≥10, nenhum caso. Já analisando-os pelo modelo da UCLA (UISS) para CRCC localizado, encontrou-se respectivamente 50, 36 e 8 pacientes de risco baixo, intermediário e alto. Desta forma, efetuou-se a análise de sobrevida daqueles com baixo risco de progressão segundo tais classificações: escore SSIGN 0-2 (n= 60 com incidência de 16,6% de deleção do 9p) e baixo risco UISS (n= 50 com 18% da deleção) de acordo com o status do cromossomo 9p – tabela 8. Assim, a sobrevida câncer-específica em 10 anos dos pacientes com deleção do 9p foi significativamente menor do que aqueles sem essa perda, tanto no grupo com baixo escore SSIGN (teste log-rank, p=0,001) quanto naqueles de baixo risco pelo UISS (teste log-rank, p=0,002).

Tabela 8. Sobrevida câncer-específica em pacientes de baixo risco, conforme status da deleção do cromossomo 9p

	Sobrevida câncer-específica	
	Em 5 anos	**Em 10 anos**
Escore SSIGN 0-2		
Todo o grupo	94,9%	93,2%
Subgrupo sem deleção do 9p*	98,0%	98,0%
Subgrupo com deleção do 9p*	80,0%	70,0%
Baixo risco UISS		
Todo o grupo	93,9%	91,8%
Subgrupo sem deleção do 9p**	97,5%	97,5%
Subgrupo com deleção do 9p**	77,8%	66,7%

*p= 0,001

**p= 0,002

5 DISCUSSÃO

A principal contribuição deste estudo foi identificar que os pacientes portadores de CRCC localizado (NX-0 M0) com deleção do cromossomo 9p têm maior chance de morrer pela doença. A deleção do 9p está presente também em tumores considerados de baixo risco pelos principais sistemas de estratificação atualmente existentes e é um marcador de recidivas e mortes imprevistas inclusive neste grupo especial.

Conhecimento sobre o status do cromossomo 9p, portanto, fornece informação clínica relevante adicional sobre o curso esperado não apenas dos pacientes com tumores renais localizados, mas também daqueles com risco baixo de progressão pelos seguintes sistemas prognósticos integrados: UISS da UCLA [57], SSIGN da *Mayo Clinic* [54] e Tríade Patológica da USP [61]. Desta forma, a deleção do 9p foi capaz de prever um comportamento agressivo do CRCC ainda num estágio bastante inicial.

Pesquisadores anteriores observaram a perda de regiões do cromossomo 9 em carcinomas renais e identificaram sua associação com tumores mais agressivos. Cairns et al. foram os primeiros a identificar a perda de heterozigosidade (LOH) do cromossomo 9p em tumores primários de rim, presente em 33% dos 42 pacientes estudados.[111] Posteriormente, suspeitou-se que tal deleção poderia ter relação com recidiva em tumores localmente avançados, num pequeno estudo contendo 37 pacientes, com seguimento médio de 39 meses.[124]

Em CRCC, perdas no 9p são encontradas em 14 a 36% dos casos,[96,111,124-128] sendo detectadas mais freqüentemente em carcinomas renais metastáticos, sugerindo que alterações nesta região contribuam para

a progressão tumoral.[125] Scraml et al., estudando 88 pacientes com CRCC encontraram LOH do cromossomo 9p em 24% e notaram a associação entre deleções no 9p e prognóstico desfavorável, na análise univariada, em pacientes estadio pT3.[126] Nesses casos, a sobrevida câncer-específica em 5 anos foi de 58% para aqueles sem deleção no 9p, enquanto todos os pacientes com deleções no 9p morreram da doença. Na análise multivariada, entretanto, LOH do 9p não foi um preditor independente de prognóstico ruim.

Mais recentemente, Brunelli et al.[114], utilizando a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência, avaliaram a perda do cromossomo 9p em 73 pacientes portadores de CRCC submetidos a nefrectomia radical, num seguimento médio de 45 meses. A sobrevida câncer-específica em 5 anos foi de 88% em pacientes sem perda do 9p e de 43% para aqueles com perda do 9p. Na análise multivariada, a perda do cromossomo 9p foi considerado fator preditivo independente. A presença de metástase linfonodal, metástase a distância e alto escore SSIGN também foram preditores significativos de sobrevida câncer-específica. Destaque-se nesta coorte, a presença de cerca de 7% de tumores N+, 10% de M+ e 20% de casos com escore SSIGN > 6.

Ao se analisar o perfil citogenético de pacientes submetidos à nefrectomia por CRCC, o grupo da UCLA identificou que algumas aberrações citogenéticas relacionavam-se com parâmetros patológicos e sobrevida câncer-específica, num seguimento médio de 25 meses.[96] A perda do cromossomo 9p foi encontrada em 40 tumores (16%) e estava associada

a estadio mais avançado (T3/4, 58% *vs.* 37%), maior propensão para metástases sistêmicas e pior grau de Fuhrman (grau 3/4, 63% *vs.* 42%). Também neste estudo, a perda do 9p foi fator prognóstico independente na análise multivariada. Segundo os autores, a magnitude desta informação prognóstica foi semelhante a saber se o paciente tinha linfonodos comprometidos pelo tumor. Juntamente com o estadio TNM e o grau de Fuhrman, a perda do cromossomo 9p compôs um nomograma prognóstico que predizia a sobrevida câncer-específica em 3 anos com acurácia de 89%.[96]

La Rochelle et al.[127] publicou posteriormente um estudo com achados semelhantes, num seguimento médio de 40 meses, em CRCC: incidência de deleção do cromossomo 9p de 14% e sua associação com pior grau nuclear, pior classificação pT e presença de metástases linfonodais e a distância. Nos pacientes estudados, que incluíam 32% dos casos com metástases sistêmicas na época da nefrectomia, a sobrevida câncer-específica média daqueles com e sem deleções do 9p foi de 37 e 82 meses, respectivamente. Entretanto, a grande contribuição adicional deste estudo foi detectar que a deleção do 9p aumentou a chance de recorrência mesmo no subgrupo de pacientes com tumores < 4cm.

O presente estudo é portanto o primeiro a investigar, numa série de pacientes com CRCC exclusivamente localizados (NX-0 M0), o efeito da deleção do cromossomo 9p na sobrevida câncer-específica em 10 anos. Isso foi possível devido ao longo seguimento desta coorte - 11,6 anos em média; o maior dentre todos os estudos sobre deleção do 9p e CRCC. Ao

limitar a predição de qualquer fator ou modelo prognóstico em 5 anos, não se considera os 15 a 19% dos pacientes que irão demonstrar progressão da doença somente após o 5º ano da nefrectomia por tumor localizado.[128,129] Outro ponto forte do nosso estudo consiste no fato de que todos os pacientes seguiram o mesmo protocolo de acompanhamento e todas as análises anatomo-patológicas e citogenéticas foram produzidas por uma única patologista.

Além disso, ao avaliar pacientes sem doença metastática (linfonodal ou sistêmica) na época da nefrectomia, verifica-se a real habilidade prognóstica desta deleção após a cirurgia para tumores patologicamente localizados. Em 10 anos, os pacientes deste estudo sem perda do cromossomo 9p tiveram sobrevida câncer-específica de 96%, enquanto aqueles com tal deleção de apenas 57%. Ressalte-se a inesperada semelhança entre estes dois grupos (tabela 5) encontrada em nossa coorte de características globais favoráveis – compreendida por tumores pT1 em 75% dos casos e Fuhrman de baixo grau (1/2) em 69% deles. Ao contrário dos estudos anteriores, a deleção do 9p não se relacionou com tumores de maior tamanho ou de maior grau, nem com pior estadio pT ou presença de necrose ou IMV. Assim, a perda do cromossomo 9p foi considerada fator prognóstico independente após análise multivariada em nosso estudo (HR= 28,86; $p<0,001$). Ainda mais, tal deleção foi o preditor mais importante de mortalidade câncer específica, superior a qualquer fator patológico analisado, inclusive ao tamanho tumoral.

