

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Alexandra Medeiros Souza de Freitas

**Tumores de células renais: avaliação
de fatores prognósticos em série de
98 casos em hospital de referência
de Porto Alegre, Brasil.**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre

2013

Alexandra Medeiros Souza de Freitas

**Tumores de células renais: avaliação
de fatores prognósticos em série de
98 casos em hospital de referência
de Porto Alegre, Brasil.**

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia da
Fundação Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre
como requisito para a obtenção do
grau de Doutor

Orientador: Dr. Antônio A. Hartmann

**Porto Alegre
2013**

Catalogação na Publicação

Freitas, Alexandra M.S. de

Tumores de células renais: avaliação de fatores prognósticos em série de 98 casos em hospital de referência de Porto Alegre, Brasil. / Alexandra M.S. de Freitas. -- 2013.
84 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2013.

Orientador(a): Antônio A. Hartmann.

1. Carcinoma renal. 2. Neoplasias renais. 3. Marcadores tumorais. 4. Fatores prognósticos. 5.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Vencer a si próprio é a maior das vitórias.”

Platão

Agradecimentos

A Deus por ter me permitido chegar até aqui;

Ao meu marido Tiarajú Freitas por continuar acreditando em minha capacidade de terminar este projeto mesmo quando eu mesma estava em dúvida, Só o amor pode explicar tanta fé em outra pessoa. Obrigado!!!

Aos meus filhos, aos que estão aqui comigo e também aquele que ficou tão pouco tempo, vocês são meu maior incentivo para seguir em frente. Amo todos vocês!!!

Á minha prima Maria Inês por toda a ajuda e apoio, esta vitória não seria possível sem a sua presença;

Aos meus pais Rubino e Marli por terem me ensinado a perseverar e progredir com as adversidades;

A todos os meus familiares e amigos, que de uma forma ou outra sempre deram apoio à realização deste projeto;

Ao meu orientador pela paciência e apoio incondicional;

Aos funcionários da Ufcspa, em especial as secretárias Maristela e Luciani e as técnicas Teresinha e Rosalva, por todo o empenho e disponibilidade em me ajudar cada vez que foram solicitados;

Aos colegas do Setor de Patologia da FURG/Rio Grande por todo o apoio na realização deste projeto e pela compreensão das minhas ausências neste período;

Aos colegas do Centro Integrado de Patologia/Rio Grande pelo apoio e compreensão com minhas ausências.

SUMÁRIO

| | | |
|--------|--|------|
| I | Lista de Abreviaturas | VII |
| II | Lista de Figuras | VIII |
| III | Lista de Tabelas..... | IX |
| IV | Resumo da Tese..... | X |
| 1. | Introdução | 12 |
| 1.1 | Epidemiologia | 16 |
| 1.2 | Apresentação e diagnóstico | 17 |
| 1.3 | Tipos histológicos | 18 |
| 1.4 | Fatores prognósticos, preditivos e biomarcadores | 19 |
| 1.5 | Marcadores biológicos | 24 |
| 1.5.1 | Survivina | 24 |
| 1.5.2 | B7-H1..... | 27 |
| 1.5.3. | Expressão associada de B7-H1 e survivina | 31 |
| 1.6 | Referências bibliográficas | 34 |
| 2. | Objetivos | 40 |
| 2.1 | Objetivo geral | 40 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 40 |
| 3. | Artigo científico | 41 |
| 4. | Considerações finais | 62 |

| | | |
|-----|---|----|
| 5. | Anexos | 63 |
| 5.1 | Material e métodos | 63 |
| 5.2 | Protocolo de avaliação | 68 |
| 5.3 | Termo de Consentimento | 69 |
| 5.4 | Parecer do CEP | 70 |
| 5.5 | Carta de aceitação do artigo no JBPML | 72 |
| 5.6 | Artigo científico aceito para publicação no JBPML | 73 |

I - Lista de abreviaturas

µm: micrômetro

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

B7: família de glicoproteínas de superfície celular

B7-H1 ou PD-L1: glicoproteína de superfície celular da família B7

cm: centímetros

CCR: carcinoma de células renais

células T: linfócitos tipo T

DAB: diaminobenzidina

DNA: ácido desoxirribonucleico

EUA: Estados Unidos da América

gene VHL: gene de Von Hippel-Lindau

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HAS: Hipertensão arterial sistêmica

HE: hematoxilina e eosina

IAP: família de proteínas inibidoras da apoptose

IMQs: imunoistoquímicos

INCA: Instituto Nacional do Câncer

OMS: Organização Mundial da Saúde

RNA: ácido ribonucleico

TC: tomografia computadorizada

TCE: tricloroetileno

TNM: sistema de estadiamento englobando tumor, linfonodos e metástases

UICC: União Internacional Contra o Câncer

II - Lista de Figuras

Tese

| | |
|---|----|
| Figura 1: Tipos histológicos de CCR e sobrevida | 23 |
| Figura 2: Associação da expressão de survivina com morte por CCR | 26 |
| Figura 3: Localização de B7-H1 na célula | 27 |
| Figura 4: Associação da expressão de B7-H1 e morte por CCR | 30 |
| Figura 5: Mecanismo de interação proposto entre B7-H1 e survivina no CCR | 32 |

Artigo científico

| | |
|---|----|
| Figura 1: CCR, tipo células claras, H&E, 40x..... | 54 |
| Figura 2: CCR, tipo papilar, H&E, 40x | 54 |
| Figura 3: CCR, imunistoquímica positiva para survivina, 40x | 55 |
| Figura 4: CCR, imunistoquímica positiva para B7-H1, 40x | 55 |
| Figura 5: CCR, imunistoquímica negativa para B7-H1, 40x | 56 |

III - Lista de Tabelas

Tese

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Classificação de Fuhrman | 15 |
| Tabela 2: Classificação da OMS para tumores de células renais | 18 |
| Tabela 3: Classificação TNM para carcinoma de células renais | 21 |
| Tabela 4: Tumores humanos com expressão de B7-H1 | 28 |
| Tabela 5: Critérios de inclusão e de exclusão dos casos de CCR | 64 |

Artigo científico

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Dados demográficos | 57 |
| Tabela 2: Resultados dos testes entre grupos e dados patológicos | 58 |

Resumo da Tese

Introdução

O carcinoma de células renais (CCR) é doença de comportamento agressivo em todo o mundo. Para 2013 nos Estados Unidos da América, são esperados 60.000 novos casos de CCR. Segundo o INCA, no Brasil, o CCR não está entre os dez tipos mais comuns de câncer no país representando segundo alguns autores 1 a 2% de todas as malignidades. Mesmo com avanços no diagnóstico nos últimos anos, tendo como consequência o diagnóstico de tumores em estágios mais iniciais, tanto a incidência como a mortalidade tem se mantido em elevação.

Objetivos

Estudar os fatores prognósticos tradicionais ligados ao exame anátomo-patológico e os novos marcadores por imunohistoquímica.

Material e métodos

Em um hospital de referência de Porto Alegre, Brasil foi realizado um estudo transversal de CCR, com pacientes que realizaram nefrectomia total, no período 2006-2009. Foram selecionados aqueles com os tipos histológicos mais comuns: células claras e papilares. Através de revisão de dados patológicos foram obtidos fatores prognósticos tradicionais, como tamanho, necrose, tipo histológico, grau nuclear e sistema TNM. Também se realizou estudo imunohistoquímico (IMQ) da amostra, com o uso de dois novos marcadores: survivina e B7-H1.

Resultados

Obtivemos 98 casos, com 90% deles do tipo células claras, 73% classificados como T1 e T2, a maioria com grau nuclear de Fuhrman 2 e 3 e cerca de 70% da amostra com presença de necrose. Já no estudo IMQ foi encontrado positividade em 38 casos para o B7-H1 e em 50 para survivina. Ao considerarmos a associação entre os fatores prognósticos tradicionais e a expressão dos marcadores encontramos associação somente entre o grupo positivo para os marcadores e necrose ($p < 0,001$).

Conclusão

Este achado vai ao encontro da literatura que vem realçando a importância da necrose no prognóstico dos CCR.

1. Introdução

O CCR é uma doença agressiva, sendo responsável por cerca de 2 a 3% de todas as neoplasias malignas de adultos. É o sétimo tumor mais comum entre homens e o nono entre as mulheres. Tem uma incidência mundial estimada em cerca de 209.000 casos por ano com uma mortalidade esperada de 102.000 casos por ano. A incidência da doença vem aumentando em todo o mundo (Rini e cols., 2009).

Um grande avanço obtido em relação a esta doença foi a compreensão do fato de que esta não é uma entidade única, pelo contrário, ela engloba uma coleção de diferentes tipos de tumores, com origens diversas dentro do rim, possuindo características genéticas, achados histológicos e fenótipos clínicos variados. Estes diferentes tipos histológicos têm correlação com o prognóstico, sendo assim essencial o diagnóstico acurado (Storkel e cols., 1997). A maioria dos casos é diagnosticada de forma tradicional, através da análise das características morfológicas, com o uso da coloração de hematoxilina e eosina (H&E) na microscopia óptica. Porém existem casos em que as características morfológicas apresentadas se sobrepõem, sendo necessária a utilização de outros métodos diagnósticos para que seja possível classificar os tumores adequadamente. Nestes casos, é importante a utilização de estudo imunohistoquímico para auxílio na classificação adequada (Kummerlin e cols., 2009; Liu e cols, 2007). Cabe ainda ressaltar que o CCR se caracteriza por quadro clínico tradicional pouco significativo, o que faz com que este tipo de neoplasia seja frequentemente diagnosticado em fase avançada. Como consequência disto é estimado que, no momento do diagnóstico, pelo menos

30% dos pacientes já apresentem doença avançada, com presença de metástases. Este fato tem grande impacto sobre o prognóstico destes pacientes, pois se sabe que pacientes com doença localizada têm 50 a 95 % de sobrevida comparada a apenas 5% de sobrevida naqueles com doença metastática, considerando um período de cinco anos (Leroy e cols., 2007; Webster e cols., 2006; Kosari e cols., 2005; Storkel e cols., 1997).

O avanço obtido com o diagnóstico por imagem tem aumentado muito a incidência de todos os estágios dos CCR. Há relatos de que cerca de 50% a 80% dos CCRs diagnosticados atualmente são feitos de forma acidental (Chuang e cols., 2011).

Nas últimas décadas, têm-se notado que tanto a incidência como a mortalidade por este tipo de tumor maligno vem aumentando. Este achado tem sido relacionado com os pacientes que apresentam metástases tanto no momento do diagnóstico como naqueles que irão apresentá-las após o tratamento cirúrgico. Para estes casos, com doença avançada, tanto a quimioterapia quanto a radioterapia tradicionais, têm se mostrado pouco eficazes. Porém é descrito que em cerca de 20% destes casos, os tumores apresentam resposta a algum tipo de tratamento imunoterápico, seja este, por exemplo, à infusão de citocinas parenterais e/ou o transplante de células tronco. Baseado nestes dados este tumor tem sido considerado imunogênico, ou seja, o sistema imune do hospedeiro poderia ser ativado ou desativado pelo tumor influenciando marcadamente sua evolução (Atkins e cols., 2007). Porém, mesmo com os avanços terapêuticos não se têm conseguido aumentar a sobrevida dos pacientes com doença metastática, que persiste em cerca de 6-

10 meses após o diagnóstico (Krambeck e cols., 2007 e Andersen e cols., 2007).

Baseado no fato de que grande parte dos pacientes com doença clínica localizada irá desenvolver metástases à distância torna-se importante o estudo dos marcadores biológicos, chamados de prognósticos ou preditivos, para esta neoplasia. São considerados prognósticos os marcadores biológicos que possam prever a agressividade dos tumores. Estes estão usualmente, mas não exclusivamente, associados ao exame histológico do tecido tumoral. Nos dias atuais, o estadiamento patológico é considerado como o principal marcador prognóstico para o carcinoma renal. São estudados os seguintes parâmetros: estadiamento tumoral e o grau de diferenciação nuclear. O estadiamento patológico utiliza o sistema TNM, que estuda as características próprias do tumor, como tamanho, localização, extensão do tumor assim como o comprometimento tumoral dos linfonodos e a presença de metástases à distância. Já o grau de diferenciação nuclear, apesar de correlacionar-se com o estadiamento, é considerado como o dado isolado mais relevante para o prognóstico. Este é avaliado no estudo microscópico com a utilização do sistema de Fuhrman (Tabela 1) [Atkins e cols., 2007; Leibovich e cols., 2003; Zisman e cols., 2001; Delahunt, 1998].

Tabela 1: Sistema de avaliação do grau nuclear de Fuhrman*

Grau 1: As células tem núcleos redondos, hipercromáticos e uniformes com pequenos detalhes na cromatina e sem nucléolo visível;

Grau 2: Os contornos nucleares são mais irregulares do que os de Grau 1: núcleos tem aproximadamente 15 micrômetros de diâmetro e apresentam cromatina finamente granular, os nucléolos são muito discretos neste aumento, mas podem ser identificados no maior aumento;

Grau 3: Os contornos nucleares são mais irregulares. O diâmetro nuclear pode se aproximar de 20 micrômetros. Os nucléolos são facilmente identificados;

Grau 4: É caracterizado pelo pleomorfismo nuclear, hipercromasia e presença de nucléolos único ou múltiplos.

Nota: * Considerando a objetiva de 10X

Fonte: Adaptado de Fuhrman e cols.,1982.

O estudo dos novos marcadores para a avaliação prognóstica tem sido motivo de interesse na literatura. Entre inúmeros marcadores que têm sido estudados, foram identificados dois novos marcadores considerados promissores, a survivina e o B7-H1, já tendo sido descritos na literatura em diferentes neoplasias (Andersen e cols., 2007; Li e cols., 2005; Zhao e cols., 2000).

Considerando que o estudo destes marcadores ainda é recente, não estão disponíveis estudos que correlacionem os mesmos, com os tipos histológicos. Segundo a OMS, no CCR, os tipos mais frequentes são o carcinoma de células claras e o carcinoma papilar, responsáveis por 75% e 15% dos casos, respectivamente. Sendo assim, nosso objetivo é o estudo da expressão imunohistoquímica dos marcadores survivina e B7-H1 e sua relação com os tipos histológicos mais frequentes no CCR. Analisaremos também os fatores prognósticos tradicionais e suas possíveis associações com a expressão dos novos marcadores selecionados. Desta forma poderemos contribuir para a ampliação dos dados sobre o CCR, que ainda são escassos em nosso meio.

1.1 Epidemiologia

Nos Estados Unidos, para o ano de 2013, são previstos 65.150 novos casos com uma perspectiva de 13.680 mortes. (*National Cancer Institute*, em www.cancer.gov/cancertopics/types/kidney, 2013). Apesar de perfazer um pequeno percentual entre todos os tumores, a incidência e a mortalidade deste tipo de neoplasia vem aumentando 2 a 3% por década. Elas são maiores em países desenvolvidos do que em países subdesenvolvidos, observando-se taxas maiores na Europa, América do Norte, Argentina, Oceania e Japão e taxas menores na África, América do Sul e outros países da Ásia (Naito e cols., 2010). Existe diferença entre as taxas dentro de um mesmo continente. Por exemplo, na Sérvia a taxa para homens é de 2,9/100.000 enquanto que na República Tcheca esta chega a 15,2/100.000. As taxas entre mulheres, geralmente são a metade daquelas esperadas para homens (Chow e cols., 2010). A maior incidência nos EUA é observada em homens, com idade acima de 65 anos, de raça negra, chegando a 82 / 100.000 (*National Cancer Institute*).

São fatores de risco estabelecidos o tabagismo e o uso de analgésicos contendo fenacetina (excluídos do mercado desde 1960). São fatores considerados como controversos: uso de acetoaminofeno, obesidade, HAS, tipo de dieta, diabete, fatores hormonais, fatores reprodutivos, falta de atividade física e ainda associação com outras doenças renais como insuficiência renal, doença cística renal adquirida e esclerose tuberosa (Chow e cols., 2010; Rini e cols., 2009). Apesar de não ser considerada uma doença ocupacional, existe risco elevado de desenvolvimento da doença associado a certas ocupações e

exposição a certas substâncias industriais, como o tricloroetileno (TCE). A exposição a agentes como cádmio, urânio, arsênio, nitratos e radônio ainda não estão estabelecidas. Fatores genéticos bem definidos estão ligados aos pacientes que apresentam Síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL) que é caracterizada por alterações no gene VHL e predisposição a várias doenças entre os membros destas famílias, incluindo o desenvolvimento mais precoce do CCR do subtipo células claras com apresentação multicêntrica (Chow e cols., 2010 e Rini e cols., 2009).

1.2 Apresentação e diagnóstico

O CCR habitualmente se apresenta entre a 6ª e 7ª década de vida, apresentando idade média de 60 anos. Estes pacientes podem apresentar tanto sintomas locais como sistêmicos, porém a maioria dos casos é assintomática, tendo sido diagnosticada incidentalmente pelo uso de exames de imagem por outra finalidade. Sinais e sintomas locais incluem hematuria, dor em flanco e massa abdominal palpável, que quando presentes trazem implicações negativas ao prognóstico. Já em relação aos sintomas sistêmicos, os mesmos podem ser decorrentes, tanto de metástases, como de síndromes paraneoplásicas, que mais comumente incluem hipercalcemia, hipertensão, eritrocitose, febre de origem indeterminada e emagrecimento. É importante ressaltar que existe relato de grande diversidade de síndromes paraneoplásicas associadas ao CCR. O diagnóstico geralmente é sugerido pela ultrassonografia e confirmado pela tomografia computadorizada (TC), a qual permite melhor avaliação da doença, incluindo a extensão da mesma no próprio rim, assim como o comprometimento de linfonodos e a presença de metástases à distância. O estudo anátomopatológico, tanto do tumor primário,

como dos tumores metastáticos, permite a confirmação diagnóstica e a classificação do subtipo histológico (Escudier e cols., 2010; Rini, 2009).

1.3 Tipos histológicos

A identificação dos diferentes tipos de CCR inicialmente pela Classificação de Mainz, expandida pela Classificação de Heideberg/Rochester e aperfeiçoada pela classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2004 trouxe melhor compreensão da diversidade encontrada nesta malignidade (Delahunt, 2007) [Tabela 2].

Tabela 2: Classificação histológica dos tumores de rim OMS, 2004

Tumores de células renais

Carcinoma de células claras do rim
 Carcinoma de células claras do rim multilocular
 Carcinoma papilar de células renais
 Carcinoma de células renais cromóforo
 Carcinoma dos ductos coletores de Bellini
 Carcinoma medular
 Carcinoma por translocação do Xp11
 Carcinoma associado com neuroblastoma
 Carcinoma tubular mucinoso e carcinoma de células fusiformes
 Carcinoma de células renais, não classificável
 Adenoma papilar
 Oncocitoma

Tumores Metanéfricos

Tumores Nefroblásticos

Tumores Mesenquimais

Tumores Mistos Epiteliais e Mesenquimais

Tumores Neuroendócrinos

Tumores Hematopoiéticos e Linfóides

Tumores de Células Germinativas

Tumores Metastáticos

Fonte: Eble J.N et al: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. IARC Press: Lyon 2004.

