

**Luís Eduardo Rosa Zucca**

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR TIROSINA QUINASE AXL EM PACIENTES COM CARCINOMA DE  
CÉLULAS RENAIIS METASTÁTICOS TRATADOS COM SUNITINIBE E SUA ASSOCIAÇÃO COM  
DESFECHOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital do Câncer de Barretos para obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Rui Manuel Reis

Barretos, SP

2016

**Luís Eduardo Rosa Zucca**

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR TIROSINA QUINASE AXL EM PACIENTES COM CARCINOMA DE  
CÉLULAS RENAIAS METASTÁTICOS TRATADOS COM SUNITINIBE E SUA ASSOCIAÇÃO COM  
DESFECHOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital do Câncer de Barretos para obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Rui Manuel Reis

Barretos, SP

2016

### FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570  
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

Z94e Zucca, Luís Eduardo Rosa.

Expressão do receptor tirosina quinase AXL em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos tratados com sunitinibe e sua associação com desfechos clínico-patológicos / Luís Eduardo Rosa Zucca. - Barretos, SP 2016.

102 f. : il.

Orientador: Dr. Rui Manuel Reis.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2016.

1. Carcinoma de Células Renais. 2. Neoplasias Renais. 3. Biomarcadores Farmacológicos. 4. Biomarcadores Tumorais. 5. Proteínas Tirosina Quinases. 6. Imuno-Histoquímica. I. Autor. II. Reis, Rui Manuel. III. Título

CDD 616.994

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Luís Eduardo Rosa Zucca**

**Expressão do receptor tirosina quinase AXL em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos tratados com sunitinibe e sua associação com desfechos clínicos-patológicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 02/09/2016

**Banca Examinadora:**

Prof.<sup>a</sup> Dra. Isabela Werneck da Cunha

Instituição: Fundação Antônio Prudente – Hospital AC Camargo

Prof. Dr. João Paulo da Silveira Nogueira Lima

Instituição: Fundação Antônio Prudente – Hospital AC Camargo

Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Orientador

Dr. Adhemar Longatto Filho

Presidente da Banca

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas de Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital do Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição de metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

*Dedico esta dissertação à minha esposa Milena,  
que me deu forças nos momentos mais difíceis e  
soube compreender quando estive ausente.*

*Dedico também ao meu orientador Prof. Dr. Rui  
Manuel Reis, pela oportunidade de trabalhar com  
ser humano de extrema competência.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis, pela paciência e orientação.

Ao meu colega e amigo Dr Flávio Mavignier Cárcano, por ter me mostrado o caminho da ciência.

Aos meus colegas da Onco-Urologia, Dr João Antônio Neif Júnior e Dr Ricardo Zylberberg pela compreensão de minhas ausências ao departamento enquanto estive dedicado a esta tese.

Aos colegas médicos e funcionários do Departamento de Patologia do Hospital do Câncer de Barretos em especial aos patologistas Dr Cristovam Scapulatempo Neto, Cristiano Riberio Viana e principalmente minha colega e amiga Mariana Morini, por ter dedicado o precioso tempo de suas vidas para este projeto.

Ao colega e amigo Dr Carlos Eduardo Paiva e Dra Isabela Werneck pelas orientações e pelo tempo dispensado em minhas bancas de acompanhamento e qualificação.

Ao biólogo Dr. Renato José da Silva Oliveira por ter dedicado seu tempo e principalmente pela paciência em me ajudar nos experimentos desta tese.

Ao farmacêutico Guilherme G. Ribeiro por ter colaborado com os experimentos de minha tese.

A toda equipe do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital do Câncer de Barretos, principalmente a equipe de Pós-Graduação e do Núcleo de Bioestatística.

A minha família, principalmente, minha esposa, meu pai e minha mãe, que sempre me apoiaram e me compreenderam quanto a minha dedicação à medicina e à ciência.

***“A razão é o passo, o aumento da ciência o caminho,  
e o benefício da humanidade é o fim”***

***Thomas Hobbes***



# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Epidemiologia	1
1.2	Classificação histológica e molecular	3
1.2.1	Carcinoma de células claras	4
1.2.2	Carcinoma papilar	5
1.2.3	Carcinoma cromóforo	6
1.3	Fatores prognósticos	6
1.4	Tratamento	8
1.4.1	Sunitinibe	9
1.4.2	Receptor tirosina quinase AXL	11
1.4.3	Biomarcadores	14
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>17</b>
4.1	População do Estudo	17
4.1.1	Critérios de elegibilidade	17
4.2	Revisão histopatológica e realização do <i>tissue microarray</i> (TMA)	17
4.3	Avaliação de expressão imuno-histoquímica de AXL	19
4.4	Análise estatística	20
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>22</b>
5.1	Caracterização da população do estudo	22
5.1.1	Tipo histológico, sítios de metástases, status dos pacientes	22
5.1.2	Tratamento sistêmico	25
5.1.3	Curvas de sobrevida global	26
5.2	Análises da expressão de AXL	30
5.2.1	Reações de imuno-histoquímicas	30
5.2.2	Tipo tecidual e número de pacientes	31
5.2.3	Perfil de expressão de AXL	33
5.3	Análises uni e multivariadas de sobrevida	41
5.3.1	Todos subtipos histológicos	41
5.3.2	Subtipo células claras	46
5.4	Análise uni e multivariada da expressão de AXL com características clínicas e patológicas	50
5.4.1	Todos subtipos histológicos	50

5.4.2 Subtipos células claras	53
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXOS	70
Anexo A – Estadiamento do câncer de rim	70
Anexo B – Terapia alvo-molecular em câncer de rim	72
Anexo C – Ficha de coleta de dados	73
Anexo D – Carta de aprovação do CEP	78