Ao julgar um novo marcador, é importante analisá-lo após considerar a contribuição de outros. Em outras palavras, um novo marcador deve aprimorar a habilidade de predizer um resultado além do que pode ser alcançado com os atuais marcadores existentes. Para legitimar o custo de se obter informações moleculares na prática médica rotineira, os estudos devem avaliar não apenas a habilidade preditora deste novo marcador, mas também a sua utilidade à luz de todos os fatores de risco clínicos e patológicos conhecidos. E a deleção do cromossomo 9p traz informação prognóstica adicional independente destes outros fatores, inclusive nos tumores em estágio inicial, como demonstrado aqui.

O microarranjo tecidual ou *tissue microarray* (TMA) é uma técnica descrita em 1998 e, ao disponibilizar um bloco de parafina contendo centenas de amostras de tecidos tumorais numa forma ordenada, constitui-se uma poderosa ferramenta para a patologia investigativa aplicada. A crescente utilização do método pode ser evidenciada pelo aumento quase exponencial do número de artigos publicados ano após ano contendo a expressão "*tissue microarray*" entre seus descritores. Com o uso de métodos especiais em uma lâmina obtida do bloco de TMA, como a imunohistoquímica ou hibridização *in situ* com fluorescência, é possível conhecer a expressão de um determinado marcador em centenas de amostras ao custo de uma única reação.

O uso do TMA fornece ainda outras vantagens, entre elas: a análise de grandes casuísticas em curto espaço de tempo, economia significativa de tecidos (devido à pequena amostra empregada) permitindo que as amostras

originais estejam disponíveis para estudos futuros, melhor padronização técnica das reações empregadas, simplificação do trabalho nas linhas de pesquisa pela utilização do bloco em mais de um projeto, possibilidade de repetição das reações em múltiplos níveis do bloco.[116]

Uma desvantagem seria a representação ausente ou inadequada quando se trata de neoplasia heterogênea. Importante lembrar que a avaliação é limitada em relação a um caso específico, já que o método é voltado ao estudo de populações.

A hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) é uma técnica que permite identificar ao microscópio a ausência, presença e quantidade de seguimentos cromossômicos específicos, através de sondas de DNA marcadas com fluorocromos. Por isso, sua maior aplicabilidade tem sido no diagnóstico de determinadas anomalias congênitas como as aneuploidias e, especialmente, no estudo de neoplasias. A utilização do FISH tem grande importância na definição do diagnóstico, prognóstico e tratamento em doenças como leucemias, câncer de mama e pulmão. Em Urologia, passou a ter destaque com o uso do Urovysion[122] na detecção do câncer de bexiga inicial ou recorrente. No entanto, os custos atuais (de equipamento e consumíveis, como as sondas) e a pouca disponibilidade de centros com pessoal especializado ainda são fatores limitantes para sua utilização em escala global. Apesar da técnica ser aplicada com excelente reprodutibilidade para o estudo de um caso isolado em amostras de sangue, medula óssea, urina e tecidos sólidos parafinados, seu emprego em TMA,

especialmente para o estudo da deleção do cromossomo 9p, ainda não está padronizado.

Entretanto, a crescente demanda pelo método possivelmente proporcionará tanto a diminuição dos custos quanto a padronização da técnica em TMA. Poderá também aumentar a disponibilidade de profissionais experientes para sua execução e de equipamentos para leitura automatizada de resultados. Tal como foi visto a evolução da imunohistoquímica no final do século passado, presenciaremos o desenvolvimento da patologia molecular e citogenética nos próximos anos e décadas.

Comparando-se estas técnicas, existem duas principais vantagens do FISH sobre a imunohistoquímica.[130,131] A primeira é a maior facilidade em sintetizar sondas específicas marcadas do que produzir anticorpos monoclonais ou policlonais. A segunda é que o FISH possui maior sensibilidade e especificidade, pois não sofre influência da grande variação de sensibilidade e especificidade entre os kits comerciais de anticorpos disponíveis, além da imunohistoquímica ser mais propensa a erros de fixação e processamento do tecido que podem levar a resultados equivocados com marcações inespecíficas ou falso-negativos.[130,131]

O(s) gene(s) no cromossomo 9p que, quando deletado ou de outra forma inativado, confere este comportamento mais agressivo ao CRCC ainda é incerto. A progressão tumoral seria o resultado da perda de genes supressores tumorais no 9p.

Tais genes são aqueles que, em condições normais, codificam proteínas que modulam o processo de divisão celular. Nos tumores, a função dos genes supressores tumorais está diminuída, seja por alterações qualitativas ou quantitativas. A principal alteração qualitativa é a mutação, que muitas vezes leva à síntese de uma proteína anômala, com função alterada. Outra alteração frequente é a metilação, fenômeno que faz com que o gene fique silenciado, deixando de ser expresso na célula em questão. A alteração quantitativa mais frequente é a deleção do próprio gene, como ocorreria com o(s) suposto(s) gene(s) no cromossomo 9p em alguns casos de CRCC. E existem alguns candidatos.

O gene supressor tumoral CDKN2A/ARF, localizado na região 9p21, codifica duas importantes proteínas reguladoras do ciclo celular: p16 e p14.[132,133] A proteína p16 é uma quinase inibidora dependente da ciclina D que bloqueia a progressão de G1 para a fase S do ciclo celular, através da via do retinoblastoma (Rb/E2F).[132,133] O gene supressor tumoral *Rb* está localizado no cromossomo 13 e codifica a proteína Rb (normal) que sequestra e altera a função dos fatores de transcrição E2F que controlam a expressão de diversos genes, cujos produtos estimulam a progressão da célula de G1 para a fase S. Desta forma, o ciclo celular é inibido.[134,135] Este circuito (via do retinoblastoma) pode ter seu funcionamento alterado por diversos mecanismos genéticos e bioquímicos alternativos, em vários tipos de cânceres.[135] A proteína p16 regula a fosforilação e promove o funcionamento normal da proteína Rb.[132,133]

Por sua vez, a proteína p14 também atua regulando o ciclo celular, porém através da via do p53.[132,133] O gene *p53* está localizado no cromossomo 17 e codifica a proteína p53 (normal) que causa a expressão de genes cujos produtos inibem o ciclo celular na fase G1. Assim, em células normais, este importante gene impede o crescimento celular em resposta a certos danos bioquímicos e moleculares até que ele possa ser reparado, além de induzir apoptose quando há dano irreversível no DNA.[134,135] Esta via supressora tumoral é igualmente alterada na maioria dos cânceres em humanos, se não em todos.[135] A proteína p14 é um inibidor do mdm2, molécula que promove a degradação prematura da proteína p53. Assim, p14 permite o acúmulo e função normal do p53.[132,133]

Em resumo, a perda do gene supressor tumoral CDKN2A por deleção do cromossomo 9p atua estimulando irrestritamente o ciclo celular através da desregulação das vias do Rb e do p53. Há várias formas das células tumorais escaparem do *checkpoint* G1 do ciclo celular, mas a inativação simultânea de Rb e p53 é muito mais agressiva do que a perda de função de um ou outro isoladamente (sinergismo).[136-138]

Na mesma região, 9p21, situa-se o gene supressor tumoral CDKN2B que codifica a proteína p15. Ela é, assim como p14, uma quinase inibidora dependente da ciclina D que regula o ciclo celular através da via do Rb, igualmente bloqueando a progressão do ciclo celular em G1.[139] Um dos meios de atuação da citocina TGF-β como fator anticrescimento celular é estimulando a expressão do gene CDKN2B.[134] A perda de p15 por deleção

do cromossomo 9p, portanto, forneceria liberdade adicional para a célula evadir do *checkpoint* G1 do ciclo celular.