O tipo mais comum é o carcinoma de células claras, que recebe esta denominação pelo fato de que durante a técnica histológica, o grande conteúdo citoplasmático de lipídios é dissolvido resultando em citoplasma claro na

microscopia óptica. A doença papilar representa uma pequena fração dos tumores renais e é dividida em tumores do tipo 1 e 2, sendo que os últimos são considerados mais agressivos. Existem ainda tipos mais raros, como cromóforo, medular, de ductos coletores e não classificável. Tumores que apresentam o achado de desdiferenciação sarcomatóide, a qual consiste em um padrão de crescimento caracterizado pela presença de células fusiformes, possuem curso de doença mais agressivo (Rini e cols., 2009).

1.4 Fatores prognósticos, preditivos e biomarcadores

Segundo o *National Cancer Institute* fator prognóstico é uma situação, condição ou característica do paciente que possa ser utilizada para estimar a chance de cura ou de recorrência da doença. Já um fator preditivo é uma condição ou achado que possa ser usado para prever que um paciente com determinado tipo de câncer, irá responder a um tratamento específico (National Cancer Institute. Dictionary of Cancer Terms. <http://www.cancer.gov/dictionary/>). Tradicionalmente as informações prognósticas têm sido obtidas através dos achados anatomopatológicos, tais como tamanho do tumor, grau tumoral, evidência de invasão vascular, associada a avaliação dos linfonodos quanto ao comprometimento tumoral e presença de metástases (Vickers e cols., 2010 e Kattan e cols., 2001).

Do ponto de vista funcional sabe-se que células mononucleares enfraquecidas infiltram os CCRs e que este achado tem sido associado a pior prognóstico (Krambeck e cols., 2007).

Fatores prognósticos tradicionais para o CCR não metastático incluem fatores anatômicos, histológicos, clínicos e moleculares. Os anatômicos são

integrados através da classificação TNM que inclui ainda tamanho tumoral, crescimento através da cápsula renal, invasão da veia renal e/ou invasão da veia cava, invasão de linfonodos e metástase em órgãos a distância. Muitos estudos têm mostrado que o estadiamento tumoral é um importante fator prognóstico independente (Volpe e cols., 2010).

O sistema TNM foi adaptado pela UICC em 1978, e vem sendo utilizado para estadiamento dos CCR (Tabela 3). Desde então varias revisões tem sido feitas pela UICC e pela AJCC. A maior alteração no sistema ocorreu na edição de 1997 na qual o estágio foi definido pelo tamanho, sendo o T1 com tumores menores de sete centímetros (cm) e o T2 com tumores maiores de sete cm e limitado ao rim. O sistema TNM utilizado atualmente, foi publicado em 2010 e já havia sido modificado em 2002. Neste, para CCR localizados sem comprometimento de linfonodos ou metástases à distância, foi subdividido o estágio T1 em T1a para tumores menores ou iguais a quatro centímetros e T1b para tumores maiores de quatro centímetros (Chang e cols., 2011). Vários aspectos do TNM são controversos, como a separação do T1 pelo tamanho tumoral, a não distinção entre os T3 daqueles que apresentam invasão do tecido adiposo perinérico e aqueles que possuem invasão do adiposo do seio renal. Muitos estudos têm atribuído pior prognóstico aos que possuem esta última característica, assim como quanto à invasão da adrenal ipsilateral e da estratificação da veia cava. Já a invasão de linfonodos tem sido confirmada como importante fator prognóstico, independente do estágio T tumoral, mas depende do número de linfonodos encontrados, devendo ser considerada Nx quando abaixo de oito, o que causa limitações, principalmente em nefrectomias parciais (Volpe e cols., 2010).

Tabela 3: Classificação TNM 2010 para CCR

| Tumor primário (T) |
|---|
| TX Tumor primário não pode ser avaliado |
| T0 Sem evidência de tumor primário |
| T1 Tumor \leq 7 cm na maior dimensão, limitado ao rim |
| T1a Tumor \leq 4 cm na maior dimensão, limitado ao rim |
| T1b Tumor $>$ 4 cm, mas \leq 7 cm na maior dimensão, limitado ao rim |
| T2 Tumor $>$ 7 cm na maior dimensão, limitado ao rim |
| T2a Tumor $>$ 7 cm mas \leq 10 cm na maior dimensão, limitado ao rim |
| T2b Tumor $>$ 10 cm, limitado ao rim |
| T3 Tumor estende-se as grandes veias ou tecido perinéfrico, mas não compromete adrenal ipsilateral e não ultrapassa fáscia de Gerota |
| T3a Tumor compromete macroscopicamente a veia renal ou seus ramos, ou tumor invade tecido perirrenal e/ou seio renal, mas não ultrapassa fáscia de Gerota |
| T3b Tumor estende-se macroscopicamente na veia cava abaixo do diafragma |
| T3c Tumor estende-se macroscopicamente na veia cava abaixo do diafragma ou invade a parede da veia cava |
| T4 Tumor ultrapassa a fáscia de Gerota (incluindo extensão contígua até adrenal ipsilateral) |

| Linfonodos regionais (N) |
|---|
| NX Linfonodos regionais não podem ser avaliados |
| N0 Sem metástases para linfonodos regionais |
| N1 Metástases para linfonodos regionais |

| Metástases à distância (M) |
|-----------------------------------|
| M0 Sem metástases à distância |
| M1 Metástases à distância |

Continua

Estágios anatômicos/grupos prognósticos

| Estágio | T | N | M |
|----------------|------------|------------|----------|
| I | T1 | N0 | M0 |
| II | T2 | N0 | M0 |
| III | T1-2 | N1 | M0 |
| | T3 | N0-1 | M0 |
| IV | T4 | N2 | M0 |
| | Qualquer T | Qualquer N | M1 |

Fonte: Edge e cols., 2010.

Os achados histológicos incluem o grau nuclear de Fuhrman, o subtipo histológico, o componente sarcomatóide, a invasão microvascular, a necrose tumoral e a invasão do sistema coletor. Em relação ao sistema de Fuhrman, utilizado desde 1982, que classifica os CCR em quatro categorias, baseado na morfologia nuclear considerando o tamanho, a forma e a proeminência de nucléolos, este tem sido amplamente utilizado e tem se mostrado como importante fator prognóstico para o CCR (Furhman e cols.,1982). Mesmo com suas variabilidades seu valor tem sido validado de forma consistente em vários estudos na literatura (Ficarra e cols, 2001).

De acordo com a classificação da OMS, existem dois tipos histológicos principais de CCR: células claras e papilares, correspondendo a cerca de 80–90% e 10–15% dos casos, respectivamente. Vários estudos têm mostrado associação significativa entre tipo histológico e sobrevida, sendo que o tumor

de células claras tem sido considerado o mais agressivo, seguido pelos papilares (Gudbjartson e cols., 2005; Patard e cols., 2005). Estudos mais recentes têm confirmado que, com exceção do carcinoma de ductos coletores, é pior o prognóstico para os pacientes com tumor de células claras, em relação a todos os demais (Leibovich e cols., 2010) [Figura 1].

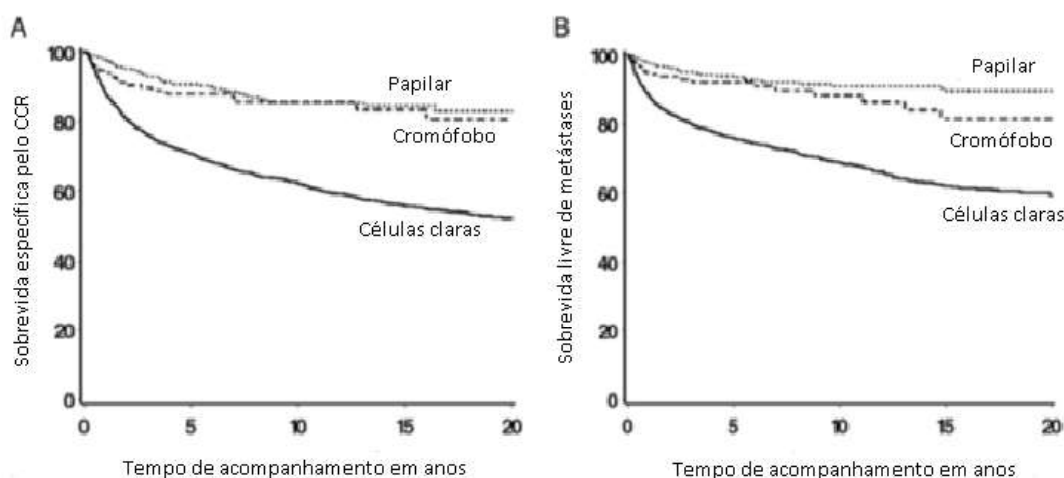


Figura 1: Tipos histológicos do CCR e sobrevida
 Fonte: Adaptado de Leibovich e cols., 2010.

Além disso, também é importante definirmos biomarcadores, que são indicadores de eventos clínicos importantes tais como: início da doença, recorrência, progressão da doença ou morte pela mesma. Estes podem ser usados para avaliação, rastreamento, diagnóstico, prognóstico ou para seleção dos pacientes para tratamentos específicos além de poderem também ser utilizados para estudo da recorrência e/ou progressão da doença (Sturgeon e cols., 2008).

Se considerarmos a característica heterogênea do CCR a identificação de biomarcadores tem potencial para o desenvolvimento de alvos terapêuticos,

podendo assim beneficiar pacientes de forma individualizada. Para isso os pesquisadores têm avaliado a expressão de DNA, RNA e de proteínas nos tumores e soro de pacientes com CCR. Mesmo que ainda não haja marcadores para uso na prática clínica, múltiplos marcadores têm sido avaliados ao longo do tempo, com este intuito (Vickers e cols., 2010).

1.5 Marcadores biológicos

1.5.1 Survivina

A survivina é uma proteína bifuncional inibidora da apoptose (IAP) que apresenta um papel importante, tanto na regulação do ciclo celular, como na inibição da apoptose. Foi relatado que, além da ação sobre a apoptose, ela também afeta a proliferação celular e a angiogênese, sendo que os mecanismos exatos destas ações ainda são indefinidos (Wang e cols., 2009). Embora o papel da survivina como inibidora da apoptose esteja estabelecido, seu mecanismo exato ainda não foi esclarecido (Li e cols., 2005; Altieri e cols.,2003). Até o momento acredita-se que a função da survivina, como um inibidor celular primário da apoptose ocorra pela ação de inibição do processamento da procaspase-3 e procaspase-7 (Tamm e cols.,1998). Além da sua relação com a apoptose, demonstrou-se ainda que a survivina provavelmente apresente um papel relevante na mitose e na estabilidade microtubular (Li e cols.,2005; Okada e cols.,2004). Ela usualmente não é detectada em tecidos humanos adultos normais, mas a sua expressão tem sido demonstrada em muitos tumores malignos humanos, como: mama, cólon, ovário, pele, pulmão, linfomas, leucemias, melanomas e rim, tornando-se assim

um provável alvo para os tratamentos específicos contra o câncer (Lei e cols., 2010; Coutinho-Camillo e cols., 2008; Andersen e cols., 2007; Zhao e cols., 2000).

A survivina é expressa em todos os tipos histológicos do CCR (Zamparese e cols., 2008).

Foi demonstrado em um estudo de perfil gênico, comparando CCR agressivos com CCR não agressivos, que o RNA mensageiro da proteína humana survivina apresenta superexpressão em tumores de maior agressividade em relação aos menos agressivos (Kosari e cols., 2005). Após tal estudo, a proteína survivina foi estudada em uma coorte composta por 312 pacientes que realizaram nefrectomia por CCR no período de 1990-1994 e que possuíam tecido estocado em parafina para realização de estudo imunohistoquímico. Foi utilizado o anticorpo anti-survivina (Dako, Carpenteria, diluição 1:100) e a análise foi realizada de forma digital, sendo considerado positivo a coloração nuclear e o ponto de corte de 2%. Associado a isto também foram estudados dados anátomo-patológicos relevantes e sobrevida. Como resultado, cerca de 30% dos pacientes apresentaram níveis altos de survivina (> 2%). Ficou demonstrado que estes casos eram associados a achados patológicos adversos, tais como tumores maiores e em estágios mais avançados, presença de necrose tumoral, comprometimento de linfonodos e presença de metástases à distância. Além disso, estes também apresentavam cinco vezes mais chance de morte por CCR comparado aos que apresentavam níveis baixos da proteína, causando uma redução na sobrevida dos primeiros em relação aos últimos (Parker e cols., 2006) [Figura 2].

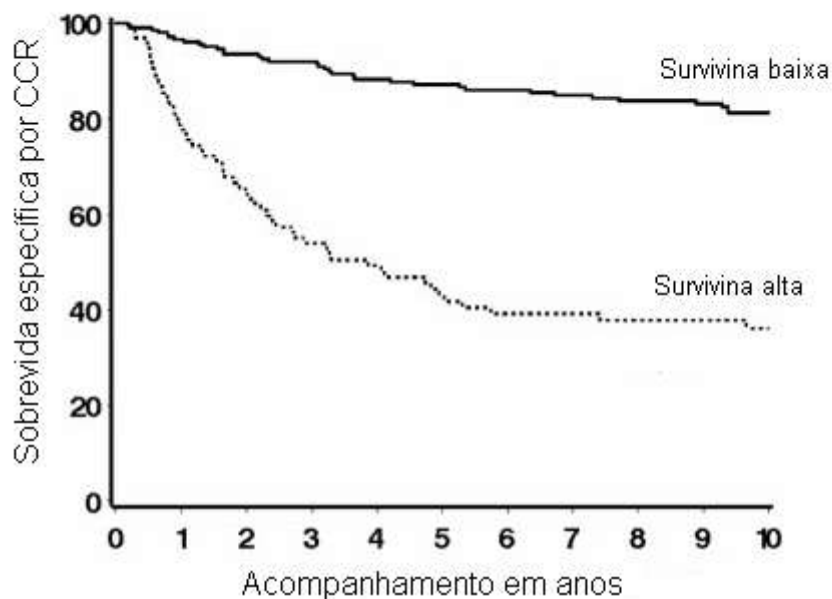


Figura 2: Associação da expressão de survivina com morte por CCR.

Nota: A taxa de sobrevivida por CCR em 1 ano, 5 anos e 10 anos foi de 77,8%, 43% e 36,2 %, respectivamente, para pacientes com expressão de survivina alta comparados a 96,6%, 87,2% e 81,2%, respectivamente, para pacientes com expressão de survivina baixa.

Fonte: Adaptado de Parker e cols., 2006.

Em outra série de 194 pacientes submetidos a nefrectomia por CCR, no período de 1986 a 2004, foi avaliado a expressão por imunohistoquímica de alguns marcadores, entre eles a survivina. Em 104 pacientes foi encontrada expressão do marcador em cerca de 23% dos casos, sendo encontrada relação entre esta expressão com o tipo histológico e o grau tumoral. Além disso, foi sugerido que a expressão da survivina esteja relacionada com um p53 mutante no CCR. Pensa-se que esta expressão simultânea no CCR esteja ligada, não apenas a gênese tumoral, através da proliferação celular, mas

provavelmente também ao desenvolvimento de resistência à quimioterapia (Baytekin e cols., 2009).

Também há relatos de que a superexpressão deste biomarcador esteja correlacionada com resistência à radioterapia (McGuire e cols., 2011; Lei e cols., 2010).

1.5.2 B7-H1 (PD-L1)

O B7-H1 (também chamado de PD-L1), descrito por Dong e colaboradores em 1999, é uma glicoproteína da superfície celular, pertencente à família B7 de moléculas co-estimuladoras que participam na ativação e na deleção de células T ativadas em humanos (Vickers e cols., 2010; McGuire e cols., 2009; Dong e cols., 1999) [Figura 3].

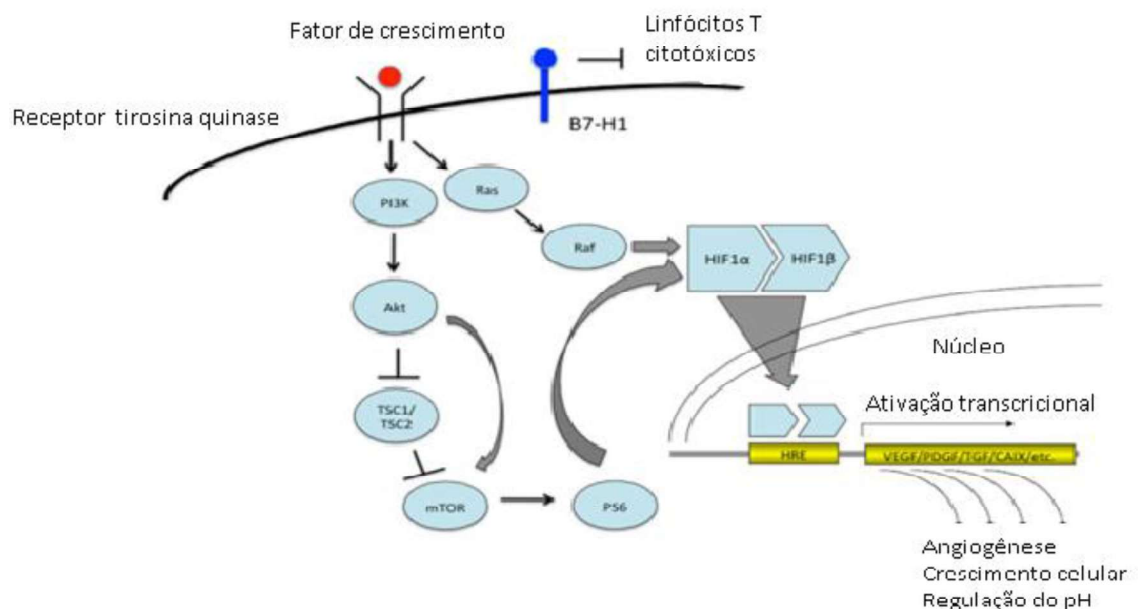


Figura 3: Localização de B7-H1 na célula
Fonte: Adaptado de Vickers e cols, 2010.

Esta glicoproteína tem como função inibir a imunidade mediada por células T (Atkins e cols., 2007; Kim e cols., 2004). Acredita-se que o mecanismo de expressão do marcador em células tumorais está relacionado à regulação gênica no nível pós-transcricional (Hirano e cols., 2005). Tumores associados com B7-H1 tem mostrado inibição da imunidade tumoral específica por células T associados à redução da apoptose por estas células, aumento da produção de citocinas e diminuição da citotoxicidade de células T ativadas (Iwai e cols., 2002).

Em humanos, sua expressão normalmente está limitada a macrófagos, porém sua expressão aberrante tem sido demonstrada em diferentes tumores malignos, incluindo o carcinoma renal (Thompson e cols., 2007) [Tabela 4].

Tabela 4: Tumores humanos com expressão de B7-H1

-
- Carcinoma de células transicionais da bexiga
 - Carcinoma ductal e lobular da mama
 - Carcinoma escamocelular de colo uterino e carcinoma endometrial
 - Adenocarcinoma de cólon
 - Carcinoma escamocelular da laringe
 - Carcinoma hepatocelular
 - Carcinoma de pulmão (escamocelular e adenocarcinoma)
 - Carcinoma ovariano
 - Adenocarcinoma gástrico
 - Carcinoma de glândulas salivares
 - Carcinoma folicular de tireóide
 - CCR, tipo células claras
 - Carcinoma de esôfago
 - Melanoma
 - Glioblastoma
-

Fonte: Thompson e cols., 2007.