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Incidência e mortalidade dos principais tipos de câncer em países desenvolvidos. ....	1
Figura 2 - Incidência e mortalidade de tipos de câncer no Brasil em 2012. ....	2
Figura 3 - Ilustração do papel da proteína VHL (pVHL) na ausência e presença de oxigênio .....	5
Figura 4 - Ilustração representando a afinidade do sunitinibe por diferentes quinases.....	10
Figura 5 - Ilustração da família de receptores tirosina quinase. ....	11
Figura 6 Ilustração da família tirosina quinase TAM (A) e seu ligante Gas6 (B). ....	12
Figura 7 - Fluxograma de pacientes revisados e a distribuição de pacientes com e sem material biológico disponível para análise. ....	19
Figura 8 - Sobrevida global dos pacientes com carcinoma de células renais metastáticos tratados no Hospital do Câncer de Barretos de 2008 a 2013. ....	27
Figura 9 - Sobrevida global dos pacientes com carcinoma de células renais metastáticos de acordo com o subtipo histológico tratados no Hospital do Câncer de Barretos de 2008 a 2013. ....	28
Figura 10 - Sobrevida global de acordo com os critérios de Heng dos pacientes do Hospital do Câncer de Barretos tratados com sunitinibe entre 2008 e 2013.....	30
Figura 11 - Distribuição de material de tecido de rim normal e tumoral, além de tecido metastático em relação as reações de imuno-histoquímica realizadas em TMA ou lâmina na população.....	32
Figura 12 - Distribuição dos pacientes de acordo com a realização dos testes de imuno-histoquímica em seus diferentes tecidos. ....	33

Figura 13 – A e B) Análise de imuno-histoquímica escore 0 de AXL de um paciente com carcinoma de células renais tipo células claras, tecido tumoral renal. A) 100X; B) 400X. Nota-se a marcação positiva das células endoteliais. D e C) Análise de imuno-histoquímica de escore 4, intensidade (1+) e extensão (3+), em carcinoma de células renais tipo células claras, tecido tumoral renal. C) 100X; D) 400X. E e F) Análise de imuno-histoquímica escore 6, extensão (3+) intensidade (3+), em carcinoma de células renais tipo células claras, tecido tumoral renal. E) 100X; F) 400X.....	34
Figura 14 - Frequência das amostras de tecido renal normal e tecido tumorais de lesão renal primárias e biópsias de metástases em relação a escore da expressão de AXL.....	35
Figura 15 - Positividade da expressão AXL em 41 pacientes com carcinoma de células renais tanto de tecido renal normal quanto de tecido renal tumoral. ....	38
Figura 16 - Positividade da expressão AXL em 14 pacientes com carcinoma de células renais tanto de tecido renal tumoral quanto de tecido metastático. ....	39
Figura 17 - Identificação dos pacientes que apresentaram de mudança de escore da somatória de intensidade e extensão da expressão de AXL quando comparado com tecido renal normal e tumoral de rim e posteriormente com tecido metastático.....	41
Figura 18 - Sobrevida global em relação à expressão de AXL em tecido tumoral renal em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos. ....	44
Figura 19 - Sobrevida global em relação à expressão de AXL em tecido tumoral renal em pacientes com carcinoma de células renais do subtipo células claras metastáticos. ....	49
Figura 20 - Melhor resposta ao tratamento com sunitinibe em relação a expressão de AXL em tecido tumoral renal em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos. ....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Síndrome hereditárias associadas ao câncer de rim. ....	3
Tabela 2 - Frequência e porcentagem segundo o subtipo histológico de pacientes com carcinoma de células renais metastáticos.....	22
Tabela 3 - Número de sítios de metástases em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos. ....	23
Tabela 4 - Frequência e porcentagem segundo o sítio de metástases por tecido de pacientes com carcinoma de células renais metastáticos. ....	24
Tabela 5 - Frequência e porcentagem do status de pacientes com carcinoma de células renais metastáticos tipo células claras e células não claras. ....	25
Tabela 6 - Frequência e porcentagem em relação a linha de tratamento com sunitinibe em pacientes com carcinoma de células renais.....	26
Tabela 7 - Frequência e porcentagem do ano de início de acompanhamento em ambulatório da oncologia clínica do paciente carcinoma de células renais no Hospital do Câncer de Barretos no período entre 2008 e 2013 e sua relação com coleta de cálcio sérico. ....	29
Tabela 8 - Frequência e a porcentagem das amostras de tecido renal normal e tecido tumoral de lesão renal primária e biópsias de metástases em relação a escore da expressão de AXL.....	35
Tabela 9 - Expressão qualitativa de AXL em pacientes com carcinoma de células renais do subtipo células claras e não células claras e entre os diferentes tipos de tecidos. ....	36
Tabela 10 - Expressão qualitativa de AXL em 41 pacientes com carcinoma de células renais tanto de tecido renal normal quanto de tecido renal tumoral tratados com Sunitinibe no Hospital do Câncer de Barretos de 2008 a 2013.....	37

Tabela 11 - Expressão qualitativa de AXL em 14 pacientes com carcinoma de células renais tanto de tecido renal tumoral quanto de tecido metastático. ....	38
Tabela 12 - Identificação dos pacientes que apresentaram mudança de escore da somatória de intensidade e extensão da expressão de AXL quando comparado com tecido renal normal e tumoral de rim e posteriormente com tecido metastático.....	40
Tabela 13 - Análise univariada de sobrevida global mediana em relação as características demográficas, clínicas e patológicas, nos pacientes com carcinoma de células renais metastáticos. ....	42
Tabela 14 - Associação de sobrevida global com características clínicas, demográficas e bioquímicas dos pacientes com carcinoma de células renais metastáticos. ....	45
Tabela 15 - Associação de sobrevida global com características clínicas, demográficas e bioquímicas dos pacientes com carcinoma de células renais metastáticos. ....	46
Tabela 16 - Análise univariada de sobrevida global mediana em relação as características demográficas, clínicas e patológicas, nos pacientes com carcinoma de células renais tipo células claras metastáticos.....	47
Tabela 17 - Associação de sobrevida global mediana com características clínicas, demográficas e bioquímicas dos pacientes com carcinoma de células renais do subtipo células claras metastáticos.....	49
Tabela 18 - Análise univariada da expressão de AXL em tecido tumoral renal em relação as características demográficas, clínicas e patológicas, nos pacientes com carcinoma de células renais metastáticos.....	51
Tabela 19 - Análise univariada da expressão de AXL em tecido tumoral renal em relação as características demográficas, clínicas e patológicas, nos pacientes com carcinoma de células renais metastáticos do subtipo células claras. ....	54
Tabela 20 - Análise multivariada da expressão de AXL em tecido tumoral renal em relação as características demográficas, clínicas e patológicas, nos pacientes com carcinoma de células renais metastáticos do subtipo células claras. ....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