O gene da anidrase carbônica IX (CA-IX) também está localizado no cromossomo 9p. Tem sido demonstrado que baixa expressão de CA-IX prediz menor sobrevida entre pacientes com CRCC metastático;[65,140] consequentemente, deleções no 9p poderiam causar baixa expressão de CA-IX e pior prognóstico.

Além disso, os genes do interferon alfa (IFN-α) e beta (IFN-β) estão localizados no cromossomo 9p e sabe-se que análogos exógenos do IFN-α têm algum papel no tratamento do CRCC metastático.[127] Deste modo, a deleção do 9p implicaria na perda de mecanismos imunológicos antitumorais importantes.

Todas essa evidências sugerem que a inativação de genes supressores tumorais no cromossomo 9p, assim como de genes essenciais na regulação do pH intra/extracelular e na imunidade contra tumores, seja um evento crítico na patogênese e progressão do CRCC.

A história natural do CR encontra-se atualmente imprevisível em vários casos. Por exemplo: a) apesar da existência de doença patologicamente localizada à época da nefrectomia, 10 a 28% destes pacientes terão recorrência local ou a distância do CR.[52,53,57]; b) entre 4% e 7% dos pacientes com tumores ≤4cm apresentam metástases à apresentação inicial e estão em elevado risco de morrerem pela doença.[141] c) simultaneamente, até 40% dos pacientes com metástases linfonodais diagnosticadas na nefrectomia estarão vivos depois de 5 anos da cirurgia.[142]

Diversas abordagens têm sido propostas para tentar determinar a evolução do CR tratado e distinguir mais precisamente entre pacientes de prognóstico favorável e desfavorável.

Historicamente, os sistemas de estadiamento do CR têm se baseado em informações anatomo-patológicas. O primeiro deles foi o Sistema de Robson, publicado em 1969,[143] e substituído pelo TNM há poucas décadas. Há cerca de 10 anos, foram sendo produzidos, em grandes centros norte-americanos, sistemas de estadiamento que combinavam outros fatores patológicos e clínicos ao TNM,[52-54,57] uma vez que prediziam a evolução da doença tratada com melhor acurácia do que o TNM isoladamente. Concomitantemente, também destacavam o CRCC dos demais subtipos histológicos de CR para uma análise mais precisa e específica.

Estes modelos prognósticos, que foram criados fundamentando-se numa população com altas porcentagens de tumores avançados (operados nas décadas de 80 e 90), agora podem não ser tão eficazes em estratificar o risco de progressão nos pacientes contemporâneos que tendem a se apresentar com doença localizada. Faz-se necessário, portanto, estratificar melhor o crescente número de pacientes que atualmente são considerados como de “baixo” risco pelos modelos presentes, visto que este grupo tem se tornado cada vez mais heterogêneo.

Nesse sentido, o emprego de biomarcadores se mostrará fundamental. Com o progresso feito no entendimento da biologia molecular do CR e a descoberta de novos biomarcadores, o desafio atual será agregá-los aos

modelos de estadiamento existentes para permitir a determinação de um prognóstico mais apurado.[144,145]

E esta integração já começa a dar seus primeiros passos. Kim et al. desenvolveram um modelo híbrido que associa marcadores moleculares com o UISS.[146] Inicialmente os autores analisaram 8 biomarcadores (gelsolina, p53, CA-IX, Ki-67, vimentina, CA-XII, EpCAM e PTEN) pelo seu potencial para funcionar como fator prognóstico. Após análise multivariada, concluíram que CA-IX, vimentina e p53 eram preditores independentes de sobrevida câncer-específica. Posteriormente, os agregaram ao pTNM e ECOG *performance status* na montagem de um modelo que melhorou a habilidade prognóstica do UISS isoladamente (índice de concordância de 0,79 e 0,75 respectivamente). Considerando que o UISS originalmente inclui o grau nuclear de Fuhrman, enquanto seu novo modelo combinado não, pode-se questionar se a expressão tumoral dos marcadores moleculares selecionados não estaria apenas servindo como substituto de um componente patológico próprio do UISS. Como dito anteriormente, um novo marcador deve aperfeiçoar a capacidade de prever a progressão da doença que é atualmente conseguida com os fatores clínico-patológicos disponíveis. Um novo marcador que meramente substitui um outro existente – extensamente validado e disponível a baixo custo – provavelmente não terá utilidade. Outra ressalva é que a coorte analisada consistiu de 150 pacientes com CRCC metastático submetidos à nefrectomia, anteriormente à imunoterapia. Isso limita a aplicabilidade do modelo híbrido proposto como preditor de progressão da doença após a cirurgia para tumores localizados. De qualquer forma, Kim et

al. concebem um novo paradigma no estudo de fatores prognósticos em CR ao utilizar biomarcadores para melhorar a habilidade prognóstica de modelos clínico-patológicos bem estabelecidos.

Mais recentemente, o grupo da *Mayo Clinic* desenvolveu também uma abordagem combinada na qual o desfecho dos pacientes com CRCC, conhecido através de critérios clínicos e patológicos, pôde ser aprimorado com base em informações moleculares, colhidas no tecido tumoral por imunohistoquímica.[147] Os autores desenvolveram o chamado *Bioscore*, sistema que leva em consideração a expressão tumoral de B7-H1, survinina e Ki-67 de forma ponderada. O cálculo é feito da seguinte forma: B7-H1 negativo receberia 0 ponto e positivo 2 pontos; survinina baixa (<15 células tumorais positivas para survinina por mm^2) 0 ponto e alta (≥15) 3 pontos; Ki-67 baixo (<50 células tumorais positivas para Ki-67 por mm^2) 0 ponto e alto (≥50) 2 pontos. Desta forma, de acordo com a soma dos pontos, existiriam dois grupos: aqueles com 0, 2 ou 3 pontos (*BioScore* baixo) e aqueles com 4, 5 e 7 pontos (*BioScore* alto), sendo que estes têm 5x mais chance de morrer por CRCC do que aqueles (HR 5,03; IC 95% 3,82 - 6,61; p<0,001). A integração do *BioScore* aos modelos UISS e SSIGN em pacientes com CRCC (n= 634, de todos os estágios) aumentou as suas respectivas acurácias em 4,5% e 1,6%. Na análise de subgrupos, entretanto, o *BioScore* não forneceu benefício algum para pacientes com baixo risco de morte câncer-específica, assim definidos pelo grau nuclear, UISS ou SSIGN.

Apesar das limitações do presente estudo – retrospectivo e com dados de um único centro – foi possível correlacionar a deleção do

cromossomo 9p com mortalidade câncer-específica nestes pacientes de baixo risco, segundo a Tríade Patológica da USP, UISS da UCLA e escore SSIGN da *Mayo Clinic*.

Nos pacientes com tumores menores que 7cm, sem IMV e com grau nuclear 1 ou 2, a sobrevida câncer-específica em 10 anos foi de 97,7% naqueles sem perda do 9p e de 66,7% nos pacientes com a deleção do 9p. Resultados semelhantes e também significantes foram encontrados nos grupos com UISS de baixo risco e escore SSIGN baixo (0-2): respectivamente, 97,5% e 98% nos pacientes sem a deleção, e de 66,7% e 70% naqueles com deleção. Isso demonstra a capacidade da perda do 9p de identificar, dentre os pacientes que inicialmente deveriam ter excelente prognóstico, aqueles que morreram pela doença. Um marcador que se relaciona com recidiva e mortalidade ainda num estágio inicial tem grande valor para o prognóstico e tratamento de qualquer tipo de câncer, e este é o caso da deleção do cromossomo 9p e o CRCC. Ainda mais, nos pacientes com baixo risco de progressão da doença, a ausência de deleção do 9p também fornece informação importante. Nestes casos, as sobrevidas câncer-específicas em 5 e 10 anos (por qualquer dos três modelos) são idênticas, mantendo-se próximas a 100%, o que sugere a possibilidade de diminuição do tempo de seguimento pós-operatório nesta situação.