Considerando seu estudo nos CCRs, a série inicial da Clínica Mayo foi constituída por 429 pacientes diagnosticados com CCR esporádico, do tipo

células claras, no período 2000-2002. Foram examinados achados patológicos como: tipo histológico, tamanho tumoral, estágio tumoral, envolvimento de linfonodos e presença de metástases à distância no momento da nefrectomia, grau nuclear e presença de necrose. Nestes, também foi analisado por imunistoquímica expressão do B7-H1, usando material a fresco congelado, tendo sido considerado como positivo aqueles que apresentaram 5 a 10% de células coradas. Após, foram feitas comparações entre a expressão do marcador, os dados patológicos e a sobrevida dos pacientes. Como resultado foi obtida um amostra de 196 pacientes que possuíam tecido fresco congelado disponível para o estudo. Nestes demonstrou-se que, os que apresentavam níveis mais altos do marcador, correspondiam a tumores mais agressivos, nos quais os pacientes tinham 4,5 vezes mais chance de morte pela doença em relação àqueles pacientes que tinham baixos níveis do marcador. Sendo assim foi sugerido que o B7-H1 pudesse ser utilizado como marcador prognóstico para o tratamento dos CCR, tanto no pré-operatório, quanto no pós-operatório podendo representar no futuro um possível alvo para o tratamento imunoterápico deste tumor (Thompson e cols., 2004).

Na continuidade dos estudos foi feita análise de nova série contendo CCRs primários (196 casos) e também CCRs metastáticos (26 casos). Foi utilizado tecido a fresco congelado, a análise da expressão proteica foi feita por imunistoquímica com a utilização do anticorpo monoclonal B7-H1 (clone 5H1), sendo considerados positivos tumores com 5 a 10% das células positivas para o marcador. Como resultado este estudo confirmou, que mesmo após ajustes por análise multivariada o tumor que apresentava altos níveis do B7-H1 estava associado de forma significativa a maior risco de morte pelo CCR. Além disso,

também foi relatado que, mesmo naqueles pacientes que já haviam realizado previamente nefrectomia citoredutora, os tumores metastáticos também apresentavam altos níveis do marcador (Thompson e cols., 2005) [Figura 4].

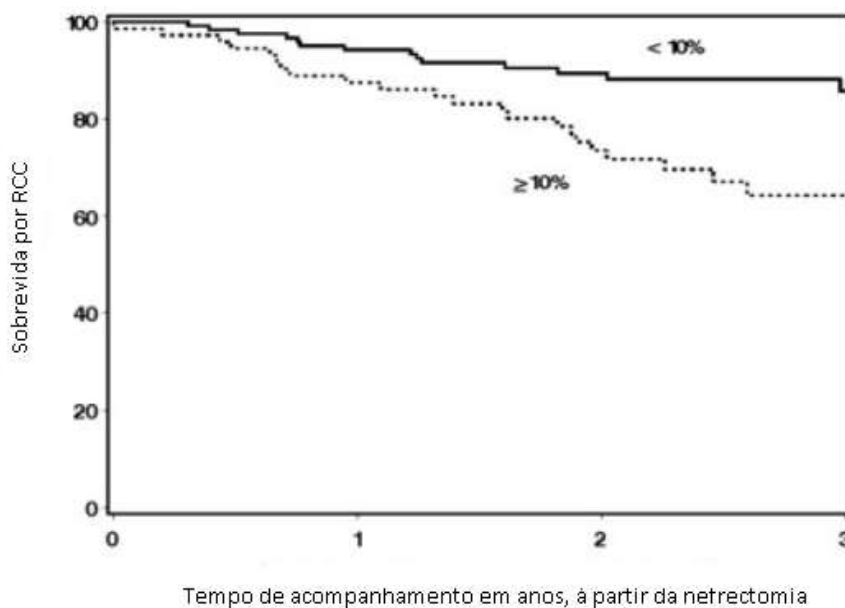


Figura 4: Associação da expressão de B7-H1 e morte por CCR

Nota: A taxa de sobrevivência específica para o CCR no ano 1, 2, e 3 após a nefrectomia foi de 87.5%, 73.6%, e 64.4%, respectivamente para pacientes que apresentavam expressão de B7-H1 > 10% quando comparados com taxas de 94.2%, 89.4%, e 85.8%, respectivamente, para pacientes que apresentavam expressão tumoral de B7-H1 <10%.

Fonte: Adaptado de Thompson e cols, 2005.

Em 2006, foi realizado o primeiro trabalho utilizando material estocado em parafina, tendo sido analisados pacientes com maior período de acompanhamento. Foram selecionados 306 pacientes com CCR do tipo células claras, sendo avaliada a expressão do B7-H1 por imunohistoquímica onde encontrou-se cerca de 25% de positividade. Foi utilizado o ponto de corte de 5% para quantificar a expressão do B7-H1. Além disso, foi demonstrado

que pacientes com tumores positivos para o marcador apresentam maior risco de progressão acelerada da doença e maiores taxas de mortalidade (Thompson e cols., 2006).

Também é relevante destacarmos que um dos grandes motivos de interesse para o estudo de novos marcadores tumorais é o fato de que no futuro os mesmos possam ser utilizados para o desenvolvimento de novas drogas específicas para estes tumores, constituindo a chamada terapia de células alvo. Neste cenário, o B7-H1 poderia tornar-se um bom candidato, pois somado a sua expressão nos CCRs primários também foi demonstrado sua expressão nos tumores metastáticos podendo assim beneficiar aos pacientes de forma mais efetiva na utilização desta nova terapêutica que pode vir a ser desenvolvida (Thompson e cols., 2005).

1.5.3 Expressão associada de B7-H1 e survivina

A expressão conjunta do B7-H1 e da survivina, também tem sido associada com menor sobrevida dos pacientes. Os dois marcadores podem promover, em conjunto, a progressão tumoral utilizando diferentes mecanismos. Eles atuam visando preservar a viabilidade das células tumorais, sendo que o B7-H1 o faz, promovendo a evasão do sistema imune enquanto que a survivina promove a imortalização das mesmas (Figura 5). Sendo assim eles cooperam entre si como fatores preditores de comportamento adverso nos CCR (Thompson e cols., 2007; Parker e cols., 2006; Thompson e cols., 2005).

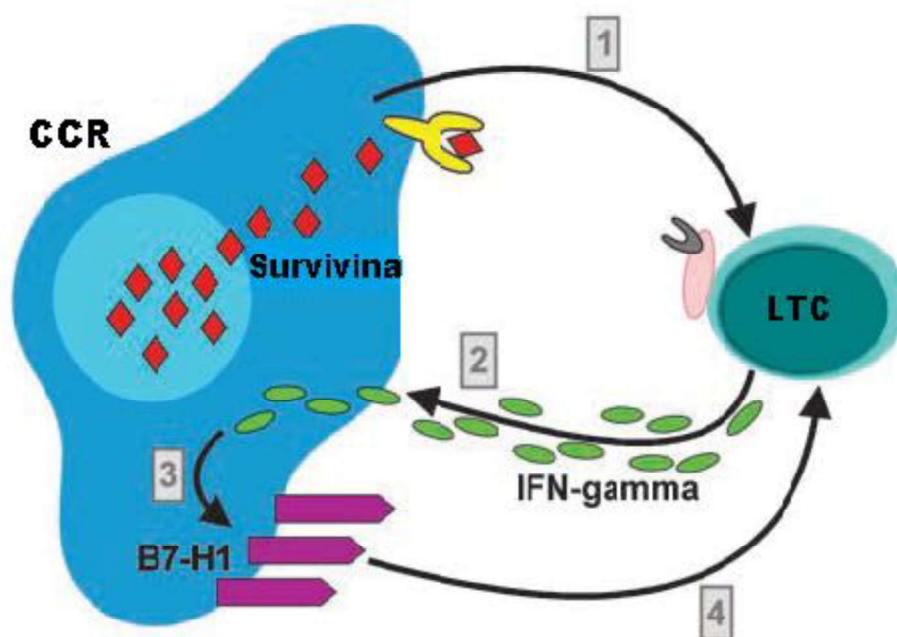


Figura 5. Mecanismo de interação proposto entre B7-H1 e survivina no CCR

1. A survivina é apresentada na superfície tumoral para um receptor específico de antígeno, influenciando os LTC a produzir infiltrado linfocitário; 2. Os LTC são ativados e produzem IFN-gama; 3. O IFN-gama estimula a expressão do B7-H1 pelo tumor; 4. O B7-H1 passa então a interferir na resposta imune antitumoral através da disfunção das células T e apoptose.

Nota: LTC: linfócitos T citotóxicos / IFN-gama: interferon gama

Fonte: Adaptado de Krambeck e cols., 2007.

Em 2009, foi realizado novo trabalho utilizando painel de biomarcadores incluindo ki-67, survivina e o B7-H1 em CCR. Neste foram utilizados 634 casos consecutivos de CCR, no período de 1990-1999, sendo estudada a expressão dos marcadores por imunohistoquímica. Foram encontrados 15,3% de positividade para B7-H1 e 31,2 % para a survivina (Parker e cols., 2009).

Em estudo da expressão simultânea dos dois marcadores foi utilizada uma série inicial de 477 pacientes diagnosticados com CCR esporádico e tratados com nefrectomia. Deste grupo, 298 casos tinham tecido disponível em parafina para avaliação dos marcadores. Esta foi feita através da imunohistoquímica, sendo utilizados os anticorpos anti-survivina (Dako, Carpinteria, USA, diluição 1:100) e anticorpo 5H1, específico para B7-H1. Para

quantificar a expressão da survivina foi considerado o ponto de corte de 2%. Foram consideradas survivina ^{Alta} aquelas que possuíam número de células coradas maior ou igual a 2% e como survivina ^{Baixa} as que possuíam número de células coradas menor ou igual a 2%. Já para B7-H1 foi considerado o ponto de corte de 5%. Tumores positivos passaram a ser denominados B7-H1⁺ e os negativos passaram a se denominar B7-H1⁻. Como resultado foi apresentado 31% como survivina ^{Alta} e cerca de 25% como B7-H1⁺. Ao serem realizadas comparações entre os achados patológicos e a expressão combinada dos marcadores foi encontrado que o grupo survivina ^{Alta} + B7-H1⁺ apresentava os tumores com fenótipos mais agressivos. Além disso, também se demonstrou que estes estavam associados, de forma significativa, a maior risco de progressão da doença e maior chance de morte pelo CCR (Finley e cols., 2011; Krambeck e cols., 2007).

1.6 Referências bibliográficas

- Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer antiapoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 1998; 152:43–49.
- Algaba F, Akaza H, López-Beltrán A, Martignoni G, Moch H, Montironi R et al. Current pathology keys of renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2011 Oct;60(4):634-43.
- Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003; Nov 24;22(53):8581-9.
- Amin MB, Amin MB, Tamboli P, Javidan J, Stricker H, de-Peralta VM et al: Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 281.
- Andersen MH, Svane IM, Becker JC, Straten PT. The universal character of the tumor-associated antigen survivin. *Clin Cancer Res* 2007 Oct;15:13(20):5991-4.
- Atkins MB, Ernstoff MS, Figlin RA, Flaherty KT, George DJ, Kaelin WG Jr, et al. Innovations and challenges in renal cell carcinoma: summary statement from the Second Cambridge Conference. *Clin Cancer Res* 2007 Jan;15;13(2Pt 2):667-670.
- Ayres M, Ayres Jr M, Ayres, DL, Santos AS. *BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: MCT; IDSM; CNPq, 2007. 364 p.
- Baytekin F, Tuna B, Mungan U, Aslan G, Yorukoglu K. Significance of P-glycoprotein, P53 and survivin expression in renal cell carcinoma. *Urologic Oncology* 2011 sep;29(5):502-7.
- Blank C, Brown I, Peterson AC, et al. PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8_ T cells. *Cancer Res* 2004 64:1140–1145.
- Byun SS, Yeo WG, Lee SE, Lee E. Expression of survivin in renal cell carcinomas: association with pathologic features and clinical outcome. *Urology* 2007; 69:34–37
- Brinker DA, Amin MB, de Peralta-Venturina M, Reuter V, Chan DY, Epstein JI. Extensively necrotic cystic renal cell carcinoma: a clinicopathologic study with comparison to other cystic and necrotic renal cancer. *Am J Surg Pathol* 2000;24: 988e95.
- Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol* 2003 170:1257-1266.
- Caruso R, Parisi A, Bonanno A, Paparo D, Quattrocchi E, Branca G, et al. Histologic coagulative tumour necrosis as a prognostic indicator of aggressiveness in renal, lung, thyroid and colorectal carcinomas: A brief review. *Oncol Lett*. 2012 Jan;3(1):16-18.
- Chang YH, Chuang CK, Pang ST, Wu CT, Chuang KL, Chuang HC, et al Prognostic value of TNM stage and tumor necrosis for renal cell carcinoma. *Kaohsiung J of Med Sc* 2011 27,59e63.
- Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* 2004 4:336–347.

- Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol* 2010 May;7(5):245-57.
- Coutinho-Camillo CM, Carvalho AL, Kowalski LP, Soares FA. Expressão nuclear e citoplasmática de survivina e sua correlação com características clínico-patológicas em carcinomas epidermóides orais. *Anais do 54º Congresso Brasileiro de Genética Brasil*; 2008, set 16-19; Salvador, Brasil.
- Dall'Oglio MF, Arap MA, Antunes AA, Cury J, Leite KR, Srougi M. Impact of clinicopathological parameters in patients treated for renal cell carcinoma. *J Urol*. 2007 May;177(5):1687-91.
- Delahunt B, Bethwaite PB, Nacey JN. Outcome prediction for renal cell carcinoma: evaluation of prognostic factors for tumours divided according to histological subtype. *Pathology* 2007 Oct;39(5):459-65.
- Delahunt B. Histopathologic prognostic indicators for renal cell carcinoma. *Semin Diagn Pathol* 1998 Feb;15(1):68-76.
- Delahunt B and Nacey JN: Renal cell carcinoma. II. Histological indicators of prognosis. *Pathology* 1987; 19: 258.
- Dong H, Chen L. B7–H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity. *J Mol Med* 2003 81:281–287.
- Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7–H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002 8:793–800.
- Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7–H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999 5:1365–1369.
- Dong H, Zhu G, Tamada K, Flies DB, van Deursen JM, Chen L. B7–H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(–) T lymphocytes. *Immunity* 2004 20:327–336.
- Eble J.N., Sauter G., Epstein J.I., Sesterhenn I.A. (Eds.): *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. IARC Press: Lyon 2004.
- Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer-Verlag; 2010.
- Eggerer S TNM staging for renal cell carcinoma: time for a new method. *Eur Urol* 2010 Oct;58(4):517-9.
- Eichelberg C, Junker K, Ljungberg B, Moch H. Diagnostic and prognostic molecular markers for renal cell carcinoma: a critical appraisal of the current state of research and clinical applicability. *Eur Urol* 2009 Apr;55(4):851-63.
- Eisenberg MS, Cheville JC, Thompson RH, Kaushik D, Lohse CM, Boorjian SA, et al. Association of microvascular and capillary-lymphatic invasion with outcome in patients with renal cell carcinoma. *J Urol*. 2013 Jan 23
- Escudier B, Eisen T, Porta C, Patard JJ, Khoo V, Algaba F, et al. ESMO Guidelines Working Group Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2012 Oct;23 Suppl 7:vii65-71.
- Ficarra V, Righetti R, Martignoni G, D'Amico A, Piloni S, Rubilotta E, et al. Prognostic value of renal cell carcinoma nuclear grading: multivariate analysis of 333 cases. *Urol Int* 2001 67:130–134.
- Finley DS, Pantuck AJ, Belldegrun AS. Tumor Biology and Prognostic Factors in Renal Cell Carcinoma. *The Oncologist* 2011 16(suppl 2):4-13.

- Frank I, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score. *J Urol* 2002 168:2395–400.
- Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982;6:655–663.
- 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.
- Hirano F, Kaneko K, Tamura H, et al. Blockade of B7–H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res* 2005 65:1089–1096.
- Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 99:12293–12297.
- Isbarn H, Patard JJ, Lughezzani G, Rioux-Leclercq N, Crépel M, Cindolo L et al. Limited prognostic value of tumor necrosis in patients with renal cell carcinoma. *Urology*. 2010 Jun;75(6):1378–84.
- Kattan MW, Reuter V, Motzer RJ et al. A postoperative prognostic nomogram for renal cell carcinoma. *J Urol* 2001 166:63–67.
- Karakiewicz PI, Suardi N, Capitanio U, et al. Conditional survival predictions after nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol* 2009;182:2607–12.
- Kim HL, Seligson D, Liu X, Janzen N, Bui MH, Yu H, et al. Using protein expressions to predict survival in clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004 Aug;15;10(16):5464–71.
- Klatte T, Said JW, de Martino M, Larochelle J, Schuch B, Rao JY et al. Presence of tumor necrosis is not a significant predictor of survival in clear cell renal cell carcinoma: higher prognostic accuracy of extent based rather than presence/absence classification. *J Urol* 2009 Apr;181(4):1558–64.
- Kosari F, Parker AS, Kube DM, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, et al. Clear cell renal cell carcinoma: gene expression analyses identify a potential signature for tumor aggressiveness. *Clin Cancer Res* 2005 Jul;15;11(14):5128–39.
- Krambeck AE, Dong H, Thompson RH, Kuntz SM, Lohse CM, Leibovich BC, et al. Survivin and B7-H1 Are Collaborative Predictors of Survival and Represent Potential Therapeutic Targets for Patients with Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007 March;13:1749–1756.
- Kümmerlin I, Ten KF, Smedts F, Horn T, Algaba F, Trias I. Diagnostic problems in the subtyping of renal tumors encountered by five pathologists. *Pathol Res Pract* 2009 205(1):27–34.
- Yamashita S, Ioritani N, Oikawa K, Aizawa M, Endoh M, Arai Y. Morphological subtyping of papillary renal cell carcinoma: clinicopathological characteristics and prognosis. *Int J Urol* 2007 Aug;14(8):679–83.
- Lam JS, Klatte T, Kim HL, Patard JJ, Breda A, Zisman A, et al. Prognostic factors and selection for clinical studies of patients with kidney cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008 Mar : 65(3):235–62.