TMA	<i>Tissue microarray</i>
CCR	Carcinoma de células renais
OMS	Organização Mundial da Saúde
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i>
VHL	<i>Von Hippel-Lindau</i>
HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
DHL	Dehidronegase láctica
MSKCC	<i>Memorial Sloan Kettering Cancer Center</i>
IMDC	<i>International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database</i>
MDR	<i>Multi Drug Resistance</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
GSK	GlaxoSmithKline
Gas6	<i>Growth Arrest Specific 6</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic acid</i>
RT-PCR	<i>Reverser transcription polymerase chain reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
HE	Hematoxilina-eosina
INC	<i>Incorporated</i>
SG	Sobrevida global
KPS	Karnofsky performance status
SOE	Sem outra especificação
TKI	<i>Tirosine kinase inhibitor</i>

EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
°C	Grau Celsius
g	Gramma
dL	Decilitro
mm <sup>3</sup>	Milímetros cúbicos
χ <sup>2</sup>	Qui-quadrado
IC	Intervalo de confiança
N°	Número
R\$	Reais
SUS	Sistema Único de Saúde



## LISTA DE SÍMBOLOS

*	Asterisco
$\alpha$	Alfa
+	Mais
%	Porcentagem
x	Vezes
$\leq$	Menor igual
$\geq$	Maior igual
>	Maior
<	Menor

## RESUMO

Zucca LER. Expressão do receptor tirosina-quinase AXL em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos tratados com sunitinibe e sua associação com desfechos clínicos-patológicos. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Hospital do Câncer de Barretos; 2016.

**JUSTIFICATIVA:** Carcinoma de células renais representa 2-3% de todos dos cânceres. Em 2012, a incidência de câncer de rim no Brasil foi de 6.200 brasileiros, e metade desses pacientes morreram da doença naquele ano. Novas terapias alvo-moleculares, como o sunitinibe, emergiram nos últimos anos para pacientes com câncer de rim metastático, com aumento de sobrevida global. No entanto, existe uma grande heterogeneidade inter-paciente e falta de biomarcadores específicos preditivos de resposta terapêutica ou fatores prognósticos. Estudos recentes, inclusive do nosso grupo tem sugerido que a expressão do receptor de tirosina-quinase AXL, pode condicionar a resposta ao sunitinibe. **OBJETIVOS:** Avaliar a expressão proteica de AXL através da técnica de imuno-histoquímica em 114 pacientes com carcinoma de células renais metastático tratados com sunitinibe no Hospital de Câncer de Barretos, e correlacionar o perfil de expressão com as características clínicas e patológicas e resposta terapêutica ao uso desta medicação. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Através de análise retrospectiva de prontuários desses pacientes, determinar o perfil epidemiológico e características clínicas e patológicas. Revisão histopatológica dos casos e realização de um *tissue microarray* (TMA) dos casos selecionados, contendo tecido normal, tumor primário e metastático renal para posterior análise de expressão proteica. Após a otimização da técnica de imuno-histoquímica para a proteína AXL, procedemos à avaliação da sua expressão. Por último, correlacionamos o perfil de expressão de AXL com as características epidemiológicas e clínico-patológicas dos pacientes, em particular o seu impacto no prognóstico e resposta terapêutica ao uso desta medicação. **RESULTADOS:** O perfil epidemiológico desta coorte de 114 pacientes foi de maioria do sexo masculino (68% - 77 homens), com proporção homem:mulher 2:1, com média de idade de 57 anos sendo que 82% (93) dos pacientes tinham carcinoma de células renais tipo células claras. A sobrevida global mediana foi de 19,1 meses (IC 95% 10,7 – 28,9 meses) e pacientes com carcinoma de células renais tipo células claras tiveram melhor sobrevida que aqueles pacientes não células claras, sendo a sobrevida global mediana do primeiro grupo de 20,9 meses (IC95% 11,8-30 meses) e segundo grupo de 10,3 meses (IC 95% 0,7 – 20 meses), com

p não clinicamente significante. Pacientes com prognóstico intermediário de Heng tiveram sobrevida de 21,1 meses (IC 95% 7,1 – 35 meses) e os pacientes com prognóstico ruim com sobrevida de 7,6 meses (IC 2,5 – 12,8 meses). Demonstrou-se em análise multivariada de sobrevida em relação aos aspectos clínicos e patológicos que a presença positiva de AXL em análise de imuno-histoquímica é fator de mau prognóstico em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos (HR 2,27 - 1,06 – 4,85 p 0,034). Juntamente com a presença positiva de AXL foram fatores de mau prognóstico: idade  $\geq$  57 anos, ausência de nefrectomia, neutrofilia e mais que um sítio de metástase. Em análise univariada no subgrupo de células claras, a presença de AXL positivo se correlacionou com pior prognóstico, sendo a sobrevida global mediana de 13 meses, e em pacientes sem expressão de AXL a sobrevida foi de 41 meses (p 0,098). A expressão positiva de AXL se correlacionou com fatores que diminuíram a sobrevida desses pacientes, como a progressão ao tratamento com sunitinibe. **CONCLUSÃO:** As características demográficas, clínicas e patológicas de nossa população com carcinoma de células renais metastático se assemelham com aquelas de populações descritas internacionalmente, inclusive quando se compara com sobrevida global após uso de sunitinibe. A expressão de proteína tirosina quinase AXL está presente em uma fração de pacientes e correlacionou-se com piora da sobrevida global, podendo ser um importante fator prognóstico independente em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos.