A deleção do 9p se apresenta como um bom candidato para integrar novos modelos prognósticos ou incorporar-se a sistemas já bem estabelecidos e validados. É verdade que parâmetros clínicos e patológicos já não são mais suficientes para estabelecer precisamente o prognóstico de

todos os tipos de pacientes com CRCC? Nosso estudo responde afirmativamente. No entanto, estudos multicêntricos e com maior número de pacientes serão necessários para validar a investigação rotineira da deleção do 9p na prática clínica de modo incontestável.

Naturalmente, por exigir a avaliação histopatológica de uma amostra tumoral, como a maioria dos biomarcadores disponíveis, a deleção do 9p tem limitações. Não tem utilidade na vigilância direta da doença tratada, assim como na monitorização da resposta a possível tratamento adjuvante. Para isso, será necessário identificar marcadores moleculares séricos, como por exemplo o PSA, de grande valor para estas finalidades em casos de câncer de próstata.

Por outro lado, o estudo da deleção do cromossomo 9p teria uma vantagem teórica sobre os outros biomarcadores teciduais. Enquanto os investigadores tentam agrupar um conjunto de marcadores moleculares para integrá-los aos modelos prognósticos atuais,[146,147] a informação provida simplesmente pela deleção do 9p supriria a necessidade de associar mais de um marcador para este propósito. Afinal, como mencionado anteriormente, essa perda genética envolve a deleção de pelo menos dois genes supressores tumorais (CDKN2A e CDKN2B) e genes essenciais no controle do pH intra/extracelular (CA-IX) e na imunidade contra tumores (IFN-α e IFN-β). Um único estudo que teoricamente disponibiliza informações sobre 5 biomarcadores simultaneamente reduziria de forma substancial os custos envolvidos nesse processo de aperfeiçoamento dos modelos prognósticos pós-operatórios.

Outro cenário no qual o estudo do 9p teria importante aplicação seria em biópsias renais para a avaliação de massas renais pequenas. Pesquisadores da UCLA já demonstraram que tumores <4cm têm maior chance de recorrência após tratamento quando deletados do 9p, independentemente de outras variáveis.[127] O achado de deleção do 9p neste grupo também esteve significativamente associado à presença de metástases sistêmicas e linfonodais (23% *versus* 7,5%, p=0,03). Atualmente não há fatores prognósticos pré-operatórios confiáveis que possam ser usados para prever com segurança o potencial maligno destes tumores pequenos, o que deixa pouco a servir como fundamento para a decisão de tratamento imediato ou de vigilância ativa.[127,148,149] Conforme demonstrado por La Rochele et al.[127] e por este trabalho, tumores pequenos e de "baixo risco", mas deletados do 9p, não são bons candidatos para observação.

O que dizer a pacientes com tumores renais malignos de bom prognóstico após suposta cirurgia curativa ao desenvolverem recidiva inesperada, particularmente quando defrontados com terapias de resgate ainda limitadas? Como tal, um avanço primordial no manuseio destes pacientes será apontar mais precisamente o risco pós-operatório individual para recorrência e progressão tumoral. Com este dado, seria possível formular melhores esquemas de seguimento após a cirurgia, além de estimular e direcionar estudos clínicos que testassem agentes terapêuticos de forma adjuvante. Afinal, o sucesso dos estudos sobre adjuvância em carcinoma renal depende tanto da eficácia da droga sendo estudada quanto da correta alocação dos pacientes, ou seja, arrolar aqueles verdadeiramente

de alto risco para progressão da doença. Haveria também um segundo benefício ao serem desenvolvidas novas terapias de alvo molecular, a partir deste conhecimento sobre as vias moleculares de progressão do câncer de rim. Por estes motivos, nossos pacientes necessitam de cada vez mais estudos sobre a deleção do cromossomo 9p em carcinoma renal.

6 CONCLUSÕES

Demonstramos que a deleção do cromossomo 9p é marcador independente de recidiva e morte em pacientes portadores de CRCC localizado submetidos à nefrectomia com intuito curativo.

Identificamos que tal deleção está associada também com maior risco de morte câncer-específica nos portadores de CRCC localizado de baixo risco, segundo critérios da USP, UCLA e *Mayo Clinic*.

7 ANEXOS

7.1 Anexo A: Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:..... .....

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 (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

ESTUDO DA DELEÇÃO DO CROMOSSOMO 9p E DO LOCUS 9p21 COMO FATOR PROGNÓSTICO NO CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS.

1. PESQUISADOR PRINCIPAL: Dr. Marcos Francisco Dall'oglio

CARGO/FUNÇÃO: Médico, Chefe do Departamento de Urologia Oncológica

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: Nº 84860

2. UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Cirurgia, Disciplina de Urologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO □ RISCO MÉDIO □

RISCO BAIXO X RISCO MAIOR □

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

1 – O objetivo desse estudo é analisar algumas características do seu tumor e se elas influenciam na evolução da sua doença.

2 – O procedimento cirúrgico a que o senhor foi submetido já é padronizado no tratamento do câncer de rim e, apenas utilizaremos informações de como foi a sua cirurgia.

3 – Não será necessário fazer nenhum procedimento adicional.

4 – Portanto esta pesquisa não lhe traz nenhum desconforto e nenhum risco.

5 – Não há benefício direto para o senhor, somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício para os pacientes.
6 – Como não há procedimentos adicionais a serem feitos, não existem procedimentos alternativos.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Marcos Francisco Dall'oglio, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 255- 7° andar, sala 710-F, telefone (011) 3069 – 8080. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br
8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: "Estudo da deleção do cromossomo 9p e do locus 9p21 como fator prognóstico no carcinoma renal de células claras". Eu discuti com o Dr. Daniel de Oliveira Gomes sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ___/___/___

Assinatura da testemunha Data ___/___/___

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo

---

Dr. Daniel de Oliveira Gomes
(Médico executante do estudo) Data ___/___/___

7.2 Anexo B: Parecer da CAPPesq

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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 09/06/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0177/10**, intitulado: "**ESTUDO DA DELEÇÃO DO CROMOSSOMO 9P E DO LOCUS 9P21 COMO FATOR PROGNÓSTICO NO CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS**" 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").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Marcos Francisco Dall´Oglio**
Pesquisador (a) Executante: **Daniel de Oliveira Gomes**

CAPPesq, 09 de Junho de 2010

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, 225, 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

8 REFERÊNCIAS

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin 2013; 63(1): 11-30.

2. Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Program [Internet]. Age adjusted SEER incidence rates by cancer site, all ages, all races, both sexes - 1992-2009. [citado set. 2012]. Disponível em: http://seer.cancer.gov/faststats.

3. National Cancer Institute.Cancer topics: Kidney cancer [Internet]. Estimated new cases and deaths from kidney (renal cell and renal pelvis) cancer in the United States in 2013 [citado mar. 2013]. Disponível em: http://www.cancer.gov/cancertopics/types/kidney.

4. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. Eur J Cancer 2010; 46(4): 765-81.

5. Wunsch-Filho V. Insights on diagnosis, prognosis and screening of renal cell carcinoma. Sao Paulo Med J 2002; 120: 163-4.

6. Nardi AC, Zequi SC, Clark OA, Almeida JC, Glina S. Epidemiologic characteristics of renal cell carcinoma in Brazil. Int Braz J Urol 2010; 36(2): 151-8.

7. Heindenreich A, Ravery V. Preoperative imaging in renal cell cancer. World J Urol 2004; 22(5): 307-15.

8. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. N Engl J Med 2005; 353(23): 2477-90.

9. Hutson TE, Quinn DI. Cytokine therapy: a standard of care for metastatic renal cell carcinoma? Clin Genitourin Cancer 2005; 4(3): 181-6.