- Lam JS, Pantuck AJ, Belldegrun AS, Figlin RA Protein expression profiles in renal cell carcinoma: staging, prognosis, and patient selection for clinical trials. *Clin Cancer Res* 2007 Jan;15;13(2 Pt 2):703-708.
- Lam JS, Shvarts O, Said JW, Pantuck AJ, Seligson DB, Aldridge ME et al: Clinicopathologic and molecular correlations of necrosis in the primary tumor of patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 2517-25.
- Lam JS, Shvarts O, Leppert JT, Figlin RA, Belldegrun AS. Renal cell carcinoma 2005: new frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy. *J Urol* 2005 Jun;173(6):1853-62.
- Lei Y, Geng Z, Guo-Jun W, He W, Jian-Lin Y. Prognostic significance of survivin expression in renal cell cancer and its correlation with radioresistance. *Mol Cell Biochem* 2010 344:23–31.
- Leibovich BC, Han KR, Bui MH, et al. Scoring algorithm to predict survival after nephrectomy and immunotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: a stratification tool for prospective clinical trials. *Cancer* 2003 98:2566–2575.
- Leibovich, BC, Lohse,CM, Crispen,PL, Boorjian SA, Thompson RH, Blute ML, et al. Histological Subtype is an Independent Predictor of Outcome for Patients With Renal Cell Carcinoma *The J of Urol*. 2010 Apr:vol 183,1309-1316.
- Leroy X, Zini L, Buob D, Ballereau C, Villers A, Aubert S. Renal cell carcinoma with rhabdoid features: an aggressive neoplasm with overexpression of p53. *Arch Pathol Lab Med* 2007 Jan;131(1):102-6.
- Li F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *Br J Cancer* 2005 92:212–6.
- Liu L, Qian J, Singh H, Meiers I, Zhou X, Bostwick DG. Immunohistochemical analysis of chromophobe renal cell carcinoma, renal oncocytoma, and clear cell carcinoma: an optimal and practical panel for differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2007 Aug;131(8):1290-7.
- Ljungberg B Prognostic markers in renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol* 2007 Sep;17(5):303-8.
- Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, et al. European Association of Urology Guideline Group. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=EAU+Guidelines+on+Renal+Cell+Carcinoma%3A+The+2010+Update> EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. *Eur Urol* 2010 Sep;58(3):398-406.
- McGuire BB, Fitzpatrick JM. Biomarkers in renal cell carcinoma. *Current Opinion in Urology* 2009 19:441–446.
- Miller DC, Ruterbusch J, Colt JS, Davis FG, Linehan WM, Chow WH, et al. Contemporary Clinical Epidemiology of Renal Cell Carcinoma: Insight From a Population Based Case-Control Study *J Urol* 2010 Dec;184(6):2254-8.
- Moch H, Gasser T, Amin MB, Torhorst J, Sauter G, Mihatsch MJ. Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma: a Swiss experience with 588 tumors. *Cancer* 2000 89:604–614.
- Naito S, Tomita Y, Rha SY, Uemura H, Oya M, Song HZ, et al. Kidney Cancer Working Group report. *Jpn J Clin Oncol* 2010 Sep;40 Suppl 1:i51-56.
- National Cancer Institute – U.S. National Institutes of Health; disponível em <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/kidney>, acesso em março de 2012.

- Nese N, Paner GP, Mallin K, Ritchey J, Stewart A, Amin MB. Renal cell carcinoma: assessment of key pathologic prognostic parameters and patient characteristics in 47,909 cases using the National Cancer Data Base. *Ann Diagn Pathol* 2009 Feb;13(1):1-8.
- Nardi AC, Zequi Sde C, Clark OA, Almeida JC, Glina S: Epidemiologic characteristics of renal cell carcinoma in Brazil. *Int Braz J Urol* 2010; (36): 151-58.
- Novick AC. Kidney cancer: Past, present, and future. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2007 25:188–195.
- Ornellas AA, Andrade DM, Ornellas P, Wisnescky A, de Santos Schwindt AB. Prognostic factors in renal cell carcinoma: analysis of 227 patients treated at the Brazilian National Cancer Institute. *Int Braz J Urol* 2012 Mar-Apr: 38(2):185-94.
- Parker AS, Kosari F, Lohse CM, et al. High expression levels of survivin protein are an independent predictor of poor outcome among patients treated surgically for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 2006 107:37–45.
- Parker AS, Leibovich BC, Lohse CM, Sheinin Y, Kuntz SM, Eckel-Passow JE, et al. Development and evaluation of BioScore: a biomarker panel to enhance prognostic algorithms for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 2009 May;115(10):2092-103.
- Pantuck AJ, Zisman A, Dorey F, et al. Renal cell carcinoma with retroperitoneal lymph nodes: role of lymph node dissection. *J Urol* 2003;169:2076–83.
- Pantuck AJ, Zisman A, Dorey F, et al. Renal cell carcinoma with retroperitoneal lymph nodes. Impact on survival and benefits of immunotherapy. *Cancer* 2003;97:2995–3002.
- Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N, Cindolo L, Ficarra V, Zisman A, et al. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience. *J Clin Oncol* 2005 23:2763–2771.
- Rey JR, Ramírez DL, García SL, Vázquez PF, J. Benavente Delgado JB, Calvo AO. Indicadores pronósticos anatomopatológicos del cáncer de riñón. *Actas Urol Esp* 2010;34(1):71-77.
- Rini BI, Campbell SC, Escudier B Renal cell carcinoma. *Lancet* 2009 Mar: 28;373(9669):1119-32.
- Rioux-Leclercq N, Karakiewicz PI, Trinh QD, Ficarra V, Cindolo L, de la Taille A, et al. Prognostic ability of simplified nuclear grading of renal cell carcinoma. *Cancer* 2007 Mar;110(5):868-74.
- Sengupta S, Lohse CM, Leibovich BC, Frank I, Thompson RH, Webster WS et al. Histologic coagulative tumor necrosis as a prognostic indicator of renal cell carcinoma aggressiveness. *Cancer* August 1;104(3):511-20.
- Serrano MF, Katz M, Yan Y, Kibel AS, Humphrey PA. Percentage of high-grade carcinoma as a prognostic indicator in patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 2008 Aug;113(3):477-83.
- Storkel S, Eble JN, Adlakhia K, et al. Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997 80:987–9.
- Sun M, Shariat SF, Cheng C, Ficarra V, Murai M, Oudard S, Pantuck AJ, Zigeuner R, Karakiewicz PI. Prognostic factors and predictive models in renal cell carcinoma: a contemporary review. *Eur Urol*. 2011 Oct;60(4):644-61

- Sun M, Thuret R, Abdollah F, Lughezzani G, Schmitges J, Tian Z, et al. Age-adjusted incidence, mortality, and survival rates of stage-specific renal cell carcinoma in North America: a trend analysis. *Eur Urol*. 2011 Jan;59(1):135-41.
- Thomas, JO e Tawfik,OW. Recent advances in the diagnosis of renal cell carcinoma. *Diagnostic Histopathology* 2008 14:4
- Thompson RH, Dong H, Kwon ED. Implications of B7-H1 expression in clear cell carcinoma of the kidney for prognostication and therapy. *Clin Cancer Res* 2007 Jan;15;13(2Pt2):709-715.
- Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC et al. 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 Mar;15;13(6):1757-61.
- Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Nat Acad Sci USA* 2004 Dec;101(49):17174-17179.
- Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS et al. Costimulatory Molecule B7-H1 in Primary and Metastatic Clear Cell Renal. *Cell Carcinoma Cancer* 2005 Nov;15;104(10):2084-2089.
- Thompson RH, Kwon ED. Significance of B7-H1 overexpression in kidney cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2006 Dec;5(3):206-11.
- Vickers MM, Heng DY. Prognostic and predictive biomarkers in renal cell carcinoma. *Targ Oncol* 2010 5:85–94.
- Volpe A, Patard JJ. Prognostic factors in renal cell carcinoma. *World J Urol* 2010 28:319–327.
- Wang GC, Hesieh PS, Hsu HH, Sun GH, Nieh S, Yu CP, et al. Expression of cortactin and survivin in renal cell carcinoma associated with tumor aggressiveness. *World J Urol* 2009 27:557–563.
- Webster WS, Lohse CM, Thompson RH, et al. Mononuclear cell infiltration in clear cell renal cell carcinoma independently predicts patient survival. *Cancer* 2006 107:46–53.
- Zamparese R, Pannone G, Santoro A, Lo Muzio L, Corsi F, Pedicillo MC, et al. Survivin expression in renal cell carcinoma. *Cancer Invest* 2008 Nov;26(9):929-35.
- Zhao J, Tenev T, Martins LM, Downward J, Lemoine NR. The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci* 2000 Dec;113Pt23:4363-71.
- Zisman A, Pantuck AJ, Dorey F, et al. Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. *J Clin Oncol* 2001 19:1649–57.

2. Objetivos:

2.1 Geral:

- Estudo dos fatores prognósticos tradicionais e avaliação imunohistoquímica de novos marcadores de agressividade em amostra de CCR do sul do Brasil.

2.2 Específicos:

- Avaliação dos marcadores prognósticos tradicionais, ligados ao exame anátomo-patológico, nos tipos histológicos mais frequentes de carcinoma renal: células claras e papilar;

- Avaliação de novos marcadores imunohistoquímicos, B7-H1 e survivina, candidatos a novos marcadores prognósticos nos tipos mais frequentes de carcinoma renal: células claras e papilar;

- Análise da expressão isolada e conjunta dos marcadores survivina e B7-H1 em pacientes apresentando os tipos mais frequentes de carcinoma renal;

- Estudo da relação entre os fatores prognósticos tradicionais e a expressão imunohistoquímica dos marcadores: survivina e do B7-H1.

3. Artigo científico

Title: Renal cell carcinoma: evaluation of prognostic factors in 98 cases at reference hospital from Porto Alegre, Brazil.

Authors: Freitas, AMS and Hartmann, AA

ABSTRACT: In hospital of Porto Alegre, Brazil we had done a transversal study with renal cell carcinoma (RCC) patients between 2006-2009 who had underwent radical nephrectomy. We selected cases that had diagnostic of more common histologic subtype: clear cell and papillary. We retrospectively reviewed pathological data to determine traditional prognostic factors like size, presence of coagulative necrosis, Fuhrman grade and TNM. Associated we made an immunohistochemistry study with new promise markers survivin and B7-H1. As results we had 98 cases, 90% were clear cell histologic subtype, 73% of cases were tumors classified as T1 and T2 in TNM, the majority were Fuhrman nuclear grade 2 or 3 and 70% had coagulative necrosis. About new prognostic marker we found 50 cases positives only to survivin and 38 to B7-H1. For both markers we had 23 cases. In this study we analyse relationship of traditional prognostic markers and expression of dual markers in RCC and saw that only coagulative necrosis were significant ($p < 0.001$). This finding suggest like others that we had saw upon in literature that necrosis must be consider an important prognostic factor in RCC.

KEY WORDS: renal cell carcinoma, kidneys neoplasm, tumoral biomarkers, immunohistochemistry

Introduction

In the United States, during 2013, over 60.000 new cases of renal cell carcinoma (RCC) are expected and, approximately 13.000 of them, will die²². RCC represents the seventh most common malignancy in men and the ninth in women²⁶. Considering there is a substantial difference in the prognosis and biological behaviour associated with the different histological types of RCC, the precise diagnosis becomes essential. The most common histological types are those of clear cell and papillary types, representing 70-75% and 15-20% of cases, respectively. The first type behaves more aggressively and is also responsible for a higher number of deaths¹⁷.

Nowadays, due to the advancements obtained in diagnostic imaging, 50% of RCCs diagnosed, are detected accidentally⁴. Nonetheless, the incidence and the mortality of RCC have remained on the rise in recent times. This data is probably justified by the fact that almost 30% of RCC cases present disseminated disease at the time of diagnosis and that around 50% of them will evolve to death, due to metastases, during the first 5 years after diagnosis. The progression of the disease causes significant changes in mortality with declining survival rates ranging from 60% to less than 10%²⁴. This fact seems to be related to, already, advanced disease at the time of diagnosis or with those cases that will progress in spite of surgical treatment. For these cases, neither chemotherapy nor radiotherapy have proved to be efficient. Yet, there are reports that nearly 20% of RCCs respond to some type of immunotherapy³. It is known that RCCs are affected by the immune response of the host, which can modify the progression of cancer¹⁴. Due to this, the study of new prognostic

markers, becomes important for the understanding of the RCC behaviour, and may improve the selection of the more aggressive cases, that could benefit from more specific therapy, of the target-cell type. Survivin and B7-H1 are new markers and have been considered promising prognosis markers^{8,9,10}. Survivin is a bifunctional inhibitor of the apoptosis protein (IAP) and is involved in cell cycle regulation and suppression of apoptosis²². It seems to be involved with resistance to radiotherapy, as well as chemotherapy, in multiple human tumors. Moreover, it is not detected in normal adult human tissues, but its expression has been demonstrated in many human malignant tumors, such as kidney, breast, colon, ovary, skin, lung, lymphoma, leukaemia and melanomas, thus turning it into a likely candidate to be a therapeutic target for specific treatments against cancer²⁶. The B7-H1 (PD-L1) is a cellular glycoprotein, of the B7 family, that participates in the regulation of human cellular immunity and is usually restricted to macrophages³⁴. The expression of this marker in RCC has been associated with the worst prognosis¹¹. From here, the joint expression of B7-H1 and Survivin was studied in RCC, and it was noted that this was associated with an increased risk of cancer progression and risk of death⁷. Therefore, we decided to study the immune-histochemical expression of these markers in a sample of RCC in Brazil, as well as their associations with traditional prognostic markers.

Objectives

To study the expression of the new markers, survivin and B7-H1, by immunohistochemical (IHC) in RCC and, the traditional prognostic factors, as well as

their correlations. Due to the scarcity of data about RCC in our country, we also intend to collaborate to increase knowledge regarding this issue in our midst.

Material and methods

After the approval of the Ufcspa Ethics Committee (Nº 495/09) the sample was chosen. The inclusion criteria were: patients who underwent radical nephrectomy for RCC, of the papillary and clear cell types, in the period 2006-2009, at the Hospital Santa Casa de Porto Alegre and, who had tumor samples encased in paraffin blocks, for IHC study. After that, the review of cases by the pathologist took place, using the classification of the World Health Organization (WHO). The following data of the RCC were analyzed: size, histological type, necrosis, sarcomatoid dedifferentiation, lymphocytic infiltration, lymph node and adrenal compromise. To study the tumor extension, the invasion of the ureter, vessels of the hilum, the renal pelvis, the renal capsule, renal sinus and perirenal adipose tissue were examined. For the IHC study, a block of paraffin with a tumor sample, was selected at random. The blocks were sectioned at a thickness of 3µm, dewaxed and rehydrated to perform the technique. The Method used was the ADVANCE™ HPR, by Dako for the detection of proteins: CD 274 (B7-H1, PD-L1) and Survivin. Antigenic recovery was performed in Tris-EDTA (pH 9,0), in a double boiler (95-98°C), for 30 minutes. Endogenous peroxidase activity was blocked using two baths, 10 minutes each, in 30 volumes hydrogen peroxide (H₂O₂), at 5%, in methanol. The blocking of non-specific reactions was performed with 5% Molico milk, for 1 hour. Incubation with primary antibodies was carried out overnight at 4°C. Incubation with the secondary and tertiary antibodies was performed for 40 min at room

temperature. For negative control of the technique, we used the same tissue, with the same antibodies, except the primary one, which was replaced by 1%BSA. The antigen-antibody binding was visualized with the DAB chromogen (diaminobenzidine). Counter staining was performed with Harris haematoxylin; the slides were dehydrated and mounted with synthetic resin. The antibodies used were: Survivin Rabbit Polyclonal, Lab. Thermo Scientific (Fremont, USA) at a 1:50 dilution, and CD274 (B7-H1) *Lab. Biolegend* (San Diego, USA), Clone 29E.2AE at a 1:75 dilution. As positive controls prostatic carcinoma and palatine tonsil were used respectively. For the survivin, the analysis of the results was semi-quantitative. A positive nuclear staining (Figure 1) was considered quantified by the number of positive tumor cells for five high-power fields (CGA) with CX 41 Olympus microscope (Olympus, Japan). With the 10/20 eyepiece and a 40X lens, a view field of 0.20 mm^2 for the great magnification⁵. For the evaluation of B7-H1, staining of the cell membrane was considered positive, (Figure 2) with a cutting point of 10%³⁰. According to the results, groups were formed: GROUP 1: positive cases for both markers, GROUP 2: positive cases for one marker and negative for the other and GROUP 3: negative cases for both markers. Then, the associations between the groups - made up by the IHC results - were analysed and, the pathologic data was studied. For this end, we used the statistical softwares *Sphinx and BioEstat 5.0* using the *Chi square* test.

Results

The total number of cases of the sample was 98, and the majority (73%) of tumors were classified as T1 and T2. Most cases (90%) were of the clear cell

type and 10% were papillary. As for Fuhrman's nuclear grade, 93% presented nuclear grades 2 and 3. In the tumor extension study, invasion of the renal capsule was found in around 50% of cases, of the renal sinus in 20%, of the renal pelvis in 30% and of the vessels in around 8% of cases. The invasion of the peri-renal adipose tissue was positive in 30% of cases while invasion of the ureter was observed in 1% of cases. As to the adrenal, it was present and positive in only 7% of cases. The finding of necrosis was present in 70% of cases and sarcomatoid differentiation in 10%. In the nephrectomies analysed, lymphadenectomy occurred in 30% of cases. Of these, only 5% were positive. With respect to the presence of peritumoral lymphocyte infiltrate, it was present in about 80% of cases and in most cases it was classified as focal. In the results of the IHC study, 38 positive cases were obtained (38,8%) and 60 negative cases (61,2%) for B7-H1 while for survivin, 50 positive and 48 negative cases were found. Regarding survivin, the cases were selected in intervals by the coloration intensity, being classified by the number of positive cells for the marker per mm². In the analysis of surviving positive cases, through the staining intensity, there was no relevance at any interval. When analysing the IHC results through the groups, we obtained: GROUP 1: 23% of cases, GROUP 2: 43% and GROUP 3: 34%. In the GROUP 2 analysis, we found 15% of positive cases only for B7-H1 and 28% only for survivin. Concerning associations between groups formed and prognostic factors, we did not find an association between the traditional factors and the expression of the new markers. The exception was the association found between group 1 and the presence of necrosis, which was significant (with $p < 0.0001$). In the other items studied, the variables remained independent, with no statistical significance for p .

Discussion

Our results, in general, confirm the RCC data available in the literature. Data on RCC in the national literature are scarce. In Brazil, the National Cancer Institute (INCA) provides information on the most common types of cancer. Due to its lower prevalence, data about RCC are not included. The number of RCC cases in Brazil was estimated at 1 to 2% of the total amount of cases, whereas in the global estimate, this number could reach 3% of all malignancies^{20,21,26}. A large variation in the number of cases can be observed among different geographical areas, with higher rates foreseen for Europe and North America and lowest for South America and Asia⁷. Our sample had a total of 98 cases of RCC during a 4 year period, from a single region of Brazil. There are large variations in the national data published, regarding the studied period, origin and amount of cases per sample. For example, there is a report of a national series of 230 cases, over a period of 15 years, originating from a single region or, from another series of 508 cases, over a period of 1 year, but with data from around the country. Therefore, our data may contribute to increase knowledge about the disease in our country^{6,21}. Demographic data obtained in the study show similarities with the national and international literature, considering the information relevant for prognosis and tumor size, histological type and nuclear grade³¹. Regarding the classification by size of the primary tumor, had a balanced division of cases, but with a predominance of smaller tumors: 50% of the patients had tumors smaller than 7.0 cm, while in other series these values were approximately 40%^{17,23}. Tumor size is part of the TNM system and remains important for prognosis, as patients with larger tumors have lower

survival rates than those with smaller tumors, with rates ranging from 0 to 84%¹⁵. When RCCs were studied through TNM, there was a concentration in T1 and T2 (73%). Nardi et al. found 62% for the same stages, highlighting that among the 508 cases in the sample, 86 of them were not classified²¹. In international series, tumors classified as T1 and T2 represent up to 60% to 70% of cases¹¹. Literature data shows that survival in both the short and long terms, are markedly higher for early tumors (pT1a and pT1b) than for larger and more advanced tumors, reaffirming the importance of tumor size for prognosis of RCC⁶. With respect to the histological type, clear cell carcinoma was the most common, followed by papillary type, as observed in the literature, that provides 70 to 80% for the former and 5 to 15% for the latter^{26,33}. When we consider the Fuhrman nuclear grade, we had 93% of cases in grades 2 and 3, while in the international data this finding is 80% and in the national about of 75%^{17,21}. The presence of necrosis was reported in approximately 70% of cases. In another Brazilian series, this finding was 50%, while in international data, this finding is about 40%.