**Palavras-chaves:** Carcinoma de Células Renais; Neoplasias Renais; Biomarcadores Farmacológicos; Biomarcadores Tumorais; Proteínas Tirosina Quinases; Imuno-Histoquímica;

## ABSTRACT

LER Zucca. Expression of tyrosine kinase AXL receptor in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib and its association with clinical and pathological outcomes. Thesis (MS). Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2016.

**BACKGROUND:** Renal cell carcinoma represents 2-3% of all cancers of the Western countries. In 2012 it was estimated that the incidence of kidney cancer in Brazil was approximately in 6,200 Brazilians, and half of these patients died from the disease that year. New targeted molecular therapies emerged in recent years for patients with metastatic kidney cancer, with objective tumor responses in approximately 30%, with a significant increase in overall survival. However, there is great heterogeneity inter-patient and the lack of predictive or prognostic biomarkers. The search for those biomarkers aims to better characterize the patient with kidney cancer and provide a more sensitive guide to medical management. Recent studies in our group have even suggested that the expression of tyrosine kinase AXL receptor may affect the response to the molecular target drug, sunitinib, currently used in the treatment of patients with renal cell carcinoma. **OBJECTIVE:** To evaluate the protein expression of AXL by immunohistochemistry technique in 114 patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib in Barretos Cancer Hospital, and to correlate the expression profile with clinical and pathological features and therapeutic response to use of this medication. **MATERIALS AND METHODS:** To determine the epidemiological and clinical and pathological characteristics of patients with metastatic renal cell carcinoma who have made use of sunitinib; histopathologic review of cases and conducting a tissue-microarray (TMA) of the selected cases; optimizing the immunohistochemistry technique to evaluate the AXL protein and its expression; correlate the profile AXL expression with the epidemiological and clinical-pathological characteristics of the patients, in particular its impact on prognosis and therapeutic response to this drug. **RESULTS:** The epidemiological profile of this cohort of 114 patients was most of the male patients (68% - 77 men) with male:female ratio 2: 1, with a mean age of 57 years and 82% (93) of the patients had clear cell carcinoma. The median overall survival was 19.1 months (95% CI 10.7 to 28.9 months) and patients with clear cell carcinoma had better outcome than those patients with not clear cells carcinoma, with a median overall survival of the first group of 20.9 months (95% CI 11.8 to 30 months) and the second group of 10.3 months

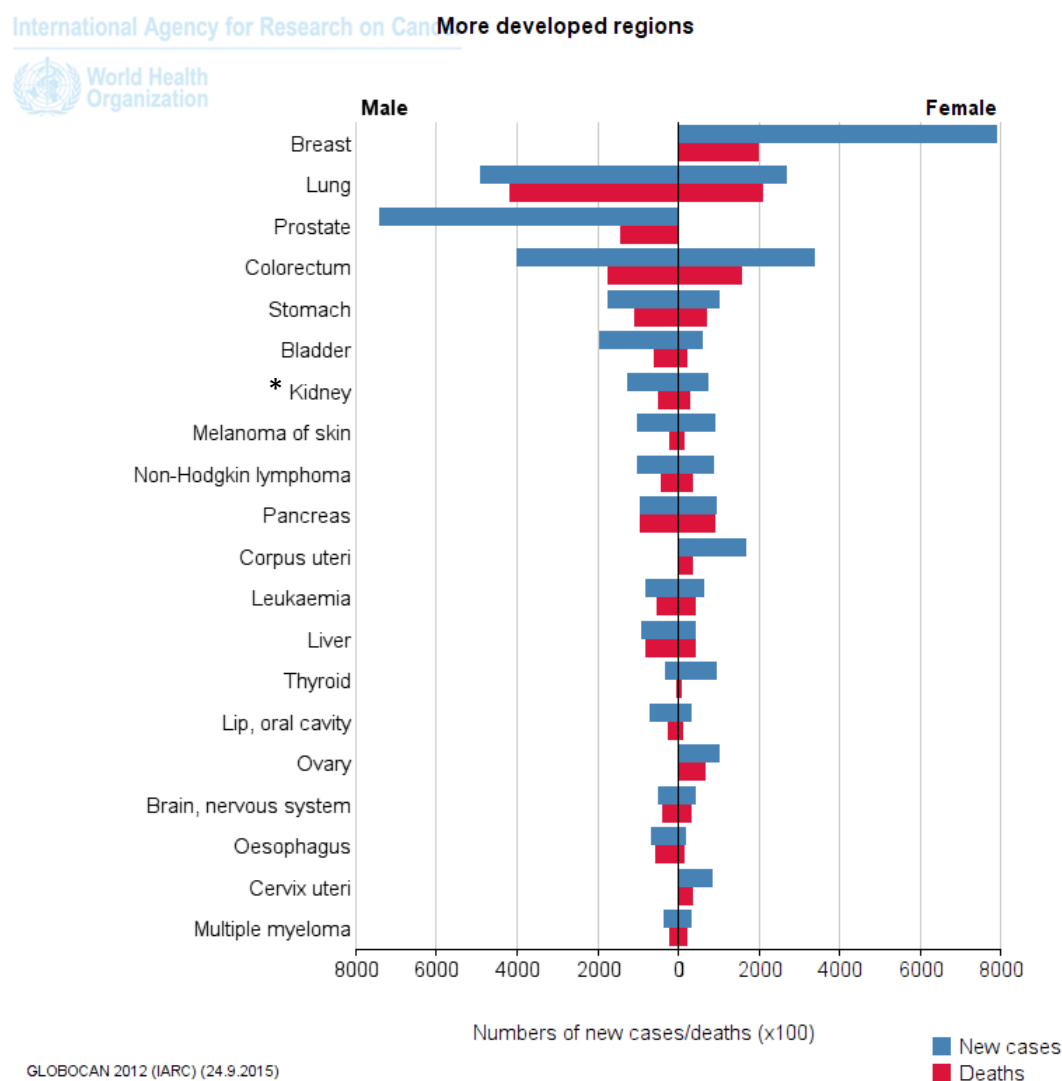
(95% CI 0.7 to 20 months), with no clinically significant p value. It can be seen that patients with intermediate prognosis had survival of 21.1 months (95% CI 7.1 to 35 months) and patients with poor prognosis a survival of 7.6 months (CI 2.5 to 12, 8 months). It has been demonstrated in multivariate survival analysis for clinical and pathological aspects that the positive AXL in immunohistochemistry analysis is a poor prognostic factor in patients with metastatic renal cell carcinoma (HR 2.27 to 1.06 - 4.85 p 0.034). Along with the positive AXL, other prognostic factors were age  $\geq$  57 years, absence of nephrectomy, neutrophilia and more than one metastatic site. When performed analysis in clear cell subgroup in univariate analysis the presence of positive AXL correlated with poor prognosis, with a median overall survival of 13 months and patients with negative AXL survival was 41 months, p 0.098. The presence of AXL was not statistically significant in multivariate analysis in this subgroup of patients. The positive expression of AXL also correlated with factors that decreased survival of these patients, as progression to treatment with sunitinib, but in multivariate analysis in all subtypes of patients could not demonstrate any correlation. The expression of AXL was not correlated with histologic subtype and although there was an increase of AXL from normal renal tissue to tumor renal tissue, and from tumor renal tissue to metastatic tissue, this relationship was not clinically significant. **CONCLUSION:** The demographic, clinical and pathological characteristics of a population with metastatic renal cell carcinoma in a Brazilian public institution resembles those of international populations, even when compared with overall survival after use of sunitinib. Furthermore, AXL tyrosine protein kinase expression in kidney tumor tissue was correlated with worse overall survival and may be an important prognostic factor in patients with metastatic renal cell carcinoma.