10. Mancuso A, Sternberg CN. What's new in the treatment of metastatic kidney cancer? BJU Int 2005; 95: 1171-80.

11. Motzer RJ, Bukowski RM. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. J Clin Oncol 2006; 24(35): 5601-8.

12. Molina AM, Motzer RJ. Current algorithms and prognostic factors in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. Clin Genitourin Cancer 2008; 6(Suppl1): 7-13.

13. Bellmunt J, Flodgren P, Roigas J,Oudard S. Optimal management of metastatic renal cell carcinoma: an algorithm for treatment. BJU Int 2009; 104(1):10-8

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

15. Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ. The Heidelberg classification of renal cell tumours. J Pathol 1997; 183: 131-3.

16. Klatte T, Pantuck AJ, Kleid MD. Understanding the natural biology of kidney cancer : implications for targeted cancer therapy. Rev Urol 2007; 9: 47-56.

17. Gnarra J.R., Tory K., Weng Y., Schmidt R., et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. Nat Genet 1994; 7(1): 85-90.

18. George DJ, Kaelin WG. The von Hippel-Lindau protein, vascular endothelial growth factor and kidney cancer. N Engl J Med 2003; 349: 419-21.

19. Horton WA, Wong V, Eldridge R. Von Hippel-Lindau disease: clinical and pathological manifestations in nine families with 50 affected members. Arch Intern Med 1976; 136(7): 769-77.

20. Lane BR, Kattan MW. Prognostic models and algorithms in renal cell carcinoma. Urol Clin North Am 2008; 35(4): 613-25.

21. Kontak JA, Campbell SC. Prognostic factors in renal cell carcinoma. Urol Clin North Am 2003; 30(3): 467-80.

22. Leibovich BC, Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Frank I, Kwon ED, Merchan JR, Blute ML. A scoring algorithm to predict survival for patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma: a stratification tool for prospective clinical trials. J Urol 2005; 174(5): 1759-63.

23. Campbell SC, Lane BR. Malignant renal tumors. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. *Campbell-Walsh Urology - 10th ed.* Philadelphia: Saunders; 2012. p.1444.

24. 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; 24: 3101-6.

25. Ficarra V, Guillè F, Schips L, de la Taille A, Prayer Galetti T, Tostain J, Cindolo L, Novara G, Zigeuner R, Bratti E, Li G, Altieri V, Abbou CC, Zanolla L, Artibani W, Patard JJ. Proposal for revision of the TNM classification system for renal cell carcinoma. Cancer 2005; 104(10): 2116-23.

26. Frank I, Blute ML, Leibovich BC, Cheville JC, Lohse CM, Zincke H. Independent validation of the 2002 American Joint Committee on

cancer primary tumor classification for renal cell carcinoma using a large, single institution cohort. J Urol 2005; 173(6): 1889-92.

27. Leibovich BC, Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Kwon ED, Frank I, Thompson RH, Blute ML. Cancer specific survival for patients with pT3 renal cell carcinoma-can the 2002 primary tumor classification be improved? J Urol 2005; 173(3): 716-9.

28. Thompson RH, Cheville JC, Lohse CM, Webster WS, Zincke H, Kwon ED, Frank I, Blute ML, Leibovich BC. Reclassification of patients with pT3 and pT4 renal cell carcinoma improves prognostic accuracy. Cancer 2005; 104(1): 53-60.

29. Thompson RH, Leibovich BC, Cheville JC, Lohse CM, Frank I, Kwon ED, Zincke H, Blute ML. Should direct ipsilateral adrenal invasion from renal cell carcinoma be classified as pT3a? J Urol 2005; 173(3): 918-21.

30. Sandock DS, Seftel AD, Resnick MI. Adrenal metastases from renal cell carcinoma: role of ipsilateral adrenalectomy and definition of stage. Urology 1997; 49(1): 28-31.

31. Siemer S, Lehmann J, Loch A, Becker F, Stein U, Schneider G, Ziegler M, Stöckle M. Current TNM classification of renal cell carcinoma evaluated: revising stage T3a. J Urol 2005; 173(1): 33-7.

32. Hatcher PA, Anderson EE, Paulson DF, Carson CC, Robertson JE.Surgical management and prognosis of renal cell carcinoma invading the vena cava. J Urol 1991; 145(1): 20-3.

33. Zini L, Destrieux-Garnier L, Leroy X, Villers A, Haulon S, Lemaitre L, Koussa M.Renal vein ostium wall invasion of renal cell carcinoma with an inferior vena cava tumor thrombus: prediction by renal and vena caval vein diameters and prognostic significance. J Urol 2008; 179(2): 450-4.

34. Patard JJ, Dorey FJ, Cindolo L, Ficarra V, De La Taille A, Tostain J, Artibani W, Abbou CC, Lobel B, Chopin DK, Figlin RA, Belldegrun AS, Pantuck AJ. Symptoms as well as tumor size provide prognostic information on patients with localized renal tumors. J Urol 2004; 172(6): 2167-71.

35. Cheville JC, Blute ML, Zincke H, Lohse CM, Weaver AL. Stage pT1 conventional (clear cell) renal cell carcinmoa: pathological features associated with cancer specific survival. J Urol 2001; 166(2): 453-6.

36. Lane BR, Gill IS. 5-Year outcomes of laparoscopic partial nephrectomy. J Urol 2007; 177(1):70-4.

37. Crispen PL, Boorjian SA, Lohse CM, Sebo TS, Cheville JC, Blute ML, Leibovich BC. Outcomes following partial nephrectomy by tumor size. J Urol 2008; 180(5): 1912-7.

38. Thompson RH, Leibovich BC, Cheville JC, Webster WS, Lohse CM, Kwon ED. Is renal sinus fat invasion the same as perinephric fat invasion for pT3a renal cell carcinoma? J Urol 2005; 174: 1218-21.

39. Bassil B, Dosoretz DE, Prout GR Jr. Validation of the tumor, nodes and metastasis classification of renal cell carcinoma. J Urol 1985; 134(3): 450-4.

40. Phillips CK, Taneja SS. The role of lymphadenectomy in the surgical management of renal cell carcinoma. Urol Oncol 2004; 22(3): 214-23.

41. Bretheau D, Lechevallier E, de Fromont M, Sault MC, Rampal M, Coulange C. Prognostic value of nuclear grade of renal cell carcinoma. Cancer 1995; 76(12): 2543-9.

42. Lohse CM, Cheville JC. A review of prognostic pathologic features and algorithms for patients treated surgically for renal cell carcinoma. Clin Lab Med 2005; 25(2): 433-64.

43. Lang H, Lindner V, de Fromont M, Molinié V, Letourneux H, Meyer N, Martin M, Jacqmin D. Multicenter determination of optimal interobserver agreement using the Fuhrman grading system for renal cell carcinoma: Assessment of 241 patients with > 15-year follow-up.Cancer 2005; 103(3): 625-9.

44. Gudbjartsson T, Hardarson S, Petursdottir V, Thoroddsen A, Magnusson J, Einarsson GV. Histological subtyping and nuclear grading of renal cell carcinoma and their implications for survival: a retrospective nation-wide study of 629 patients. Eur Urol 2005; 48: 593-600.

45. Van Poppel H, Vandendriessche H, Boel K, Mertens V, Goethuys H, Haustermans K, Van Damme B, Baert L. Microscopic vascular invasion is the most relevant prognosticator after radical nephrectomy for clinically nonmetastatic renal cell carcinoma. J Urol 1997; 158(1): 45-9.

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

47. Kroeger N, Rampersaud EN, Patard JJ, Klatte T, Birkhäuser FD, Shariat SF, Lang H, Rioux-Leclerq N, Remzi M, Zomorodian N, Kabbinavar FF, Belldegrun AS, Pantuck AJ. Prognostic value of microvascular invasion in predicting the cancer specific survival and

risk of metastatic disease in renal cell carcinoma: a multicenter investigation. J Urol 2012; 187(2): 418-23.