Alongside the traditional prognostic factors, this finding has been investigated, since it seems that it can be a good indicator of aggressiveness. The results so far, are still heterogeneous, but there are studies, already reinforcing this idea^{17,23,26}. Despite the advances made in diagnosis, one of the striking features of RCC continues to be high mortality, since the survival rate has remained unchanged in recent years. It is known that traditional prognostic factors fail to adequately select the most aggressive cases. For this reason, a growing interest has been noted in the literature, in search for new prognostic markers that may be more effective in the selection of cases with a more

adverse behaviour. Among these we can highlight those that may assist in the selection of cases that would benefit from specific therapies, such as target-cell therapy. In recent years, several studies with new markers have been considered promising, such as survivin and B7-H1 using IHC for their analysis.

In 2005, a study on the gene profile of RCC showed that survivin was a good marker of tumor aggressiveness, and its expression was associated with survival²². Furthermore, in a study from the Mayo Clinic with 312 RCC cases, found 31.1% expressing high levels of survivin and confirmed that these patients had shorter survival and increased risk of death from cancer^{25,32}. In 2010, the association between the marker and other pathological factors was studied and, it was observed that, the staging and tumor grade, as well as lymph node involvement, were significantly associated with expression levels of the same. Thus, survivin was considered an independent prognostic factor for RCC¹⁶.

In 2004 the study of B7-H1 begins, with a series of 196 RCC cases, using fresh frozen tissue. Analysis of the expression was the positive staining of the membrane with a cutting off point of 10% of the cells and conventional microscopic examination by a pathologist. In this case, 37,2 % positives were found. It was observed that the expression of this marker in RCCs primary tumors was associated with shorter survival³⁰. In this work, as in others of the same group, the primary antibody 5H1 (monoclonal anti-human B7-H1), developed at the institution, was used. In 2005, a new study on the marker, then in metastatic tumors, confirms the same finding⁸. For this work, fresh frozen tissue samples were still used. The staining of the membrane and a cutting off point of 5-10% for the positive cases, were considered for this

analysis, besides using conventional microscope examination by a pathologist. There were 130 cases in this group and 66,3% positive cases were found²⁹. To continue, the authors performed a new study in 2006, using material blocked in paraffin, maintaining all other previous parameters. The series had 306 cases and obtained 24% positive results. It was also described that, the positive expression of this marker in clear cell RCC type, was associated with adverse pathologic findings such as advanced staging, larger tumor size, high nuclear grade and necrosis. In addition, there was also a relationship between the positive marker and a higher risk of progression and death from cancer, emphasizing the hypothesis that this may be a marker of poor prognosis in RCC²⁸.

After the promising results of isolated analysis, the study of the joint expression of the RCC markers began. In 298 cases, dual expression in 20% was obtained and its association with a worse prognosis was perceived, which may be regarded as a predictor of tumor aggressiveness. The cutting point for the survivin analysis was 2% and for that of B7-H1 was 5%. The microscopic analysis was performed using a digital apparatus and the values used had been defined in a previous study²⁵.

Subsequently, in 2009, a new work describes the development of a normogram based on markers, called *Bioscore*, which uses the characteristics linked to the joint expression of survivin, B7-H1 and Ki-67.

In this occasion, 634 cases were analyzed and it was tested whether the association of expressions would improve the predictive capacity of the markers, previously observed in individual analyses.

The parameters considered for the B7-H1 analysis of expression were: colouring of the membrane and cutting point of 5 – 10% for the stained cells. For survivin, the nucleus colouring was taken into account, undergoing a semi-quantitative analysis, obtaining the number of cells per mm², attaining, as a result high or low survivin. The expression analysis was determined by a pathologist by means of a conventional microscope. As a result we obtained a total of 15.3% of positive cases for B7-H1 and 31.2% for high survivin²⁴. In our study we analyzed the two markers separately and together. We obtained isolated positives for the B7-H1 in 38,8% while in the literature we found results with great variation, with rates ranging from 24% to 66%^{14,28,30}.

In the isolated analysis of survivin we had about 50% of positive cases, while in other studies these values vary from 30 to 32%^{14,24}. Regarding the joint analysis of the markers, we obtained 23% positives while in the literature, this result was 13,8%¹⁴. It is important to report that, although following the methodology described, we had difficulty working with the antibodies²⁴. Maybe one of our limitations was the fact of using a commercially available antibody while the other group used their own antibody^{28,29,30}.

After the IHC study, we formed groups, called 1, 2 and 3 considering the result of the expression for both markers. When investigating the relationship between groups and pathological data, we found no association between the groups and histological type. Even with the numerical limitation of our sample, we obtained this information, unprecedented in the literature. The only association obtained between pathological data and the expression of markers was the one found between necrosis and group 1 (positive cases for both markers), with statistical significance. Recently, the expansion of data on RCC

necrosis, available in the literature, is noticeable. In a large study of RCC cases, of the mixed series, positive findings were 28%. Moreover, associations with high grade tumors, more advanced stages, a greater chance of lymph node involvement, as well as, distant metastases, have been reported. Thus, necrosis was considered an independent factor for the survival of the CCR²⁷. In a new study, modifications were suggested for the analysis of necrosis. The author suggested that the microscopic assessment of necrosis should be more detailed instead of just restricting ourselves to report its presence or absence.

With this aim in mind the creation of a score was proposed. In this study, necrosis was found in 66% of cases and it was concluded that, even though in this case not having behaved as an independent factor, its presence is a factor for a bad prognosis, being associated with adverse factors such as higher TNM stage, high nuclear grade, vascular invasion and sarcomatoid dedifferentiation. Therefore, the author suggests that the presence of tumor necrosis should be routinely reported in the report of pathological nephrectomies for RCC¹². Additionally, there are reports of the association between histological type and necrosis, with repercussions for the prognosis, being more important in the clear cell type than in the others⁷. There are controversial data in the literature on the subject. In a series of 213 cases, necrosis was reported in 63.8% of them, but not demonstrated that the presence or extent of the same was relevant for the prognosis¹⁹. In a study of 1526 patients, tumor necrosis was found in 31.2% of them. Furthermore, it demonstrated that this was important for mortality, but was not an independent prognostic factor for survival¹⁰. However, the work that described the creation of the Mayo Clinic's prognostic nomogram for RCC, necrosis was incorporated as a factor to be assessed⁹.

Thus, our data seems to add to those that point at necrosis as important for the prognosis of RCCs and, as such, we think that this assessment should be carried out more carefully and that their outcome should routinely be part of the pathology report.

Conclusion

Considering the data discussed we believe that the markers studied may be promising in the future, but still need further research using more easily repeatable methodologies. In our opinion, currently, the data still seem heterogeneous.

In the study of the relationship between data and the pathological expression of B7-H1 and survivin markers, no association was found between the histological type and the expression thereof.

However, we obtained a significant association of the markers joint positivity with necrosis, reinforcing in this way the importance of this factor. Necrosis should possibly be assessed with more criteria during the microscopic study, becoming a routine issue in all RCC reports.

In the current scenario, studies that seek to find markers for the selection of RCC more aggressive cases are still necessary and, continue having an important role for a better prognosis of the illness.

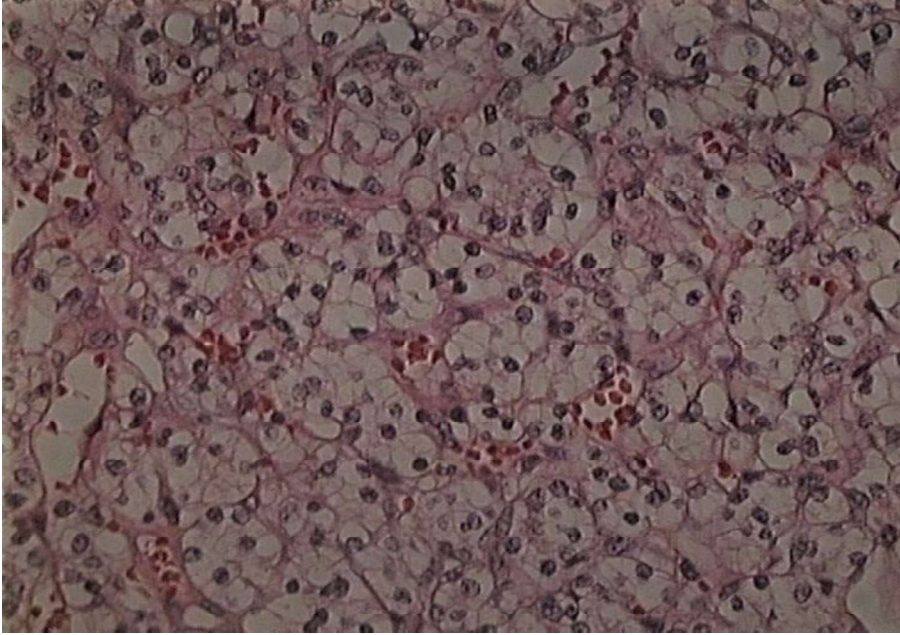


Fig. 1 RCC clear cell subtype, H&E. Photomicrograph_ 40X.

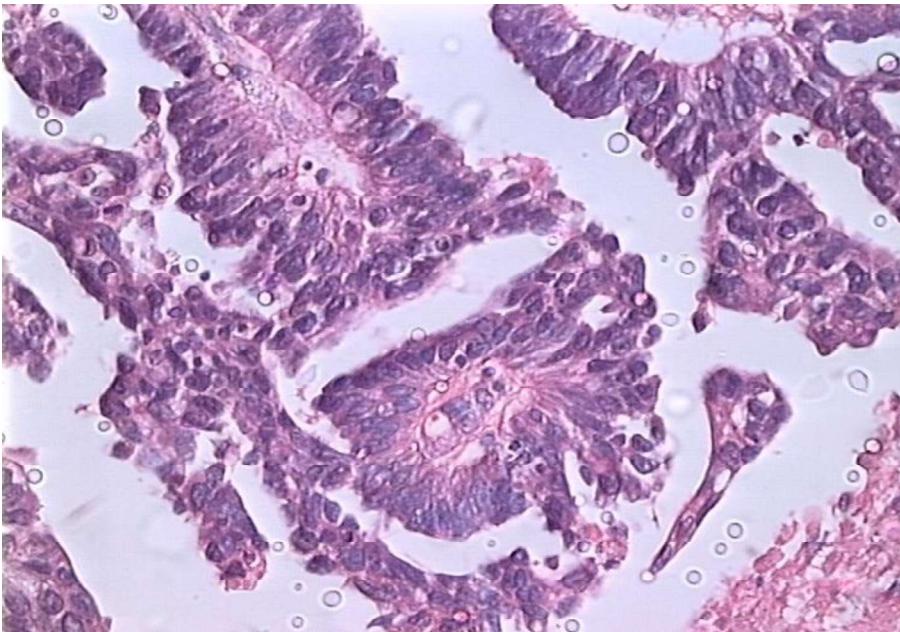


Fig. 2 RCC papillary subtype, H&E. Photomicrograph_ 40X.

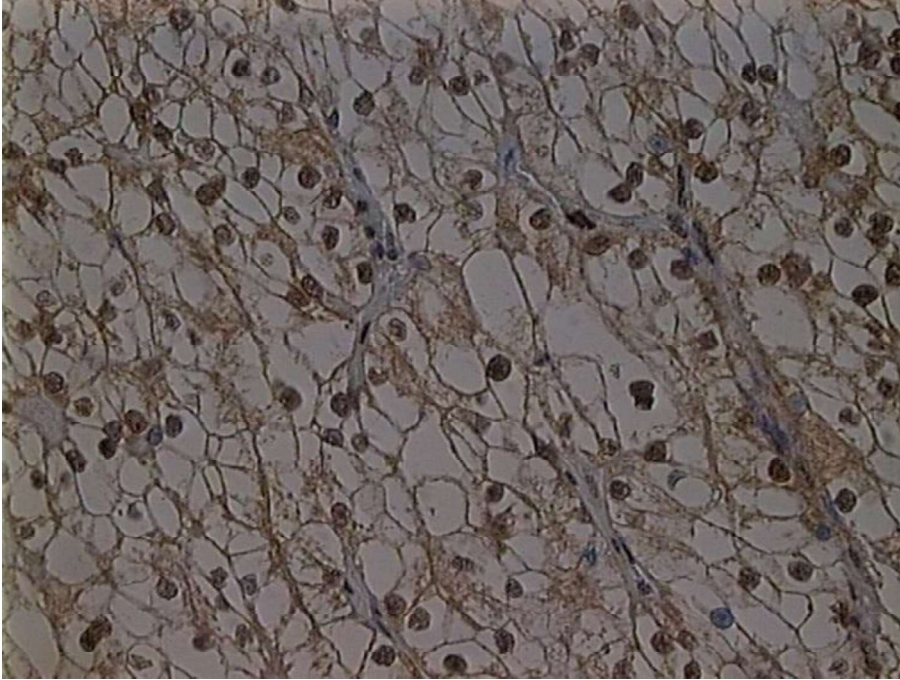


Fig. 3 Immunostaining positive for survivin protein expression in RCC. Photomicrograph_ 40X.

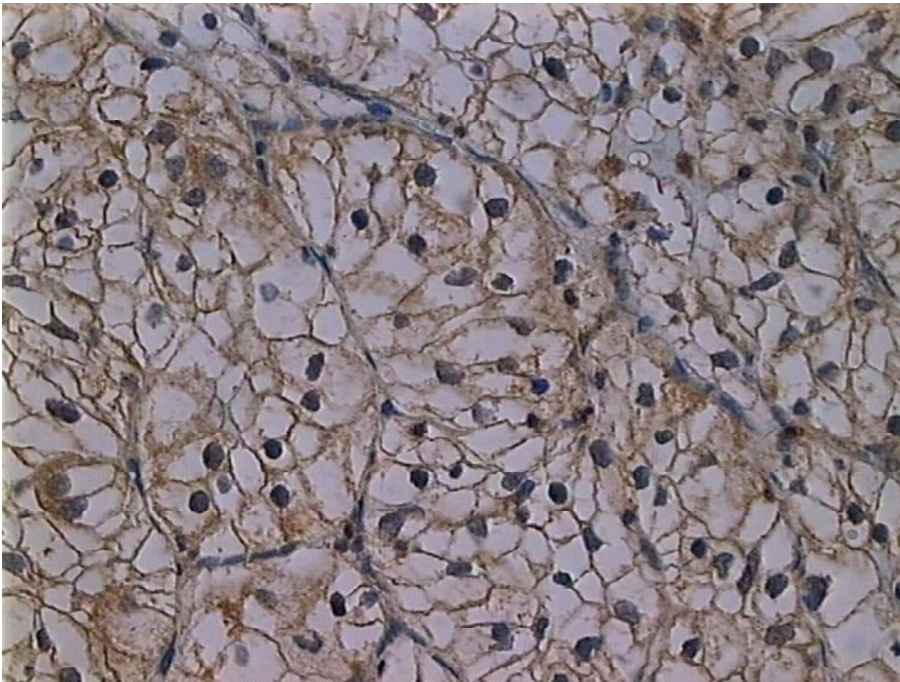


Fig. 4 Immunostaining positive for B7-H1 protein expression in RCC. Photomicrograph_ 40X.

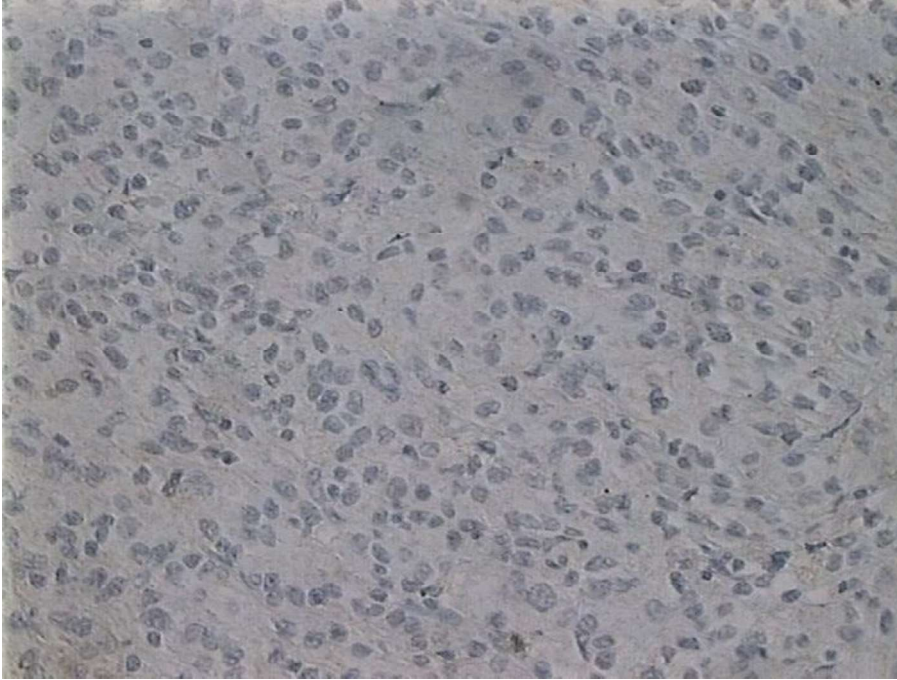


Fig. 5 Immunostaining negative for B7-H1 protein expression in RCC. Photomicrograph_40X.