**Keywords:** Renal Cell Carcinoma; Kidney Neoplasms; Pharmacological Biomarkers; Biomarkers Tumor; Protein Tyrosine Kinases; Immunohistochemistry;

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Epidemiologia

A maioria dos tumores primários de rim são originários do parênquima renal<sup>1</sup>. Destes tumores, o carcinoma de células renais, originário do epitélio dos túbulos renais<sup>2, 3</sup> é o subtipo tumoral de maior prevalência, representando quase 90% das neoplasias renais<sup>4</sup>. O carcinoma de células renais (CCR) representa 2-3% de todos dos cânceres em países desenvolvidos (Figura 1)<sup>5</sup>.



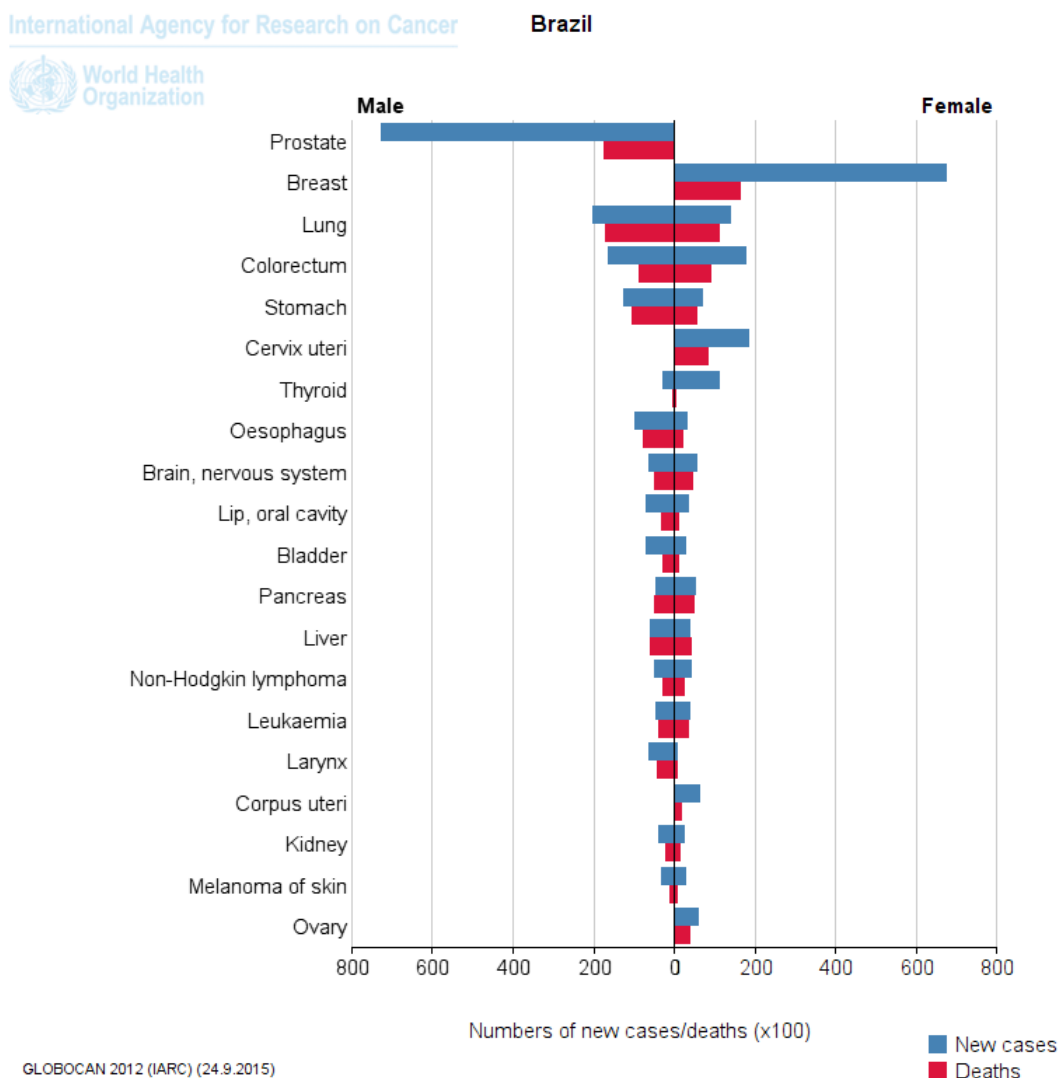
Fonte: Globocan 2012<sup>6</sup>

\*Rim

Figura 1 - Incidência e mortalidade dos principais tipos de câncer em países desenvolvidos.