48. Janzen NK, Kim HL, Figlin RA, Belldegrun AS. Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease. Urol Clin North Am. 2003; 30: 843-852.

49. Cindolo L, Patard JJ, Chiodini P, et al. Comparison of predictive accuracy of 4 prognostic models for nonmetastatic renal cell carcinoma after nephrectomy: a multicenter European study. Cancer 2005; 104: 1362-1371.

50. Cindolo L, de la Taille A, Messina G, et al. A preoperative clinical prognostic model for nonmetastatic renal cell carcinoma. BJU Int 2003; 92: 901-5.

51. Yaycioglu O, Roberts WW, Chan T, Epstein JI, Marshall FF, Kavoussi LR. Prognostic assessment of nonmetastatic renal cell carcinoma: a clinically based model. Urology 2001; 58: 141-5.

52. Kattan MW, Reuter V, Motzer RJ, Katz J, Russo P. A postoperative prognostic nomogram for renal cell carcinoma. J Urol 2001; 166(1): 63-7.

53. 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; 173(1): 48-51.

54. Frank I, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score. J Urol 2002; 168(6): 2395-400.

55. Ficarra V, Martignoni G, Lohse C, Novara G, Pea M, Cavalleri S, Artibani W. External validation of the Mayo Clinic Stage, Size, Grade and Necrosis (SSIGN) score to predict cancer specific survival using a European series of conventional renal cell carcinoma. J Urol 2006; 175(4): 1235-9.

56. Fujii Y, Saito K, Iimura Y, Sakai Y, Koga F, Kawakami S, Kumagai J, Kihara K. External validation of the Mayo Clinic cancer specific survival score in a Japanese series of clear cell renal cell carcinoma. J Urol 2008; 180(4): 1290-5.

57. Zisman A, Pantuck AJ, Wieder J, Chao DH, Dorey F, Said JW, deKernion JB, Figlin RA, Belldegrun AS. Risk group assessment and clinical outcome algorithm to predict the natural history of patients with surgically resected renal cell carcinoma. J Clin Oncol 2002; 20(23): 4559-66.

58. Ng CF, Wan SH, Wong A, Lai FM, Hui P, Cheng CW. Use of the University of California Los Angeles Integrated Staging System (UISS) to predict survival in localized renal cell carcinoma in an Asian population. Int Urol Nephrol 2007; 39(3): 699-703.

59. Cindolo L, Chiodini P, Gallo C, Ficarra V, Schips L, Tostain J, de La Taille A, Artibani W, Patard JJ. Validation by calibration of the UCLA integrated staging system prognostic model for nonmetastatic renal cell carcinoma after nephrectomy. Cancer 2008; 113(1): 65-70.

60. Patard JJ, Kim HL, Lam JS, Dorey FJ, Pantuck AJ, Zisman A, Ficarra V, Han KR, Cindolo L, De La Taille A, Tostain J, Artibani W, Dinney CP, Wood CG, Swanson DA, Abbou CC, Lobel B, Mulders PF, Chopin DK, Figlin RA, Belldegrun AS. 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; 22(16): 3316-22.

61. 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; 178: 425-8.

62. 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; 173: 1496-501.

63. Ljungberg B. Prognostic markers in renal cell carcinoma. Curr Opin Urol 2007; 17: 303-8.

64. McGuire BB, Fitzpatrick JM. Biomarkers in renal cell carcinoma. Curr Opin Urol 2009; 19: 441-6.

65. Bui MH, Seligson D, Han KR, Pantuck AJ, Dorey FJ, Huang Y, Horvath S, Leibovich BC, Chopra S, Liao SY, Stanbridge E, Lerman MI, Palotie A, Figlin RA, Belldegrun AS. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. Clin Cancer Res 2003; 9(2): 802-11.

66. 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; 100(3): 556-60.

67. 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; 25(30): 4757-64.

68. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. Kidney Int 1999; 56(3): 794-814.

69. Mizukami Y, Kohgo Y, Chung DC. Hypoxia inducible factor-1 independent pathways in tumor angiogenesis. Clin Cancer Res 2007; 13(19): 5670-4.

70. Phuoc NB, Ehara H, Gotoh T, Nakano M, Kamei S, Deguchi T, Hirose Y. Prognostic value of the co-expression of carbonic anhydrase IX and vascular endothelial growth factor in patients with clear cell renal cell carcinoma. Oncol Rep 2008; 20(3): 525-30.

71. Jacobsen J, Rasmuson T, Grankvist K, Ljungberg B. Vascular endothelial growth factor as prognostic factor in renal cell carcinoma. J Urol 2000; 163(1): 343-7.

72. Dordevic G, Matusan-Llijas K, Barbarovic E. Hypoxia inducible factor-1 alpha correlates with vascular endothelial growth factor A and C indicating worse prognosis in clear cell renal cell carcinoma. J Exp Clin Cancer Res 2009; 28:40.

73. 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; 31: 13-20.

74. Visapää H, Bui M, Huang Y, Seligson D, Tsai H, Pantuck A, Figlin R, Rao JY, Belldegrun A, Horvath S, Palotie A. Correlation of Ki-67 and gelsolin expression to clinical outcome in renal clear cell carcinoma. Urology 2003; 61(4): 845-50.

75. Delahunt B, Bethwaite PB, Thornton A, Ribas JL. Proliferation of renal cell carcinoma assessed by fixation-resistant polyclonal Ki-67 antibody labeling. Correlation with clinical outcome. Cancer 1995; 75(11): 2714-9.

76. 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; 18(3): 894-900.

77. Rioux-Leclercq N, Turlin B, Bansard J, Patard J, Manunta A, Moulinoux JP, Guillé F, Ramée MP, Lobel B. Value of immunohistochemical Ki-67 and p53 determinations as predictive factors of outcome in renal cell carcinoma. Urology 2000; 55(4): 501-5.

78. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, Sengupta S, Frank I, Parker AS, Zincke H, Blute ML, Sebo TJ, Cheville JC, Kwon ED. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. Cancer Res 2006; 66(7): 3381-5.

79. Krambeck AE, Dong H, Thompson RH, Kuntz SM, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Sebo TJ, Cheville JC, Parker AS, Kwon ED. Survivin and B7-H1 are collaborative predictors of survival and represent potential therapeutic targets for patients with renal cell carcinoma. Clin Cancer Res 2007; 13(6): 1749-56.

80. Byun SS, Yeo WG, Lee SE, Lee E. Expression of survivin in renal cell carcinomas: association with pathologic features and clinical outcome. Urology 2007; 69(1): 34-7.

81. Krambeck AE, Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Park ES, Kuntz SM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Kwon ED. B7-H4 expression in renal cell carcinoma and tumor vasculature: associations with cancer progression and survival. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(27): 10391-6.

82. Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Kwon ED. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. Clin Cancer Res 2007; 13(6): 1757-61.

83. Parker A, Cheville JC, Lohse C, Cerhan JR, Blute ML. Expression of insulin-like growth factor I receptor and survival in patients with clear cell renal cell carcinoma. J Urol 2003; 170(2): 429-4.

84. Rasmuson T, Grankvist K, Jacobsen J, Olsson T, Ljungberg B. Serum insulin-like growth factor-1 is an independent predictor of prognosis in patients with renal cell carcinoma. Acta Oncol 2004; 43(8): 744-8.

85. Seligson DB, Pantuck AJ, Liu X, Huang Y, Horvath S, Bui MH, Han KR, Correa AJ, Eeva M, Tze S, Belldegrun AS, Figlin RA. Epithelial cell adhesion molecule (KSA) expression: pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma. Clin Cancer Res 2004; 10(8): 2659-69.