Table 1: Demographic data (n= 98 cases)

| Variable | | | Cases (%) | Variable | | | Cases (%) | |
|-------------------------------|------------|--|-----------|----------------------------------|----------|-----------|-----------|--|
| Laterality | Right | | 50 (51) | Venous invasion | Present | | 8 (8,2) | |
| | Left | | 38 (38,8) | | Absent | | 90 (91,8) | |
| | NA | | 10 (10,2) | | | | | |
| Size * | pT1a | | 29 (29,6) | Renal pelvis invasion | Present | | 23 (23,5) | |
| | pT1b | | 27 (27,0) | | Absent | | 75 (76,5) | |
| | pT2a | | 26 (26,5) | | | | | |
| | pT2b | | 16 (16,3) | | | | | |
| Histologic subtype | Clear cell | | 86 (87,8) | Ureter invasion | Present | | 1 (1,0) | |
| | Papillary | | 12 (12,2) | | Absent | | 97 (99,0) | |
| Sarcomatoid dedifferentiation | Present | | 10 (10,2) | Perinephric soft tissue invasion | Present | | 24 (24,5) | |
| | Absent | | 88 (89,8) | | Absent | | 74 (75,5) | |
| Fuhrman nuclear grade | 1 | | 6 (6,1) | Lymphocytic infiltration | Present | | 79 (80,6) | |
| | 2 | | 51 (52,0) | | Focal | | 43 (43,9) | |
| | 3 | | 40 (40,8) | | Moderate | | 28 (28,6) | |
| | 4 | | 1 (1,0) | | Marked | | 8 (8,2) | |
| Necrosis | Present | | 70 (71,4) | | Absent | | 21 (19,4) | |
| | Absent | | 28 (28,6) | Lymph node | Present | | 27 (27,5) | |
| Renal capsule invasion | Present | | 48 (49,0) | | Positive | | 5 (5,1) | |
| | Absent | | 50 (51,0) | | Negative | | 22 (22,4) | |
| Sinus fat involvement | Present | | 10 (10,2) | NA | | 71 (73,5) | | |
| | Absent | | 88 (89,8) | Adrenal | Present | | 32 (39,8) | |
| | | | | | Positive | | 7 (21,8) | |
| | | | Negative | | | 25 (78,2) | | |
| | | | | NA | | 59 (60,2) | | |

Note: NA = not available

* pT1a : smaller or equal to 4 cm // pT1b: higher than 4 cm and smaller or equal to 7 cm

pT2a: higher than 7 cm and smaller or equal than 10 cm // pT2b: higher than 10 cm

Reference: Organized by authors

Table 2: Association between traditional prognostic factors and results of IHQ study using Chi-square test.

| Variable | Immunohistochemistry markers (B7-H1 and Survivin) | <i>p</i> |
|----------------------------------|---|----------------|
| Fuhrman nuclear grade | GROUP 1 and GROUP 2 | 0,0923 |
| | GROUP 1 and GROUP 3 | 0,2147 |
| Renal capsule invasion | GROUP 1 and GROUP 2 | 0,7488 |
| | GROUP 1 and GROUP 3 | 0.4151 |
| Soft tissue perinephric invasion | GROUP 1 and GROUP 2 | 0,0751 |
| | GROUP 1 and GROUP 3 | 0,3386 |
| Renal pelvis invasion | GROUP 1 and GROUP 2 | 0,0564 |
| | GROUP 1 and GROUP 3 | 0,0811 |
| Sinus fat involvement | GROUP 1 and GROUP 2 | 0,4022 |
| | GROUP 1 and GROUP 3 | 0,2463 |
| Necrosis | GROUP 1 and GROUP 2 | 0,4093 |
| | GROUP 1 and GROUP 3 | 0,0001* |

Note: * significant at 1% even after Yates correction.

Conclusion

Thereafter consider all discussed data we believe that these markers B7-H1 and survivin could be useful to RCC prognostic. However it was essential that new studies had been done making more simple and homogeneous methods. Until now, in our concerning data are insufficient and not entire reliable. We didn't found association between subtype histologic and expression of markers but we achieved an important correlation with coagulative necrosis presence in RCC and group with dual expression of studied biomarkers. Our notices designate that necrosis possible must be heedful evaluated in microscopic study as so your presence always be referred at RCC pathologic report. Further research to find adequate markers to select aggressive cases have a significant role in RCC prognostic and continue to be necessary to future changes in natural history of disease.

References

1. National Cancer Institute – U.S. National Institutes of Health; available at <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/kidney>, access in 2013 february
2. Rini, B.I.; Campbell, S.C.; Escudier, B. Renal cell carcinoma. *Lancet*, v. 28, n. 373(9669), p. 1119-32, 2009.
3. Leibovich, B.C. *et al.* Histological subtype is an independent predictor of outcome for patients with renal cell carcinoma. *The J of Urol*, n. 183, p.1309-1316, 2010.
4. Chang, Y.H. *et al.* Prognostic value of TNM stage and tumor necrosis for renal cell carcinoma. *Kaohsiung J of Med Sc*, n. 27, p. 59-63, 2011.
5. Parker, A.S. *et al.* Development and evaluation of BioScore: a biomarker panel to enhance prognostic algorithms for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*, v.15, n.115, p. 2092-103, 2009.
6. Atkins, M.B. *et al.* Innovations and challenges in renal cell carcinoma: summary statement from the Second Cambridge Conference. *Clin Cancer Res*, v. 15, n.13, p. 667-670, 2007.
7. Krambeck, A.E. *et al.* Survivin and B7-H1 are collaborative predictors of survival and represent potential therapeutic targets for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, n.13, p.1749-1756, 2007.
8. Zhao, J. *et al.* The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci*, v.113, n.23, p. 4363-71, 2000.
9. Andersen, M.H. *et al.* The universal character of the tumor associated antigen survivin. *Clin Cancer Res*, v.15, n.13, p. 5991-4, 2007.
10. Li, F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *Br J Cancer*, n. 92, p.212–6, 2005.
11. Thompson, R.H. *et al.* Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Nat Acad Sci USA*, v. 101, n.49, p. 17174-17179, 2004.
12. Nardi, A.C. *et al.* Epidemiologic characteristics of renal cell carcinoma in Brazil. *Int Braz J Urol*, n.36, p.151-58, 2010.
13. Naito, S. *et al.* Kidney Cancer Working Group report. *Jpn J Clin Oncol*, n. 40, Suppl 1, p. 51-56, 2010.
14. Chow, W.H.; Dong, L.M.; Devesa, S.S. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol*, v.7, n.5, p.245-57, 2010.
15. Dall'Oglio, M.F. *et al.* Impact of clinicopathological parameters in patients treated for renal cell carcinoma. *J Urol*, v.177, n.5, p. 1687-91, 2007.
16. Volpe, A.; Patard, J.J. Prognostic factors in renal cell carcinoma. *World J Urol*, n.28, p.319–327, 2010.
17. Ornellas, A.A. *et al.* Prognostic factors in renal cell carcinoma: analysis of 227 patients treated at the Brazilian National Cancer Institute. *Int Braz J Urol*, v. 38, n. 2, p.185-94, 2012.
18. Lam, J.S. *et al.* Prognostic factors and selection for clinical studies of patients with kidney cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, v. 65, n.3, p. 235-62, 2008.
19. Karakiewicz, P.I. *et al.* Conditional survival predictions after nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol*, v. 182, p.2607–12, 2009.

20. Yamashita, S. *et al.* Morphological subtyping of papillary renal cell carcinoma: clinicopathological characteristics and prognosis. *Int J Urol*, v.14, n.8, p. 679-83, 2007.
21. Adida, C. *et al.* Developmentally regulated expression of the novel cancer antiapoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol*, v.152, p. 43-49, 1998.
22. Kosari, F. *et al.* Clear cell renal cell carcinoma: gene expression analyses identify a potential signature for tumor aggressiveness. *Clin Cancer Res*, v.11, n.14, p. 5128-39, 2005.
23. Parker, A.S. *et al.* High expression levels of survivin protein are an independent predictor of poor outcome among patients treated surgically for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*, v. 107, p. 37-45, 2006.
24. Wang, G.C. *et al.* Expression of cortactin and survivin in renal cell carcinoma associated with tumor aggressiveness. *World J Urol*, v. 27, p. 557-563, 2009.
25. Lei, Y. *et al.* Prognostic significance of survivin expression in renal cell cancer and its correlation with radioresistance. *Mol Cell Biochem*, v. 344, p. 23-31, 2010.
26. Thompson, R.H. *et al.* Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*, v. 104, n.10, p. 2084-2089, 2005.
27. Thompson, R.H. *et al.* Significance of B7-H1 overexpression in kidney cancer. *Clin Genitourin Cancer*, v.5, n.3, p.206-11, 2006.
28. Sengupta, S. *et al.* Histologic coagulative tumor necrosis as a prognostic indicator of renal cell carcinoma aggressiveness. *Cancer*, v.104, n.3, p. 511-20, 2005.
29. Klatte, T. *et al.* Presence of tumor necrosis is not a significant predictor of survival in clear cell renal cell carcinoma: higher prognostic accuracy of extent based rather than presence/absence classification. *J Urol*, v. 181, n. 4, p. 1558-64, 2009.
30. Delahunt, B.; Nacey, J.N. Renal cell carcinoma. II. Histological indicators of prognosis. *Pathology*, v.19, p. 25-8, 1987.
31. Minervini, A. *et al.* Prognostic role of histological necrosis for nonmetastatic clear cell renal cell carcinoma: correlation with pathological features and molecular markers. *J Urol*, v. 180, n. 4, p. 1284-9, 2008.
32. Isbarn, H. *et al.* Limited prognostic value of tumor necrosis in patients with renal cell carcinoma. *Urology*, v. 75, n.6, p.1378-84, 2010.
33. Dong, H. *et al.* B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*, v. 5, p.1365-1369, 1999.
34. Frank, I. *et al.* 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*, v. 168, p. 2395-400, 2002.

4. Considerações finais

Este estudo teve entre seus objetivos, o de trazer contribuição ao conhecimento sobre o CCR em nosso meio, através do estudo de uma série de casos provenientes de um hospital de referência em Porto Alegre. Além disso, também se propôs ao estudo da expressão imunoistoquímica de novos marcadores, que têm sido considerados promissores como futuros marcadores prognósticos no CCR. Apesar de termos encontrado associação significativa apenas entre um dos fatores tradicionais e a expressão dos novos marcadores, este achado ocorreu, de forma interessante, com um dos achados patológicos que mais vem sendo estudado na literatura, sugerindo talvez que sua importância seja maior do que se pensava anteriormente.

Estudamos também, de forma inédita até o momento, a relação entre a expressão dos marcadores survivina e B7-H1 com os tipos histológicos mais frequentes do CCR, não encontrando associação entre estes.

O aperfeiçoamento do conhecimento sobre os tumores, como feito em relação ao CCR, através do estudo de suas particularidades permite aperfeiçoarmos nosso entendimento sobre a doença. Este persiste como necessidade premente, sugerindo que deva ser realizado de forma continuada possibilitando, no futuro, melhora no prognóstico dos pacientes.

5. Anexos

5.1 Material e Métodos

Delineamento e amostra

O estudo tem um delineamento do tipo transversal. Após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), conforme parecer 495/09, em anexo, foi selecionada a amostra do estudo. Esta teve como critérios de inclusão e exclusão os itens descritos abaixo (Tabela 8). Esta foi composta por todos os casos diagnosticados como carcinoma de células renais, provenientes de peças cirúrgicas de nefrectomia total, por via tradicional, realizados no Laboratório de Patologia e Micologia da Santa Casa de Porto Alegre, no período de 2006 a 2009. Nosso grupo foi composto pelos tipos histológicos mais frequentes, ou seja, pelos casos de carcinoma de células claras do rim e carcinoma papilar do rim.

Neste período foram inicialmente obtidos 102 casos com o diagnóstico de CCR. Após a seleção inicial, foi feita uma revisão dos laudos e blocos, sendo obtido então um total de 98 casos que possuíam blocos de parafina viáveis para realização de imunoistoquímica. Após foram selecionadas todas as lâminas dos casos para revisão, sendo então analisadas de acordo com a classificação de tumores renais da OMS.

Tabela 5 – Critérios de inclusão e de exclusão dos casos da amostra de carcinoma de células renais

| Critérios de inclusão | Critérios de exclusão |
|--|--|
| CCR diagnosticados no Laboratório de Patologia da Santa Casa. | CCR diagnosticados em outros laboratórios de Patologia, fora da Santa Casa. |
| CCR diagnosticados no período de 2006-2009 | CCR diagnosticados fora do período estudado. |
| Casos de CCR em que os pacientes concordaram em participar através do Termo de Consentimento Livre e Informado (TCLE). | Casos de CCR em que os pacientes não concordaram em participar através do Termo de Consentimento Livre e Informado (TCLE). |
| CCR provenientes de tratamento cirúrgico por nefrectomia total (via aberta tradicional) | Casos de CCR provenientes de biópsia ou outro tipo de cirurgia |
| CCR que possuam blocos de parafina em bom estado. | CCR que não possuam blocos de parafina em boas condições. |
| CCR diagnosticados como carcinoma de células claras do rim e carcinoma papilar do rim. | CCR diagnosticados como outros tipos de carcinoma renal, que não células claras e o papilar. |

Fonte: Elaborado pela autora.

Simultaneamente à revisão dos casos realizaram-se levantamentos sobre os dados patológicos relevantes, conforme as diretrizes para o Câncer da União Internacional contra o Câncer (*UICC*) e o Sistema AJCC (*American Joint Committee on Cancer*), sendo considerado além do tipo histológico, dados como: tamanho do tumor, invasão do tecido adiposo perinéfrico, comprometimento da cápsula pelo tumor, comprometimento da adrenal pelo tumor, comprometimento da veia renal, comprometimento do ureter, comprometimento do tecido adiposo do seio renal, envolvimento de linfonodos,

comprometimento da pelve pelo tumor, presença de metástases à distância, estadiamento TNM (2002), presença de necrose tumoral (de coagulação), grau nuclear, diferenciação sarcomatóide e infiltrado linfocítico, que foi quantificado como ausente, focal, moderado ou marcadamente presente (Frank e cols., 2002; Zisman e cols., 2001; Storkel e cols., 1997).

Reações imunoistoquímicas para estudo da expressão dos marcadores B7-H1 e survivina

Para a realização do estudo imunoistoquímico foi selecionado de forma aleatória, um bloco de amostra tumoral, tendo sido utilizado o tecido fixado em formalina e incluído em parafina. Os blocos foram seccionados na espessura de 3µm, desparafinados e reidratados para a realização da técnica. Foi utilizado o método ADVANCE™ HPR, da DAKO para detecção das proteínas: CD 274(B7-H1, PD-L1) e Survivin, a recuperação antigênica foi realizada em Tris-EDTA (pH 9,0) aquecido em banho-maria (95-98°C), por 30 minutos. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada, utilizando-se dois banhos de 10 minutos em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30 volumes, a 5%, em metanol. O bloqueio das proteínas inespecíficas foi realizado com leite desnatado Molico a 5%, por 1 hora. A incubação com os anticorpos primários realizou-se durante a noite, à temperatura de 4°C. A incubação com anticorpo secundário e terciário foi realizada por 40min à temperatura ambiente. Para controle negativo da técnica, foram utilizados os mesmos tecidos, incubados com os mesmos anticorpos, exceto o primário, que foi substituído por BSA 1%. A ligação antígeno-anticorpo foi visualizada com o cromógeno DAB (diaminobenzidina).

A contra coloração foi feita com hematoxilina de Harris; as lâminas foram desidratadas e montadas com resina sintética. Após a revisão de todos os casos da amostra, realizou-se o estudo imunoistoquímico utilizando a técnica descrita acima. Obteve-se duas secções de 5-10 µm de espessura, que fossem representativas da amostra tumoral presente no bloco de parafina de cada caso selecionado. Uma lâmina foi corada com anticorpo policlonal anti-survivina (Survivin Rabbit Polyclonal – Lab. Thermo Scientific ,Fremont, USA.; diluição 1:50) e a segunda lâmina foi corada com CD274 (B7-H1, PD-L1), anticorpo monoclonal CD-274/B7-H1/PD-L1 (BioLegend, San Diego, USA; Clone29E.2AE, diluição 1:75). Como controle negativo foi omitido o anticorpo primário e utilizado o BSA 1% e como controle positivo para o primeiro anticorpo foi utilizado carcinoma prostático e para o segundo marcador a tonsila palatina.

Análise da expressão

A expressão imunoistoquímica da survivina foi analisada por método semiquantitativo. Foi considerado como positiva a coloração nuclear, que foi quantificada como o número de células tumorais positivas em cinco campos de grande aumento (CGA), usando o microscópio Olympus CX 41 (Olympus, Japão). Com uma ocular de 10/20 e uma objetiva de 40 X, tem-se um campo de visão de 0,5 mm, resultando em um campo de grande aumento de 0,20 mm², sendo o resultado final indicado pela média dos cinco campos de grande aumento⁵. Através do cálculo do campo visual do grande aumento podemos expressar este resultado em número de células tumorais positivas por mm quadrado.

Para análise do B7-H1 considerou-se a coloração de membrana celular, sendo marcado como ponto de corte 10 %. Os tumores foram classificados como (B7-H1 +), quando positivos para o marcador ou como (B7-H1 -) B7-H1 negativos (Andersen e cols., 2007; Krambeck e cols., 2007; Thompson e cols., 2005).

Apresentação dos resultados e métodos estatísticos

Após a obtenção de todos os dados obtidos, os resultados foram tabulados e analisados com a utilização de softwares estatísticos, como o Sphinx e BioEstat 5.0. Todos os dados levantados foram compilados para toda a amostra, obtendo assim dados demográficos sobre o carcinoma renal em nossa população.

A expressão protéica dos novos marcadores estudados foi feita inicialmente de forma descritiva, sendo comparados os achados entre os dois tipos histológicos selecionados. Na continuidade, foi estudado o resultado encontrado no estudo IMQ em nossa amostra, sendo obtida a expressão de cada marcador de forma isolada e posteriormente a expressão dos dois marcadores de forma associada. Após a obtenção destes resultados, formaram-se três grupos. Estes foram criados a fim de agruparmos os pacientes com as mesmas características, isto é, GRUPO 1 = casos positivos para os dois marcadores, GRUPO 2 = casos positivos para um dos marcadores e negativo para outro e GRUPO 3 = casos negativos para os dois marcadores. A partir destes começamos a estudar a ocorrência ou não de associação entre cada dado estudado para a amostra e os grupos formados pelos resultados da IMQ. Para verificarmos a possibilidade de associação entre estes foi utilizado o teste do Qui-quadrado e o Teste Exato de Fisher.

5.2 Protocolo de avaliação do carcinoma renal

| | |
|--|-------------------------|
| NOME: | |
| INICIAIS: | |
| ENDEREÇO E TELEFONE DE CONTATO: | |
| CASO Nº/ANO: | REGISTRO SANTA CASA Nº: |
| RESULTADO DO AP: _____ | |
| DATA DO DIAGNÓSTICO: ____/____/____ | |
| ESTADIAMENTO PATOLÓGICO NO DIAGNÓSTICO: () SIM () NÃO _____ | |
| RESULTADOS MARCADORES IMQ: | |
| A) B7-H1 | B) SURVIVINA |
| CARACTERÍSTICAS TUMORAIS: | |
| A. Tamanho do tumor: _____ | |
| B. Invasão do tecido adiposo perinéfrico: () SIM () NÃO | |
| C. Envolvimento de linfonodos: () SIM () NÃO | |
| D. Se SIM, especificar quais: número LFN _____ / local dos LFN _____ | |
| E. Presença de necrose tumoral (de coagulação): () SIM () NÃO | |
| F. Grau nuclear de FURHMAN: () 1 () 2 () 3 () 4 | |
| G. Diferenciação sarcomatóide: () SIM () NÃO | |
| H. Infiltrado linfocítico: () SIM () NÃO | |
| () ausente () focal () moderado () marcadamente presente | |
| I. Presença de invasão: | |
| DE VASOS RENAI: () SIM () NÃO | |
| DE PELVE RENAL: () SIM () NÃO | |
| DE CÁPSULA RENAL: () SIM () NÃO | |
| DE TECIDO ADIPOSEO PERINÉFRICO: () SIM NÃO () | |
| DE SEIO RENAL: SIM () NÃO () | |

5.3 Termo de Consentimento Informado

O câncer de rim é um tipo de doença que geralmente é diagnosticado em fase avançada. Devido a este fato os casos deste câncer geralmente trazem grandes dificuldades para o seu manejo. Esta doença frequentemente causa sofrimento pessoal e familiar intenso, além dos altos custos envolvidos com o seu diagnóstico e tratamento. Levando em conta esta questão, casos deste tipo de câncer estão sendo estudados em centros de pesquisa, com a intenção de ampliarmos o conhecimento da doença para que no futuro possam ser desenvolvidos métodos diagnósticos e de tratamento mais adequados a ele. No momento está sendo realizado um estudo que visa estudar as características do câncer renal diagnosticado na Santa Casa de Porto Alegre. Você está sendo convidada a participar deste estudo, que será realizado com a utilização do material proveniente da retirada cirúrgica do tumor, que se encontra armazenado em bloco de parafina e guardado no Laboratório de Patologia da Santa Casa, sob o número _____. Através deste material serão realizados todos os estudos previstos nesta pesquisa, não sendo necessário nenhum outro exame adicional. Este trabalho não trará nenhum custo extra para você e os pesquisadores se comprometem com a confidencialidade dos dados.