Estimativas de 2012 nos Estados Unidos, previam que aproximadamente 65.000 americanos foram diagnosticados com câncer renal, sendo que 13.500 morreram da

doença<sup>6</sup>. No Brasil, dados de 2012 estimaram a incidência de câncer de rim de aproximadamente 6.200 brasileiros, e um pouco mais de 3.000 pacientes morreram da doença naquele ano (Figura 2)<sup>6</sup>.



Fonte: Globocan 2012

\*Rim

Figura 2 - Incidência e mortalidade de tipos de câncer no Brasil em 2012.

Os principais fatores etiológicos para desenvolvimento de CCR são o tabagismo, obesidade e hipertensão<sup>7</sup>. Além de fatores ambientais, fatores genéticos influenciam o risco de desenvolvimento desta doença, sendo que indivíduos com parentes de primeiro grau diagnosticados com CCR podem apresentar até 4 vezes risco de desenvolver câncer renal<sup>8</sup>. Carcinoma de células renais também se correlacionam com síndromes hereditárias, sendo que as principais dessas síndromes estão descritas na Tabela 1<sup>9</sup>.

Tabela 1 - Síndrome hereditárias associadas ao câncer de rim.

Síndrome	Gene causador	Localização	Manifestação renal	Outras manifestações
Von Hippel-Lindau (VHL)	<i>VHL</i>	3p25	CCR tipo células claras: sólido e/ou cístico, múltiplos e bilaterais	Hemangioblastoma de retina e em SNC; feocromocitoma, cistos pancreáticos e tumores neuroendócrinos
Carcinoma renal papilar hereditário	<i>MET</i>	7p31	CCR papilar tipo 1: sólido, múltiplos e bilateral	Nenhuma
Carcinoma de célula renal leiomioma hereditário	<i>FH</i>	1p42-43	CCR papilar tipo 2, carcinoma de ducto coletor: solitário e agressivo	Leiomioma uterino e leiomiossarcoma, nódulos cutâneos (leiomiomas)
Birt-Hogg-Dubé	<i>BHD</i>	17p11.2	CCR oncocítico híbrido, CCR cromóforo, CCR células claras, oncocitoma: múltiplos e bilaterais	Pápulas cutâneas (fibrofoliculomas); cistos pulmonares, pneumotórax espontâneo, pólipos colônicos
Tumor hiperparatireoidismo mandibular	<i>HRPT2</i>	1q25-32	Tumores do estroma e epitelióide, CCR papilar: cistos	Tumor de paratireoide, tumores maxilares e mandibulares
Translocação constitucional do cromossomo 3	possível <i>VHL</i>		CCR células claras: múltiplo e bilateral	Nenhuma
Câncer familiar papilar de tireoide	gene desconhecido	1q21	CCR papilar, oncocitoma	Câncer papilar de tireoide, doença tiroidiana nodular

## 1.2 Classificação histológica e molecular

Segundo a nova classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>10</sup>, a qual está de acordo com a classificação publicada pela ISUP (International Society of Urological Pathology)<sup>3</sup>, o CCR pode ser subclassificado histologicamente em três principais tipos: carcinoma de células claras, carcinoma papilar e carcinoma cromóforo<sup>2, 10</sup>