86. Pantuck AJ, Seligson DB, Klatte T, Yu H, Leppert JT, Moore L, O'Toole T, Gibbons J, Belldegrun AS, Figlin RA. Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for

molecular patient selection for targeted therapy. Cancer 2007; 109(11): 2257-67.

87. 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; 10(16): 5464-71.

88. Langner C, von Wasielewski R, Ratschek M, Rehak P, Zigeuner R. Biological significance of p27 and Skp2 expression in renal cell carcinoma. A systematic analysis of primary and metastatic tumour tissues using a tissue microarray technique. Virchows Arch 2004; 445(6): 631-6.

89. Herrem CJ, Tatsumi T, Olson KS, Shirai K, Finke JH, Bukowski RM, Zhou M, Richmond AL, Derweesh I, Kinch MS, Storkus WJ. Expression of EphA2 is prognostic of disease-free interval and overall survival in surgically treated patients with renal cell carcinoma. Clin Cancer Res 2005; 11(1): 226-31.

90. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. Nature 1992; 358: 15-6.

91. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. N Engl J Med 1993; 329(18): 1318-27.

92. 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; 173(3): 725-8.

93. 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; 26(5B): 3825-33.

94. 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; 63(4): 651-5.

95. Gunawan B, Huber W, Holtrup M, et al: Prognostic impacts of cytogenetic findings in clear cell renal cell carcinoma: Gain of 5q31-qter predicts a distinct clinical phenotype with favorable prognosis. Cancer Res 2001; 61(21): 7731-8.

96. Klatte T, Rao PN, de Martino M, LaRochelle J, Shuch B, Zomorodian N, Said J, Kabbinavar FF, Belldegrun AS, Pantuck AJ. Cytogenetic

profile predicts prognosis of patients with clear cell renal cell carcinoma. J Clin Oncol. 2009; 27(5):746-53.

97. Schullerus D, Herbers J, Chudek J, Kanamaru H, Kovacs G. Loss of heterozygosity at chromosomes 8p, 9p, and 14q is associated with stage and grade of non-papillary renal cell carcinomas. J Pathol 1997; 183(2): 151-5.

98. Kovacs G. Molecular cytogenetics of renal cell tumors. Adv Cancer Res1993; 62: 89–124.

99. Wu S, Hafez GR, Xing W, Newton M, Chen X, Messing E. The correlation between the loss of chromosome 14q with histologic tumor grade, pathologic stage, and outcome of patients with nonpapillary renal cell carcinoma. Cancer 1996; 77(6): 1154–60.

100. Presti JC Jr, Wilhelm M, Reuter V, Russo P, Motzer R, Waldman F. Allelic loss on chromosomes 8 and 9 correlates with clinical outcome in locally advanced clear cell carcinoma of the kidney. J Urol 2002; 167(3): 1464-8.

101. Diaz MO, Rubin CM, Harden A, Ziemin S, Larson RA, Le BM, Rowley JD. Deletions of interferon genes in acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 1990; 332(2): 77-82.

102. Fountain, J. W., Karayiorgou, M., Ernstoff, M. S., KirkWOOd,J. M., Vlock, D. R., Titus-Ernstoff, L., Bouchard, B., Vijayasaradhi, S., and Dracopoli, N. C. Homozygous deletions within human chromosome band 9p21 in melanoma. Proc Nail Acad Sci USA 1992; 89: 10557-61.

103. Olopade OI, Buchhagen DL, Malik K, Sherman J, Nobori T, Bader S, Nau MM, Gazdar AF, Minna JD, Diaz MO. Homozygous loss of the interferon genes defines the critical region on 9p that is deleted in lung cancers.Cancer Res 1993; 53(10): 2410-5.

104. Cairns P, Tokino K, Eby Y, Sidransky D. Homozygous deletions of 9p21 in primary human bladder tumors detected by comparative multiplex polymerase chain reaction. Cancer Res 1994; 54(6): 1422-4.

105. van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, Corio R, Tokino K, Koch W, Sidransky D. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. Cancer Res 1994; 54(5): 1156-8.

106. Tsai YC, Nichols PW, Hiti AL, Williams Z, Skinner DG, Jones PA. Allelic losses of chromosomes 9, 11, and 17 in human bladder cancer. Cancer Res 1990; 50(1): 44-7.

107. Cairns P, Shaw ME, Knowles MA. Initiation of bladder cancer may involve deletion of a tumour-suppressor gene on chromosome 9. Oncogene 1993; 8(4): 1083-5.

108. Orntoft TF, Wolf H. Molecular alterations in bladder cancer. Urol Res 1998; 26(4):223-33

109. Kimura F, Florl AR, Seifert HH, Louhelainen J, Maas S, Knowles MA, Schulz WA. Destabilization of chromosome 9 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Br J Cancer 2001; 85(12): 1887-93.

110. Orlow I, LaRue H, Osman I, Lacombe L, Moore L, Rabbani F, Meyer F, Fradet Y, Cordon-Cardo C. Deletions of the INK4A gene in superficial bladder tumors. Association with recurrence. Am J Pathol 1999; 155(1): 105-13.

111. Cairns P, Tokino K, Eby Y, Sidransky D. Localization of tumor suppressor loci on chromosome 9 in primary human renal cell carcinomas. Cancer Res 1995, 55(2):224–7.

112. Bissig H, Richter J, Desper R, Meier V, Schraml P, Schaffer A, Sauter G, Mihatsch M, Moch H. Evaluation of the clonal relationship between primary and metastatic renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization. Am J Pathol 1999, 155(1):267–274

113. Schraml P, Struckmann K, Bednar R, Fu W, Gasser T, Wilber K, Kononen J, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H. CDKNA2A mutation analysis, protein expression, and deletion mapping of chromosome 9p in conventional clear-cell renal carcinomas: evidence for a second tumor suppressor gene proximal to CDKN2A. Am J Pathol. 2001; 158(2): 593-601.

114. Brunelli M, Eccher A, Gobbo S, Ficarra V, Novara G, Cossu-Rocca P, Bonetti F, Menestrina F, Cheng L, Eble JN, Martignoni G. Loss of chromosome 9p is an independent prognostic factor in patients with clear cell renal cell carcinoma. Mod Pathol 2008; 21(1): 1-6.

115. Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Barlund, M., Schraml, P., Leighton, S. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nat Med 1998; 4**:** 844-7.

116. Torhorst, J., Bucher, C., Kononen, J., Haas, P., Zuber, M., Kochli, O. R. et al.: Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. Am J Pathol 2001; 159**:** 2249-56.

117. Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. Lab Invest 2001; 81(10): 1331-8.

118. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. Lab Invest 2000; 80(12): 1943-9.

119. Halling K.C., Kipp B.R. Bladder cancer detection using FISH (Urovysion Assay). Adv Anat Pathol 2008; 15(5): 279-86.

120. Leite K, Gattás G. Detecção não invasiva de neoplasias uroteliais. In: Leite K, Srougi M. *Patologias urológicas: da bancada ao leito.* São Paulo: Atheneu; 2010. p.23-34.

121. Varella-Garcia M. Stratification of non-small cell lung cancer patients for therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors: the EGFR fluorescence in situ hybridization assay. Diagn Pathol 2006; 1: 19-28.

122. Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, Burkhardt HM, Meyer RG, Seelig SA, King W. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. J Mol Diagn 2000; 2(3): 116-23.

123. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell.* 5a ed. New York: Garland Science; 2008. Cap.20, p.1205-68: Cancer.

124. Moch H, Presti Jr. JC, Sauter G, Buchholz N, Jordan P, Mihatsch MJ, Waldman FM. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization are associated with clinical outcome in renal cell carcinoma. Cancer Res 1996; 56(1):27–30.

125. Bissig H, Richter J, Desper R, Meier V, Schraml P, Schäffer A, Sauter G, Mihatsch M, Moch H. Evaluation of the clonal relationship between primary and metastatic renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization. Am J Pathol 1999, 155(1):267–274.