A participação neste trabalho é totalmente voluntária. *Você tem o direito de não fazer parte, ou mesmo de desistir da participação nesta pesquisa sem que isso represente qualquer forma de prejuízo para você e/ou seu atendimento dentro desta Instituição.* Sendo assim solicitamos o seu consentimento para a utilização de sua amostra nesta pesquisa.

“Pelo presente Consentimento Informado, eu declaro que fui informado, livre de qualquer constrangimento, dos objetivos, da justificativa e dos procedimentos a que meu material armazenado será submetido, bem como dos benefícios futuros do presente trabalho. Tive também a oportunidade de fazer perguntas sobre o trabalho, além de receber cópia deste Termo de Consentimento. Sendo assim eu, voluntariamente, _____(CONCORDO/ NÃO CONCORDO) em participar deste estudo”.

Nome do paciente

Assinatura do paciente

Nome e assinatura do responsável

Grau de parentesco e RG do responsável

Nome do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador responsável

* Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA: 3303 8804.
_____/_____/_____.

Porto Alegre,

* Telefones dos pesquisadores: Prof. Dr. Antônio A. Hartmann 33038794 e/ou Prof. Alexandra Freitas
(053)84031132

5.4 Parecer Consubstanciado de projeto de Pesquisa

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Estudo das características patológicas e da expressão imuno-histoquímica dos marcadores prognósticos B7-H1 e Survivina no Carcinoma Renal

Pesquisador Responsável Dr. Antonio Atalibio Hartmann

Parecer 902/09

Data da Versão 16/06/2009

Cadastro 495/09

Data do Parecer 09/07/2009

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

Objetivos do Projeto

Estudo da classificação dos carcinomas renais em diferentes subtipos em amostra no sul do Brasil e avaliação de novos marcadores prognósticos em pacientes com carcinoma renal.

Sumário do Projeto

O carcinoma de células renais é um tipo de neoplasia responsável por cerca de 2 a 3 % de todas as neoplasias malignas de adultos. Este tipo de neoplasia apresenta diferentes subtipos histológicos, e isto tem correlação com o prognóstico, sendo assim necessário o diagnóstico acurado. O estudo de novos marcadores para a avaliação do prognóstico tem sido motivo de interesse na literatura. A partir disso foram identificadas a survivina e o B7-H1, que são dois novos marcadores biológicos, que tem se mostrado como promissores marcadores prognósticos sendo então estudados em diversas neoplasias. Objetivo: Estudo da classificação dos carcinomas renais em diferentes subtipos em amostra no sul do Brasil e avaliação de novos marcadores prognósticos em pacientes com carcinoma renal. Métodos: Estudo transversal, amostra todos os casos de carcinoma de células renais diagnosticados no Laboratório de Patologia da Santa Casa de Porto Alegre, estima-se 100 casos.

| Itens Metodológicos e Éticos | Situação |
|------------------------------------|---------------------|
| Título | Adequado |
| Autores | Adequados |
| Local de Origem na Instituição | Adequado |
| Projeto elaborado por patrocinador | Não |
| Aprovação no país de origem | Não necessita |
| Local de Realização | Própria instituição |
| Outras instituições envolvidas | Sim |
| Condições para realização | Adequadas |

Comentários sobre os itens de Identificação

| | |
|------------|----------|
| Introdução | Adequada |
|------------|----------|

Comentários sobre a Introdução

| | |
|-----------|-----------|
| Objetivos | Adequados |
|-----------|-----------|

Comentários sobre os Objetivos

| Pacientes e Métodos | |
|--|-------------------------|
| Delineamento | Adequado |
| Tamanho de amostra | Total 100 Local |
| Cálculo do tamanho da amostra | Não calculado |
| Participantes pertencentes a grupos especiais | Não |
| Seleção equitativa dos indivíduos participantes | Adequada |
| Crítérios de inclusão e exclusão | Adequados |
| Relação risco- benefício | Não se aplica |
| Uso de placebo | Não utiliza |
| Período de suspensão de uso de drogas (wash out) | Não utiliza |
| Monitoramento da segurança e dados | Adequado |
| Avaliação dos dados | Adequada - quantitativa |
| Privacidade e confidencialidade | Adequada |
| Termo de Consentimento | Adequado |

| | |
|---|------------|
| Adequação às Normas e Diretrizes | Sim |
|---|------------|

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

| | |
|--------------------------------|-----------------|
| Cronograma | Adequado |
| Data de início prevista | 01/2009 |
| Data de término prevista | 12/2012 |
| Orçamento | Ausente |
| Fonte de financiamento externa | Não |

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

| | |
|-----------------------------------|------------------|
| Referências Bibliográficas | Adequadas |
|-----------------------------------|------------------|

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

5.5 Carta de aceitação do artigo no JBPML (cópia)

Artigo Aprovado SGP/ JBPML

sgp@jbpm.org.br (sgp@jbpm.org.br)

[Adicionar aos contatos](#)

27/09/2013

Para: amsfreitas@hotmail.com

Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial

Rua Dois de Dezembro, 78/909 Catete
Rio de Janeiro RJ Brasil
CE P 22220-040

Rio de Janeiro, sexta-feira, 27 de setembro de 2013

Ilmo(a)

Sr.(a) Prof(a), Dr(a) Alexandra Medeiros Souza de Freitas

Referente ao código de fluxo: 1121

Classificação: Artigo Original

Temos o prazer de informar que o manuscrito Tumores renais: avaliação de fatores prognósticos de 98 casos em hospital de referência de Porto Alegre, Brasil. foi aprovado pelo Conselho Editorial do Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial e será publicado em breve. Lembramos que algumas modificações poderão ser solicitadas até a publicação do artigo.

Obrigado por submeter seu trabalho à Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.

Atenciosamente,

Adagmar Andriolo
Editor

5.6 Artigo científico aceito para publicação no JBPML

Artigo Original

Tumores renais: avaliação de fatores prognósticos de 98 casos em hospital de referência de Porto Alegre, Brasil.

Renal tumors: evaluation of prognostic factors in 98 cases from reference hospital in Porto Alegre, Brazil.

Autores

Alexandra Medeiros Souza de Freitas, Antonio A. Hartmann e Tiarajú A. De Freitas

Descritores (Palavras-chave)

Carcinoma renal, Marcadores tumorais, B7-H1, Survivina, Imunoistoquímica, Fatores prognósticos

Keywords

Renal cell carcinoma, Tumoral biomarkers, B7-H1, Survivin, Immunohistochemistry, Prognostic factors

Resumo

Introdução: O carcinoma de células renais (CCR) é doença de comportamento agressivo em todo o mundo. **Objetivo:** Estudar os fatores prognósticos tradicionais identificados no exame anátomo-patológico e sua correlação com a expressão imunoistoquímica dos novos marcadores survivina e B7-H1. **Método:** Em um hospital de referência de Porto Alegre, Brasil foi realizado um estudo transversal de CCR, com pacientes que realizaram nefrectomia total, no período 2006-2009. Foram selecionados aqueles com os tipos histológicos mais comuns: células claras e papilares. Através de revisão de dados patológicos relevantes dos casos foram obtidos fatores prognósticos tradicionais, como tamanho, necrose, tipo histológico, grau nuclear e sistema TNM. Também se realizou estudo imunoistoquímico (IMQ) da amostra, com o uso dos marcadores survivina e B7-H1. **Resultados:** Como resultados obtivemos 98 casos, com 90% deles do tipo células claras, 73% classificados como T1 e T2, a maioria com grau nuclear de Fuhrman 2 e 3 e cerca de 70% da amostra positivos

Abstract

Introduction: Renal cell carcinoma (RCC) are aggressive disease worldwide. **Objective:** Study traditional prognostic factors associated with pathological report and new markers survivin and B7-H1 by immunohistochemistry. **Methods:** In reference hospital of Porto Alegre, Brazil we done a transversal study with RCC who underwent radical nephrectomy between 2006-2009. We selected cases who had diagnostic of more common histologic subtype: clear cell and papillary. We retrospectively reviewed pathological data to determine traditional prognostic factor like size, presence of coagulative necrosis, Fuhrman grade and TNM. Beside this we had done an immunohistochemistry study with survivin and B7-H1. **Results:** As results our sample had 98 cases, 90% of cases were composed by clear cell histologic subtype, 73% of cases were tumors classified as T1 and T2 in TNM, the majority were Fuhrman nuclear grade 2 or 3 and 70% of group were positive for necrosis. In relation to new prognostic marker we found 50 positives cases to survivin and

para necrose. Já no estudo IMQ foi encontrado positividade em 38 casos para o B7-H1 e em 50 para survivina. Ao considerarmos a associação entre os fatores prognósticos tradicionais e a expressão dos marcadores encontramos associação somente entre o grupo positivo para os marcadores e necrose ($p < 0,001$). Conclusões: Tal achado vai de encontro aos dados da literatura que vem realçando a importância da necrose no prognóstico dos CCR.

38 to B7-H1, respectively. In this investigation we analysis the results of traditional prognostic markers and new markers and observed that only necrosis were associated with positive results of biomarkers ($p < 0,001$). Conclusion: This finding confirms previous studies that necrosis is an important factor to consider in the prognosis of RCC.

Introdução

Em 2013 nos Estados Unidos (EUA), são esperados mais de 60.000 novos casos de carcinoma de células renais (CCR), e aproximadamente 13.000 mortes²². O CCR representa a sétima malignidade mais comum em homens e a nona em mulheres²⁶. Considerando que existe marcada diferença no prognóstico e comportamento biológico associado aos diferentes tipos histológicos de CCR, o diagnóstico preciso torna-se essencial. Os tipos histológicos mais comuns são o tipo células claras e o papilar, representando 70-75% e 15-20% dos casos, respectivamente. O primeiro tipo se comporta de forma mais agressiva e é também o responsável pelo maior número de mortes¹⁷. Atualmente, devido aos avanços obtidos no diagnóstico por imagem 50% dos CCR diagnosticados são detectados de forma acidental⁴. Mesmo assim a incidência e a mortalidade do CCR tem se mantido em elevação nos últimos tempos. Este dado provavelmente se justifique pelo fato de que quase 30% dos CCR apresentem doença disseminada no momento do diagnóstico e que cerca de 50% deles evoluirão para óbito por doença metastática nos primeiros cinco anos após diagnóstico. A progressão da doença causa alteração importante na mortalidade, com declínio das taxas de sobrevivência, variando de 60% até menos de 10%²⁴. Este fato parece estar relacionado com doença avançada no diagnóstico ou com aqueles que irão apresentar progressão mesmo após tratamento cirúrgico. Para estes casos, tanto a quimioterapia como a radioterapia não se mostram eficientes. Mesmo assim existem relatos de que quase 20% dos CCR respondem a algum tipo de imunoterapia³. Sabe-se que os CCRs são afetados pela resposta imune do hospedeiro, a qual pode modificar a progressão do câncer¹⁴. Devido a isto, o estudo de novos marcadores prognósticos faz-se importante para a compreensão do comportamento dos CCRs, podendo aperfeiçoar a seleção dos casos mais agressivos que poderiam se beneficiar com terapêutica mais específica, tipo célula-alvo. A survivina e o B7-H1 são novos marcadores e tem sido considerados promissores marcadores prognósticos^{8,9,10}. A survivina é uma proteína bifuncional inibidora da apoptose (IAP) e está envolvida na regulação do ciclo celular e na supressão da apoptose²². Ela parece estar envolvida com a resistência a radioterapia assim como a quimioterapia em vários tumores humanos. Além disso, ela não é detectada em tecidos humanos adultos normais, porém sua expressão tem sido demonstrada em muitos tumores malignos humanos, como: rim, mama, cólon, ovário, pele, pulmão, linfomas, leucemias e melanomas, tornando-a assim uma candidata provável a alvo terapêutico em tratamentos específicos contra o câncer²⁶. O B7-H1 (PD-L1) é uma glicoproteína celular, da família B7 que

participa na regulação da imunidade humana celular e geralmente está restrita a macrófagos³⁴. A expressão deste marcador no CCR tem sido associada com pior prognóstico¹¹. A partir disto foi estudada a expressão conjunta do B7-H1 e da survivina no CCR e notou-se que esta estava associada com maior risco de progressão do câncer e com risco de morte⁷. Sendo assim, decidiu-se estudar a expressão imunoistoquímica destes marcadores em uma amostra de CCR do Brasil assim como suas associações com os marcadores prognósticos tradicionais.

Objetivos

Estudar a expressão dos novos marcadores survivina e B7-H1, por imunoistoquímica no CCR e os fatores prognósticos tradicionais, assim como suas correlações. Devido à escassez de dados sobre o CCR em nosso país, pretendemos também colaborar para aumentar o conhecimento sobre o assunto em nosso meio.

Material e métodos

Após a aprovação pelo Comitê de Ética da Ufcsa (parecer 495/09) foi selecionada a amostra. Os critérios de inclusão foram: pacientes que realizaram nefrectomia total por CCR, tipo células clara e papilar, no período 2006-2009, no Hospital Santa Casa de Porto Alegre e que possuíam blocos de parafina para estudo IQ. Após realizou-se revisão dos casos pelo patologista, utilizando-se a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS). Foram analisados os seguintes dados dos CCRs: tamanho, tipo histológico, necrose, diferenciação sarcomatóide, infiltrado linfocitário, comprometimento de linfonodos e adrenal. Para estudo da extensão tumoral foi revisada a invasão de ureter, de vasos do hilo, da pelve renal, da cápsula renal, do seio renal e do tecido adiposo perirrenal. Para o estudo IMQ foi selecionado, de forma aleatória, um bloco de parafina com amostra tumoral. Os blocos foram seccionados na espessura de 3µm, desparafinados e reidratados para a realização da técnica. Foi utilizado o método ADVANCE™ HPR, da DAKO para detecção das proteínas: CD 274 (B7-H1, PD-L1) e survivina. A recuperação antigênica foi realizada em Tris-EDTA (pH 9,0) em banho-maria (95-98°C), por 30 minutos. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada, utilizando-se dois banhos de 10 minutos em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30 volumes, a 5%, em metanol. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado com leite Molico a 5%, por 1 hora. A incubação com os anticorpos primários realizou-se durante a noite a 4°C. A incubação com anticorpos secundário e terciário foi realizada por 40 min à temperatura ambiente. Para controle negativo da técnica, foram utilizados os mesmos tecidos com os mesmos anticorpos, exceto o primário, que foi substituído por BSA 1%. A ligação antígeno-anticorpo foi visualizada com o cromógeno DAB (diaminobenzidina). A contra coloração foi feita com hematoxilina de Harris; as lâminas foram desidratadas e montadas com resina sintética. Os anticorpos utilizados foram: Survivin Rabbit Polyclonal, Lab. Thermo Scientific (Fremont, USA) na diluição 1:50, e CD274 (B7-H1) Lab. *Biologend* (San Diego, USA), Clone 29E.2AE na diluição 1:75. Foram utilizados como controles positivos carcinoma prostático e tonsila palatina, respectivamente. Para a survivina a análise dos resultados foi semiquantitativa. Foi considerada positiva a coloração nuclear (Figura 1), quantificada como o número de células tumorais positivas por cinco campos de grande aumento (CGA), com microscópio Olympus CX 41 (Olympus, Japão). Com a ocular de

10/20 e uma objetiva de 40X, tem-se campo de visão de 0,20 mm² para o grande aumento⁵. Para a avaliação do B7-H1 foi considerada positiva a coloração de membrana celular (Figura 2), com ponto de corte de 10%³⁰. De acordo com os resultados, formaram-se grupos: GRUPO 1 casos positivos para os dois marcadores, GRUPO 2 casos positivos para um marcador e negativo para o outro e GRUPO 3 casos negativos para os dois marcadores. Foram então analisadas as associações entre os grupos formados pelo resultado da IMQ e os dados anatomopatológicos estudados. Para isto foram utilizados os softwares estatísticos *Sphinx* e *BioEstat 5.0*, com a utilização do teste Chi-quadrado.

Resultados

O número total de casos da amostra foi de 98, sendo que a maioria (73%) era de tumores classificados como T1 e T2. A maioria dos casos (90%) era tipo células claras e 10% papilar. Quanto ao grau nuclear de Fuhrman, 93% apresentavam graus nucleares 2 e 3. No estudo da extensão tumoral, encontrou-se invasão da cápsula renal em cerca de 50%, de seio renal em 20%, da pelve renal em 30% e dos vasos em cerca de 8% deles. A invasão do tecido adiposo perirrenal foi positiva em 30% deles enquanto que a invasão do ureter foi observada em 1% dos casos. Sobre a adrenal, a mesma estava presente e positiva em somente 7% dos casos. A presença de necrose foi observada em 70% dos casos e a diferenciação sarcomatóide em 10%. Nas nefrectomias analisadas a linfadenectomia ocorreu em 30% dos casos. Destes somente 5% foram positivos. Com relação à presença do infiltrado linfocitário peritumoral, em cerca de 80% dos casos ele estava presente sendo na maioria das vezes classificado como focal (Tabela 1).

No resultado do estudo IMQ obteve-se 38 casos positivos (38,8%) e 60 negativos (61,2%) para B7-H1 enquanto que para survivina foram encontrados 50 positivos e 48 negativos. Quanto à survivina, os casos foram selecionados em intervalos pela intensidade de coloração, sendo classificados pelo número de células positivas para o marcador por mm². Na análise dos casos positivos para a survivina, pela intensidade de coloração, não houve relevância em nenhum intervalo. Ao analisarmos os resultados IMQ pelos grupos formados, obtivemos GRUPO 1 com 23% dos casos, GRUPO 2 com 43% e GRUPO 3 34%. Na análise do GRUPO 2, encontramos 15% dos casos positivos somente para B7-H1 e 28% somente para survivina. No tocante as associações entre os grupos formados e os fatores prognósticos não encontramos associação entre os fatores tradicionais e a expressão dos novos marcadores. A exceção foi a associação encontrada entre GRUPO 1 e presença de necrose, que foi significativa (com $p < 0,0001$). Nos demais itens estudados, as variáveis mostraram-se independentes, com p sem significância estatística (Tabela 2).