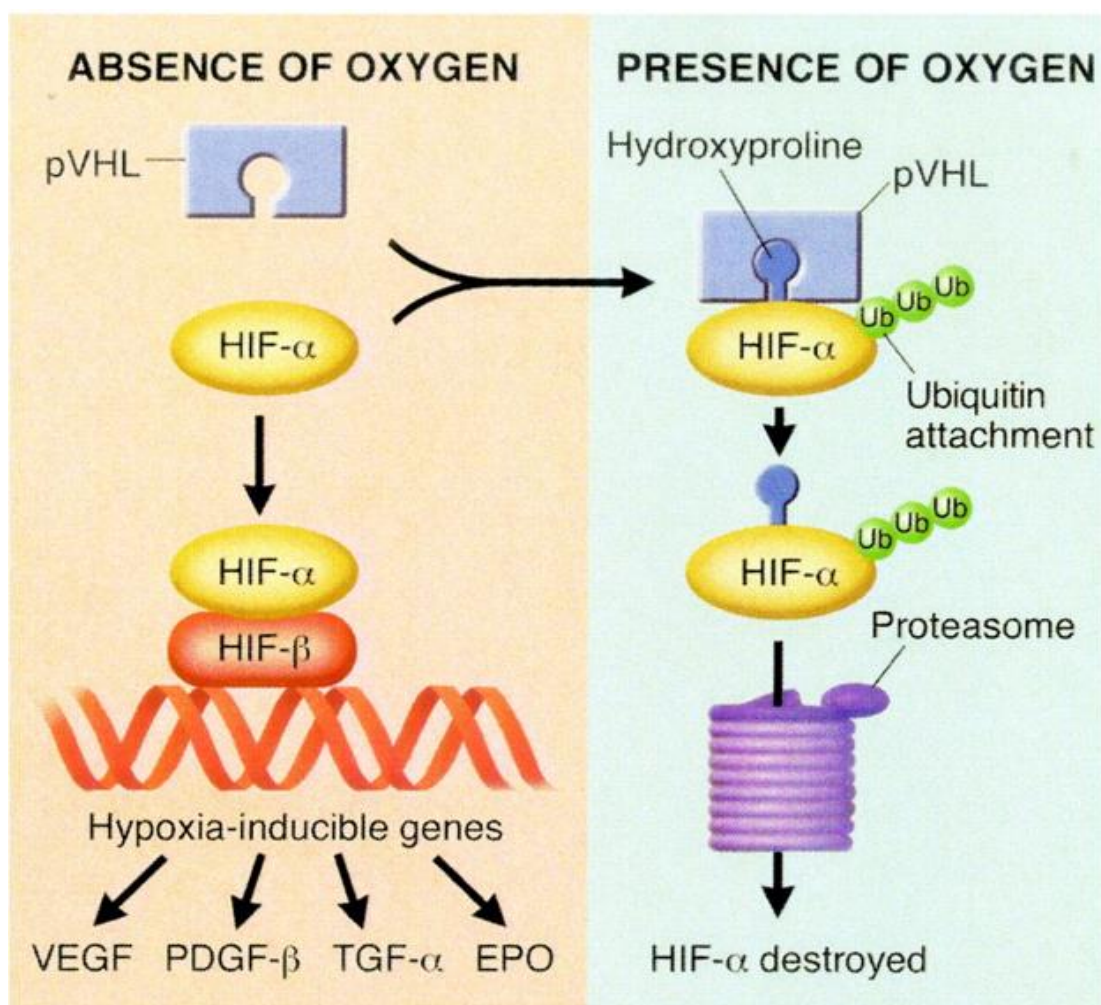
. Estes três subtipos apresentam características epidemiológicas e alterações genéticas distintas<sup>2, 3</sup>. Independente da classificação, em países desenvolvidos a idade média de diagnóstico é de 64 anos, apresentando relação homem:mulher de 2:1<sup>11</sup>.



### 1.2.1 Carcinoma de células claras

O carcinoma de células claras é a histologia mais prevalente, correspondendo de 75 a 85% dos carcinomas renais<sup>2, 3</sup>. Apresentam-se como massas solitárias e distribuídas aleatoriamente, e de igual frequência em ambos os rins. Multicentricidade e bilateralidade são típicos de síndromes hereditárias, principalmente no contexto da doença de von Hippel-Lindau<sup>12</sup>. A principal via de metástase do carcinoma de células renais tipo células claras é hematogênica, via veia cava para os pulmões, porém metástases linfonodais também ocorrem<sup>2</sup>. O CCR é conhecido por ter propensão a metastatizar para sítios pouco usuais, mesmo após mais de 10 anos do diagnóstico do tumor primário<sup>2</sup>.

Histologicamente, estas neoplasias exibem um citoplasma comumente preenchido por lipídios e glicogênio, os quais se dissolvem no processo de rotina histológica, criando um aspecto de citoplasma “claro”, cercado por membrana celular, dando origem ao nome carcinoma de células claras<sup>2</sup>. Geneticamente, em 94% destes tumores ocorre a deleção do braço curto do cromossomo 3<sup>13-15</sup>, mais especificamente na região 3p25-26, onde está localizado o gene *von Hippel-Lindau (VHL)*. Desta forma, o gene VHL tem papel primordial no desenvolvimento de carcinoma de células renais tipo células claras, tanto no contexto hereditário como esporádico<sup>16</sup>. O gene *VHL* é expresso em uma variedade de tecidos humanos, particularmente em células epiteliais de pele e nos tratos gastrointestinal, respiratório e gênito-urinário<sup>17</sup>. O mecanismo pelo qual o produto deste gene supressor de tumor, a proteína VHL (pVHL) causa transformação neoplásica nestas células não está completamente elucidado. Várias vias de sinalização parecem estar envolvidas, e uma delas é o papel da pVHL na angiogênese<sup>18</sup>. Sabe-se que um dos domínios do pVHL interage com o fator indutor de hipóxia (HIF-1), o qual faz a mediação da resposta celular à hipóxia<sup>19</sup>. Em um ambiente hipoxêmico ou na perda de *VHL*, ocorre acúmulo de HIF, ativando a transcrição de genes indutores de hipóxia, dentre eles o fator de crescimento endotelial (VEGF) (Figura 3)<sup>20</sup>.



Fonte: George et al<sup>19</sup>

Figura 3 - Ilustração do papel da proteína VHL (pVHL) na ausência e presença de oxigênio

A superexpressão de VEGF explica o extraordinário componente capilar das neoplasias associadas a doença de von Hippel-Lindau<sup>20</sup>.

### 1.2.2 Carcinoma papilar

O segundo subtipo histológico mais frequente, o carcinoma papilar corresponde a aproximadamente 10% das neoplasias<sup>3, 10, 21</sup>. A apresentação desse tipo de tumor é geralmente multifocal e bilateral<sup>2, 22</sup>. O carcinoma papilar apresenta dois subtipos, tipo 1 e 2, sendo eles baseados tanto em critérios histológicos, genéticos e prognósticos<sup>3,23</sup>. No tipo 1 os tumores tendem a ser de baixo grau e de melhor prognóstico<sup>23</sup>. A maioria dos tumores do tipo 1 tem ganho dos cromossomos 7p e 17p, e pacientes com tipo 2 apresentam alterações citogenéticas em diversos cromossomo, como 1p, 3p, 5, 6, 8, 9p, 10, 11, 15,18 e 22<sup>22,24</sup>. Discute-se que o subtipo tipo 2 não sejam uma entidade distinta bem definida, mas um subgrupo de pacientes com características moleculares distintas<sup>10</sup>.