126. Schraml P, Struckmann K, Bednar R, Fu W, Gasser T, Wilber K, Kononen J, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H. CDKNA2A mutation analysis, protein expression, and deletion mapping of chromosome 9p in conventional clear-cell renal carcinomas: evidence for a second tumor suppressor gene proximal to CDKN2A. Am J Pathol 2001; 158(2): 593-601.

127. La Rochelle J, Klatte T, Dastane A, Rao N, Seligson D, Said J, Shuch B, Zomorodian N, Kabbinavar F, Belldegrun A, Pantuck AJ. Chromosome 9p deletions identify an aggressive phenotype of clear cell renal cell carcinoma. Cancer 2010; 116(20): 4696-703.

128. Kim SP, Weight CJ, Leibovich BC, Thompson RH, Costello BA, Cheville JC, Lohse CM, Boorjian SA. Outcomes and clinicopathologic variables associated with late recurrence after nephrectomy for localized renal cell carcinoma. Urology 2011; 78(5): 1101-6

129. Klatte T, Lam JS, Shuch B, Belldegrun AS, Pantuck AJ. Surveillance for renal cell carcinoma: why and how? When and how often? Urol Oncol 2008; 26(5): 550-4.

130. Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon D. Assessment of methods for tissue-based detection of the Her-2/*neu* alteration in human breast cancer: a direct comparasion of fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry. J Clin Oncol 2000; 18(21): 3651-64.

131. Sui W, Ou M, Chen J, Wan Y, Peng H, Qi M, Huang H, Dai Y. Comparasion of immunohistochemistry and fluorescence *in situ* hybridization assessment for Her-2 status in breast cancer. World J Surg Oncol 2009; 7: 83-8.

132. Chang LL, Yeh WT, Yang SY, Wu WJ, Huang CH. Genetic alterations of p16INK4a and p14ARF genes in human bladder cancer. J Urol 2003; 170(2 Pt 1): 595-600.

133. Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumor suppression. Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2: 731-7.

134. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100: 57-70.

135. Hahn WC, Weinberg RA, Rules for making human tumor cells. N Engl J Med 2002; 347(20): 1593-1603

136. Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Dalbagni G, Drobnjak M, Charytonowicz E, Hu SX, Xu HJ, Reuter VE, Benedict WF. Cooperative effects of p53 and pRB alterations in primary superficial bladder tumors. Cancer Res 1997; 57(7): 1217-21.

137. Cote RJ, Dunn MD, Chatterjee SJ, Stein JP, Shi SR, Tran QC, Hu SX, Xu HJ, Groshen S, Taylor CR, Skinner DG, Benedict WF. Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. Cancer Res 1998; 58(6): 1090-4.

138. Grossman HB, Liebert M, Antelo M, Dinney CP, Hu SX, Palmer JL, Benedict WF. p53 and RB expression predict progression in T1 bladder cancer. Clin Cancer Res 1998; 4(4): 829-34.

139. Ozenne P, Eymin B, Brambilla E, Gazzeri S. The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer. Int J Cancer 2010; 127(10): 2239-47.

140. Sandlund J, Oosterwijk E, Grankvist K, et al. Prognostic impact of carbonic anhydrase IX expression in human renal cell carcinoma. BJU Int 2007; 100(3): 556-60.

141. Lughezzani G, Jeldres C, Isbarn H, Perrotte P, Shariat SF, Sun M, Widmer H, Arjane P, Peloquin F, Pharand D, Patard JJ, Graefen M, Montorsi F, Karakiewicz PI. Tumor size is a determinant of the rate of

stage T1 renal cell cancer synchronous metastasis. J Urol 2009; 182(4): 1287-93.

142. Karakiewicz PI, Trinh QD, Bhojani N, Bensalah K, Salomon L, de la Taille A, Tostain J, Cindolo L, Altieri V, Ficarra V, Schips L, Zigeuner R, Mulders PF, Valeri A, Descotes JL, Mejean A, Patard JJ. Renal cell carcinoma with nodal metastases in the absence of distant metastatic disease: prognostic indicators of disease-specific survival. Eur Urol 2007; 51(6): 1616-24.

143. Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. J Urol 1969; 101(3): 297-301.

144. Jones J, Otu H, Spentzos D, Kolia S, Inan M, Beecken WD, Fellbaum C, Gu X, Joseph M, Pantuck AJ, Jonas D, Libermann TA. Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer. Clin Cancer Res 2005; 11(16): 5730-9.

145. Soung Sullivan P, Rao J, Cheng L, Cote RJ. Classical pathology versus molecular pathology in renal cell carcinoma. Curr Urol Rep 2007; 8(1): 5-11.

146. 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; 173(5): 1496-501.

147. Parker AS, Leibovich BC, Lohse CM, Sheinin Y, Kuntz SM, Eckel-Passow JE, Blute ML, Kwon ED. Development and evaluation of BioScore: a biomarker panel to enhance prognostic algorithms for clear cell renal cell carcinoma. Cancer 2009; 115(10): 2092-103.

148. Kinkle DA, Crispen PL, Chen DT, Greenberg RE, Uzzo RG. Enhancing renal masses with zero net growth during active surveillance. J Urol 2007; 177(3): 849-53.

149. Klatte T, Patard JJ, de Martino M, Bansalah K, Verhoest G, de la Taille A, Abbou CC, Allhoff EP, Belldegrun AS, Pantuck AJ. Tumor size does not predict risk of metastasis disease or prognosis of small renal cell carcinomas. J Urol 2008; 179(5): 1719-26.

9 APÊNDICES

Apêndice 1: Diagrama de Montagem do TMA

Casuística Drs. Daniel / Marcelo / Pontes / Kátia - RIM Agulha 1mm Esp 0,3mm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
a	104/966A	104/966A	101/903A	104/903A	104/911	104/911	114926A	114926A	102828	102828	121982A	121982A	101739A	101739A	88-11843	88-11843
b	106680A	106680A	110670A	110670A	108656A	108656A	113681	113681	106572A	106572A	109568A	109568A	116567	116567	120 500	120 500
c	102419	102419	103393	103393	111407A	111407A	116419	116419	103348	103348	110317	110317	110240	110240	122246	122246
d	120235	120235	108211	108211	116163A	116163A	100039	100039	118845	118845	88-12426	88-12426	23952	23952	25951A	25951A
e	27714A	27714A	29866A	29866A	31177A	31177A	32717A	32717A	35723A	35723A	SL41577A	SL41577A	SL47516A	SL47516A	SL25951A	SL25951A
f	SL48831A	SL48831A	SL49198A	SL49198A	SL49405R	SL49405R	5650045	5650045	5652375A	5652375A	5655012A	5655012A	55071A	55071A	56154A	56154A
g	56196A	56196A	56960A	56960A	57882A	57882A	58828A	58828A	59627	59627	615541	615541	61992A	61992A	62921A	62921A
h	65221A	65221A	65447A	65447A	656211	656211	65879A	65879A	66939A	66939A	66959A	66959A	67723	67723	67849	67849
i	68853A	68853A	69472	69472	71700	71700	74505A	74505A	75593A	75593A	75873A	75873A	77075A	77075A	77539A	77539A
j	77881A	77881A	79101A	79101A	79158A	79158A	80529A	80529A	81035A	81035A	81457A	81457A	82209	82209	81701A	81701A
l	818851	818851	84438	84438	85091	85091	85556	85556	86431	86431	87104A	87104A	87189	87189	87402	87402
m	89534A	89534A	90050A	90050A	91170A	91170A	91630	91630	92885	92885	93818A	93818A	94146A	94146A	94398	94398
n	95827A	95827A	96086A	96086A	96934A	96934A	97116	97116	97297A	97297A	97720A	97720A	98774A	98774A		
o	53085	53085														