Discussão

Nossos resultados, de forma geral, ratificam os dados sobre CCR disponíveis na literatura. Os dados sobre CCR na literatura nacional são escassos. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) disponibiliza informações sobre os tipos mais comuns de câncer. Por sua menor prevalência os dados sobre o CCR não estão incluídos entre estes. O número de casos de CCR para o Brasil foi estimado em 1 a 2% do total de casos, enquanto na estimativa mundial este número pode chegar a 3% do total das malignidades^{20,21,26}. Observa-se grande variação no número de casos entre os diferentes locais, sendo previstas taxas maiores para a Europa e América do Norte e menores para a América do

Sul e Ásia⁷. Nossa amostra teve um total de 98 casos de CCR em um período de quatro anos, vindos de uma única região do Brasil. Existe grande variação entre os dados nacionais publicados em relação ao período estudado, origem e número de casos compondo as amostras. Por exemplo, existe o relato de uma série nacional com 230 casos em um período de 15 anos, com origem de uma única região ou ainda de outra série de 508 casos em um período de 01 ano, porém com dados vindos de todo o país, sendo assim nossos dados podem contribuir para aumentar o conhecimento da doença em nosso país^{6,21}.

Os dados demográficos obtidos no estudo apresentam similaridade com os da literatura nacional e internacional, considerando as informações relevantes para prognóstico como tamanho tumoral, tipo histológico e grau nuclear³¹.

Quanto à classificação pelo tamanho do tumor primário tivemos uma divisão equilibrada dos casos, porém com predomínio dos tumores menores, 50% dos casos apresentavam tumores menores que 7,0 cm, enquanto em outras séries estes valores eram de cerca de 40%^{17,23}. O tamanho tumoral faz parte do sistema TNM e continua sendo importante para o prognóstico, pois pacientes com tumores maiores tem sobrevida menor do que aqueles que possuem tumores menores, com taxas que variam de 0 até 84%¹⁵.

Quando os CCRs foram estudados pelo TNM, houve uma concentração em T1 e T2 (73%). Nardi e cols. encontram 62% para os mesmos estágios, ressaltando que entre os 508 casos da amostra, 86 deles não foram classificados²¹. Em séries internacionais os tumores classificados como T1 e T2 chegam a representar 60% a 70% dos casos¹¹. Dados da literatura mostram que a sobrevida, tanto no curto quanto no longo prazo, é marcadamente maior para tumores iniciais (pT1a e pT1b) do que para maiores e mais avançados, reafirmando a importância do tamanho tumoral para o prognóstico dos CCR⁶.

A respeito do tipo histológico, o carcinoma de células claras foi o mais frequente, seguido pelo papilar, conforme o que se observa na literatura que prevê 70 a 80% para o primeiro e 5 a 15% para o último^{26,33}.

Ao considerarmos o grau nuclear de Fuhrman tivemos 93% dos casos nos graus 2 e 3, enquanto que nos dados internacionais este achado chega a 80% e nos nacionais a cerca de 75%^{17,21}.

A presença de necrose foi relatada em cerca de 70% de nossos casos. Em outra série brasileira, este achado foi de 50%, enquanto que nos dados internacionais, este achado é de cerca de 40%. Ao lado dos fatores prognósticos tradicionais, este achado tem sido investigado por parecer que a mesma possa ser um bom indicador de agressividade. Os resultados encontrados até o momento ainda são heterogêneos, mas já existem estudos reforçando esta ideia^{17,23,26}.

Apesar dos avanços observados no diagnóstico, uma das características marcantes do CCR continua sendo a alta mortalidade, pois a sobrevida tem se mantido inalterada nos últimos anos. Sabe-se que os fatores prognósticos tradicionais não conseguem selecionar adequadamente os casos mais agressivos. Por isto tem-se observado na literatura crescente interesse pela busca de novos marcadores prognósticos, que possam

ser mais eficazes na seleção dos casos de comportamento mais adverso. Entre estes se destacam aqueles que possam auxiliar na seleção dos casos que se beneficiariam com terapêuticas específicas, como a terapia de células-alvo. Nos últimos anos, existem vários estudos com novos marcadores, considerados promissores como a survivina e o B7-H1 utilizando a IMQ para análise destes. Em 2005, um estudo sobre o perfil gênico dos CCR demonstrou que a survivina era um bom marcador de agressividade tumoral, sendo que sua expressão estava relacionada com sobrevida²². Na sequência, em estudo da Clínica Mayo com 312 CCR encontrou-se 31,1% dos casos expressando altos níveis de survivina e confirmou-se que estes pacientes tiveram menor sobrevida e maior risco de morte por câncer^{25,32}. Em 2010, foi estudada a associação entre o marcador e outros fatores patológicos e observou-se que o estadiamento e o grau tumoral, assim como o comprometimento de linfonodos estavam associados de forma significativa com os níveis de expressão do mesmo. Sendo assim, a survivina foi considerada fator prognóstico independente para o CCR¹⁶.

Em 2004 inicia-se o estudo do B7-H1, em série de 196 casos de CCR, com tecido fresco congelado. Foi utilizada para análise da expressão a coloração positiva de membrana, com ponto de corte de 10% das células e análise microscópica convencional feita por patologista. Neste encontraram 37,2 % de positividade. Observou-se que a expressão deste marcador em CCRs primários estava associada com tumores de menor sobrevida³⁰. Neste trabalho, assim como em outros do mesmo grupo, foi utilizado o anticorpo primário 5H1 (anticorpo monoclonal anti-humano B7-H1), desenvolvido naquela instituição⁸. Em 2005, novo estudo sobre o marcador então em tumores metastáticos confirma o mesmo achado. Neste trabalho ainda foram utilizadas amostras de tecido fresco congelado. Para análise foi considerada a coloração de membrana e o ponto de corte de 5-10% para os casos positivos, utilizando-se ainda análise microscópica convencional por patologista. Havia 130 casos neste grupo e foi encontrada positividade em 66,3% deles²⁹. Em continuidade, os mesmos autores realizam em 2006, novo estudo usando material emblocado em parafina com manutenção de todos os outros parâmetros prévios. A série possuía 306 casos e obteve positividade de 24%. Foi descrito também que a expressão positiva deste marcador no CCR tipo células claras, estava associada a achados patológicos adversos tais como estadiamento avançado, maior tamanho tumoral, grau nuclear alto e necrose. Além disso, também foi observada relação entre a positividade do marcador e maior risco de progressão e morte por câncer, enfatizando a hipótese de que este possa ser um marcador de pior prognóstico no CCR²⁸.

Após os resultados promissores das análises isoladas foi iniciado o estudo da expressão conjunta dos marcadores no CCR. Em 298 casos obtiveram-se dupla expressão em 20% deles e notou-se ainda sua associação com pior prognóstico, podendo assim ser considerado como preditor de agressividade tumoral. O ponto de corte para análise da survivina foi de 2% e o de B7-H1 de 5%. A análise microscópica foi digital e os valores utilizados foram definidos em estudo prévio²⁵. Na sequência, em 2009 um novo trabalho relata o desenvolvimento de um normograma baseado em marcadores, chamado *Bioescore*, que utiliza as características ligadas à expressão conjunta da survivina, B7-H1 e Ki-67. Neste foram analisados 634 casos e foi testado se a associação das expressões melhoraria a capacidade preditiva dos marcadores, observadas previamente em análises individuais. Os parâmetros considerados para a análise de expressão de B7-H1 foram: coloração de membrana e ponto de corte de 5 a 10% para as células coradas. Para a survivina foi considerada a coloração nuclear, sendo feita análise semiquantitativa obtendo-se número de células por mm², tendo como resultado survivina alta ou baixa. A análise da expressão foi determinada por médico patologista com a utilização da

microscopia convencional. Como resultados obteve-se um total de 15,3 % dos casos positivos para B7-H1 e 31,2 % para survivina alta²⁴. Em nosso estudo analisamos os dois marcadores de forma isolada e em conjunto. Obtivemos positividade isolada para o B7-H1 de 38,8 % enquanto na literatura encontramos resultados de positividade com grande variação, com taxas entre 24% até 66%^{14,28,30}. Na análise isolada da survivina tivemos cerca de 50% dos casos positivos, enquanto em outros estudos estes valores variam de 30 a 32%^{14,24}. Quanto à análise conjunta dos marcadores, obtivemos 23% de positividade enquanto na literatura este resultado foi de 13,8%¹⁴. É importante relatarmos que, mesmo seguindo a metodologia descrita, tivemos dificuldade em trabalhar com os anticorpos²⁴. Talvez uma de nossas limitações seja o fato de utilizarmos o anticorpo disponível comercialmente enquanto o outro grupo utilizou um anticorpo próprio^{28,29,30}.

Após o estudo IMQ formamos grupos, chamados 1,2 e 3 considerando o resultado da expressão para ambos marcadores. Ao investigamos a relação entre os grupos e os dados patológicos, não encontramos associação entre os grupos e o tipo histológico. Mesmo com a limitação numérica de nossa amostra, obtivemos essa informação inédita na literatura. A única associação obtida entre os dados patológicos e a expressão dos marcadores foi a encontrada entre a necrose e o grupo 1 (casos positivos para ambos os marcadores), apresentando significância estatística. Nota-se nos últimos tempos a ampliação dos dados sobre a necrose no CCR disponíveis na literatura. Em um grande estudo de casos de CCR, de série mista, encontrou-se positividade em 28% deles. Além disso, foi relatado também associação com tumores de alto grau, estágios mais avançados, maior chance de comprometimento de linfonodos assim como metástases à distância. Sendo assim, a necrose foi considerada fator independente para a sobrevida do CCR²⁷. Em novo estudo foram sugeridas modificações na análise da necrose. O autor sugeriu que a avaliação microscópica da necrose deveria ser mais detalhada ao invés de somente nos atermos em relatar sua presença ou ausência. Com este objetivo foi proposto a criação de um escore para a mesma. Neste estudo foi encontrado necrose em 66% dos casos e concluiu-se que, ainda que a mesma não tenha se comportado como fator independente, sua presença é um fator de mau prognóstico, estando associada a fatores adversos como maior estadiamento TNM, alto grau nuclear, invasão vascular e diferenciação sarcomatóide. Consequentemente o autor sugere que a presença de necrose tumoral deveria ser relatada rotineiramente no laudo patológico das nefrectomias por CCR¹². Associado a isto, há relato da associação entre o tipo histológico e a necrose com repercussão para o prognóstico, sendo mais importantes no tipo células claras do que nos outros⁷. Também há dados controversos na literatura sobre o assunto. Em série de 213 casos a necrose foi relatada em 63,8 % deles, mas não se demonstrou que a presença ou a extensão da mesma fosse relevante para o prognóstico¹⁹. Em estudo de 1526 pacientes, foi encontrada necrose tumoral em 31,2% deles. Além disso, se demonstrou que esta era importante para a mortalidade, mas não era um fator prognóstico independente para sobrevida¹⁰. Porém, no trabalho que descreveu a criação do normograma prognóstico da Clínica Mayo para CCR, a necrose foi incorporada como um fator a ser avaliado⁹. Logo, nossos dados parecem somar-se aqueles que apontam a necrose como importante para o prognóstico dos CCR e como tal nos parece que sua avaliação deveria ser realizada de forma mais cuidadosa e que seu resultado rotineiramente devia fazer parte do laudo patológico.

Conclusão

Considerando os dados discutidos acreditamos que os marcadores estudados possam ser promissores no futuro, mas continua sendo necessário novas pesquisas com metodologias mais facilmente replicáveis. Em nossa opinião, atualmente, os dados ainda nos parecem heterogêneos.

No estudo das relações entre os dados patológicos e a expressão dos marcadores B7-H1 e survivina não foram encontradas associação entre o tipo histológico e a expressão destes. Obtivemos, porém, associação significativa da positividade conjunta dos marcadores com a necrose reforçando assim a importância deste fator. Possivelmente, a necrose, deveria ser avaliada mais criteriosamente no estudo microscópico tornando-se parte rotineira dos laudos de CCR.

No atual cenário, estudos que buscam encontrar marcadores para a seleção dos casos mais agressivos de CCR continuam necessários e persistem tendo papel importante para melhora do prognóstico da doença.

Tabela 1: Aspectos anatomopatológicos gerais de 98 casos de carcinoma de células renais submetidos a nefrectomia no Hospital Santa Casa de Porto Alegre, no período de 2006 a 2009.

| Variável | Casos (%) | Variável | Casos (%) | | |
|----------------------------|------------------|-----------------|---------------------------|-----------|-----------|
| Lateralidade | Direita | 50 (51) | Invasão dos vasos hilares | Presente | 8 (8,2) |
| | Esquerda | 38 (38,8) | Ausente | 90 (91,8) | |
| | NR | 10 (10,2) | | | |
| Tamanho tumor * | pT1a | 29 (29,6) | Invasão da pelve renal | Presente | 23 (23,5) |
| | pT1b | 27 (27,0) | | Ausente | 75 (76,5) |
| | pT2a | 26 (26,5) | | | |
| | pT2b | 16 (16,3) | | | |
| Tipo histológico | Células claras | 86 (87,8) | Invasão de ureter | Presente | 1 (1,0) |
| | Papilar | 12 (12,2) | | Ausente | 97 (99,0) |
| Diferenciação sarcomatóide | | | Invasão do | Presente | 24 (24,5) |

| | | | | | |
|--------------------------|----------|-----------|-------------------------------------|-----------|-----------|
| | Presente | 10 (10,2) | adiposo | Ausente | 74 (75,5) |
| | Ausente | 88 (89,8) | perirrenal | | |
| | | | | Presente | 79 (80,6) |
| Grau nuclear de Fuhrman | 1 | 6 (6,1) | Presença de infiltrado linfocitário | Focal | 43 (43,9) |
| | 2 | 51 (52,0) | | Moderado | 28 (28,6) |
| | 3 | 40 (40,8) | | Intenso | 8 (8,2) |
| | 4 | 1 (1,0) | | Ausente | 21 (19,4) |
| Necrose de coagulação | Presente | 70 (71,4) | Linfonodos | Presentes | 27 (27,5) |
| | Ausente | 28 (28,6) | | Positivos | 5 (5,1) |
| | | | | Negativos | 22 (22,4) |
| Invasão de cápsula renal | | 48 (49,0) | Suprarrenal | NR | 71 (73,5) |
| | | | | Presente | 32 (39,8) |

| | | | | |
|-------------------------------|----------|-----------|----------|-----------|
| | | 50 (51,0) | | |
| | Presente | | Positiva | 7 (21,8) |
| | Ausente | | Negativa | 25 (78,2) |
| Invasão do seio adiposo renal | | | | |
| | Presente | 10 (10,2) | NR | 59 (60,2) |
| | Ausente | 88 (89,8) | | |
| | | | | |

Nota: NR = informação indisponível

* pT1a : menor ou igual a 4 cm // pT1b: maior que 4 cm e menor ou igual a 7 cm

pT2a: maior que 7 cm e menor ou igual a 10 cm // pT2b: maior que 10 cm

Fonte : Elaborado pelos autores

Tabela 2: Associação entre os fatores prognósticos tradicionais identificados no exame anátomo-patológico e sua correlação com os três grupos formados de acordo com a expressão imunoistoquímica dos novos marcadores survivina e B7-H1 em uma amostra de 98 casos de carcinoma de células renais, por meio do teste Chi-quadrado.

| Variável | B7-H1 e Survivina | P |
|--------------------------|---------------------|--------|
| Grau nuclear de Fuhrman | GRUPO 1 com GRUPO 2 | 0,0923 |
| | GRUPO 1 com GRUPO 3 | 0,2147 |
| Invasão de cápsula renal | GRUPO 1 com GRUPO 2 | 0,7488 |

| | | |
|----------------------------------|--------------------------------|----------------|
| | GRUPO 1 com GRUPO 3 | 0.4151 |
| Invasão de pelve renal | GRUPO 1 com GRUPO 2 | 0,0564 |
| | GRUPO 1 com GRUPO 3 | 0,0811 |
| Invasão do seio adiposo renal | GRUPO 1 com GRUPO 2 | 0,4022 |
| | GRUPO 1 com GRUPO 3- | 0,2463 |
| | GRUPO 1 com GRUPO 2 | 0,4093 |
| Necrose | GRUPO 1 COM GRUPO 3 | 0,0001* |

Notas: 1. * significativa ao nível de 1%, inclusive com o uso da correção de Yates.

2. GRUPO 1 = casos positivos para os dois marcadores

GRUPO 2 = casos positivos para um dos marcadores e negativo para outro

GRUPO 3 = casos negativos para os dois marcadores

Fonte: Elaborado pelos autores



Figura 1: RCC tipo células claras positivo para survivina por inmunistoquímica, 40x.

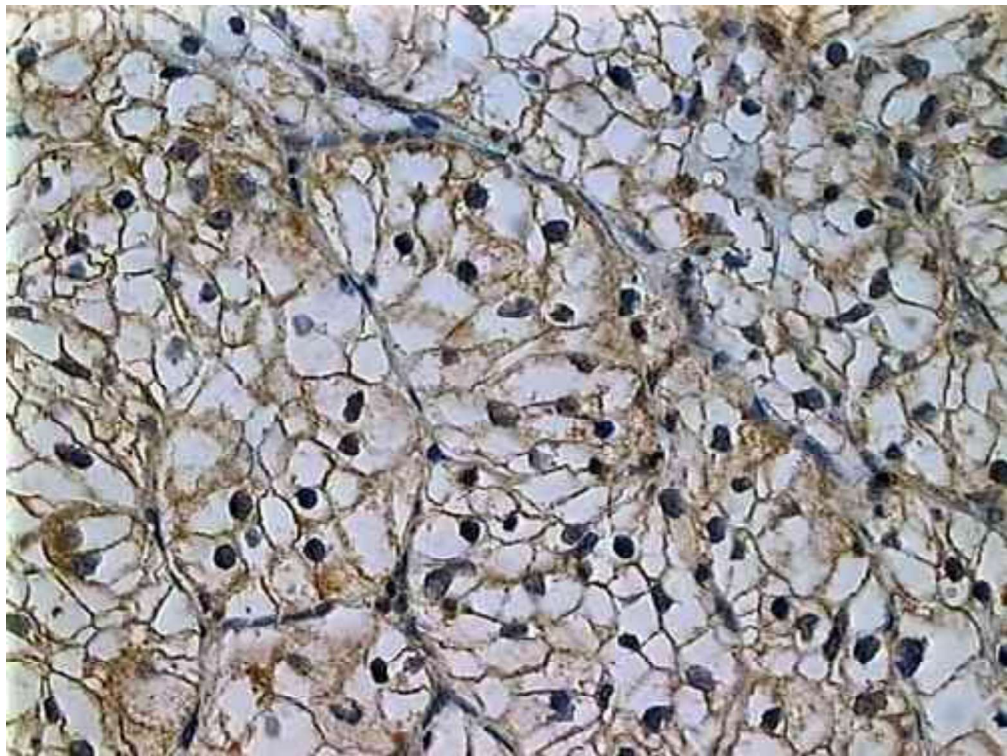


Figura 2:RCC tipo células claras positivo para B7-H1 por inmunistoquímica, 40x.