### 1.2.3 Carcinoma cromóforo

O terceiro subtipo histológico mais frequente, o carcinoma cromóforo acomete 5% dos tumores epiteliais removidos cirurgicamente. A idade média de incidência é na sexta década de vida, não variando sua frequência em relação ao sexo. Alguns casos de doença metastática foram descritos, porém a apresentação da maioria dos casos é inicial, sendo sua mortalidade menor que 10%<sup>2, 3</sup>. Este tipo histológico é caracterizado por perda cromossômica extensa, e a nível molecular, mutações no gene supressor de tumor *TP53* foram evidenciadas em 25% das amostras<sup>25, 26</sup>.

### 1.3 Fatores prognósticos

Independente da histologia, a classificação TNM (AJCC 2010) é recomendada para o estadiamento da doença, sendo este um dos fatores que auxiliam no prognóstico desses pacientes (Anexo A). Tais fatores anatômicos como tamanho do tumor, invasão venosa, invasão de cápsula renal, envolvimento da adrenal, metástase em linfonodos e à distância, estão agrupadas neste sistema<sup>27</sup>.

Os subtipos histológicos de carcinoma de células renais descritos acima também são importantes em relação ao prognóstico, sendo que os tumores que apresentam melhor prognóstico, quando localizados, em ordem crescente são os cromóforos, papilares e por último os de células claras<sup>28</sup>. Pacientes com tumores com diferenciação sarcomatoide, independente do subtipo histológico apresentam prognóstico desfavorável, sendo que muitos desses pacientes morrem antes de 12 meses após o diagnóstico<sup>2,23</sup>.

Além das características patológicas, características clínicas como, *performance status* e tempo entre o diagnóstico da doença renal e o início do tratamento sistêmico para doença metastática, mais que dois sítios de metástases, metástases ósseas, hepáticas e em sistema nervoso central são importantes na avaliação prognóstica em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos<sup>27, 29, 30</sup>. Fatores bioquímicos ao diagnóstico de metástase também influenciam em um pior prognóstico destes pacientes como anemia, neutrofilia, plaquetose, DHL aumentado e hipercalcemia<sup>31</sup>. Para melhor classificação desses pacientes, algumas ferramentas, chamados de escores prognósticos, estimam a sobrevida e recorrência do carcinoma renal baseados em parâmetros clínicos, bioquímicos e anatomopatológicos. Um dos escores mais usados para avaliação de prognóstico em doença metastática é o sistema prognóstico de Memorial Sloan Kettering Cancer Center

(MSKCC)<sup>30</sup>. Fatores prognósticos em análise multivariada incluem 5 variáveis: intervalo entre o diagnóstico da doença e o início tratamento sistêmico em doença metastática menor que um ano, *performance status Karnofsky* menor igual a 70%, DHL sérico maior que 1,5 vez o limite superior da normalidade, cálcio sérico corrigido maior que o limite superior da normalidade e hemoglobina sérica menor que o limite inferior da normalidade. Pacientes sem nenhuma dessas variáveis são considerados de baixo risco ou bom prognóstico, pacientes com um ou dois desses fatores são considerados de risco intermediário e pacientes com três ou mais desses fatores são considerados de alto risco ou prognóstico ruim. Este sistema de prognóstico foi idealizado em uma época em que a terapia de escolha do paciente com carcinoma de células renais era a imunoterapia. Hoje um modelo prognóstico aplicado em populações com carcinoma de células renais tratados com terapia alvo molecular foi desenvolvido e validado em uma base de dados independente<sup>27</sup>. Chamado de modelo IMDC, ou modelo prognóstico de Heng, este escore prognóstico é derivado de um estudo retrospectivo de 645 pacientes com carcinoma de células renais tratados com sunitinibe, sorafenibe ou bevacizumab mais interferon<sup>27</sup>. Esta análise identifica seis variáveis, estratificando os pacientes em prognóstico favorável, intermediário ou ruim. Quatro variáveis são identificadas no sistema prognóstico do MSKCC como preditores independentes de curta sobrevida, sendo eles, o intervalo entre o diagnóstico de câncer e o tratamento sistêmico para doença metastática menor que um ano, *performance status Karnofsky* menor igual a 70%, cálcio sérico corrigido maior que o limite da normalidade e hemoglobina sérica menor que o limite superior da normalidade. Os outros dois fatores prognóstico independentes validados são a contagem de neutrófilos absolutos maior que o limite superior da normalidade e plaquetas maior que o limite superior da normalidade. Pacientes com nenhum fator adverso foram classificados como sendo de prognóstico favorável, com sobrevida mediana de 43 meses e 75% dos pacientes estavam vivos em 2 anos. Pacientes com um ou dois fatores adversos foram classificados como prognóstico intermediário, com sobrevida mediana de 27 meses, sendo que 53% desses pacientes estavam vivos em 2 anos. Já os pacientes com três a seis fatores adversos apresentavam prognóstico ruim, apresentaram sobrevida mediana de 8,8 meses, sendo que apenas 7% desses pacientes estavam vivos em 2 anos<sup>32</sup>. Neste mesmo modelo prognóstico, em análise univariada, variantes histológicas, incluindo carcinoma de células renais não células claras apresentavam sobrevida mediana de 16,8 meses contra 22 meses daqueles pacientes que tinha histologia de células claras (com significância estatística), e

pacientes que apresentavam em sua peça tumoral algum grau de histologia sarcomatoide tiveram sobrevida mediana de 8,6 meses contra 22,7 meses naqueles pacientes que não apresentavam nenhum grau de característica sarcomatoide, também significante<sup>27</sup>.

#### 1.4 Tratamento

O tipo de tratamento difere de acordo com o estadiamento do paciente. A ressecção cirúrgica é a terapia mais efetiva em pacientes com carcinoma de células renais localizado, sendo opções cirúrgicas tanto a nefrectomia parcial ou radical, ambas apresentando suas próprias indicações, assim como seus riscos e benefícios<sup>33</sup>. A cirurgia do câncer de rim é curativa apenas se for retirado todo o tumor<sup>33</sup>.

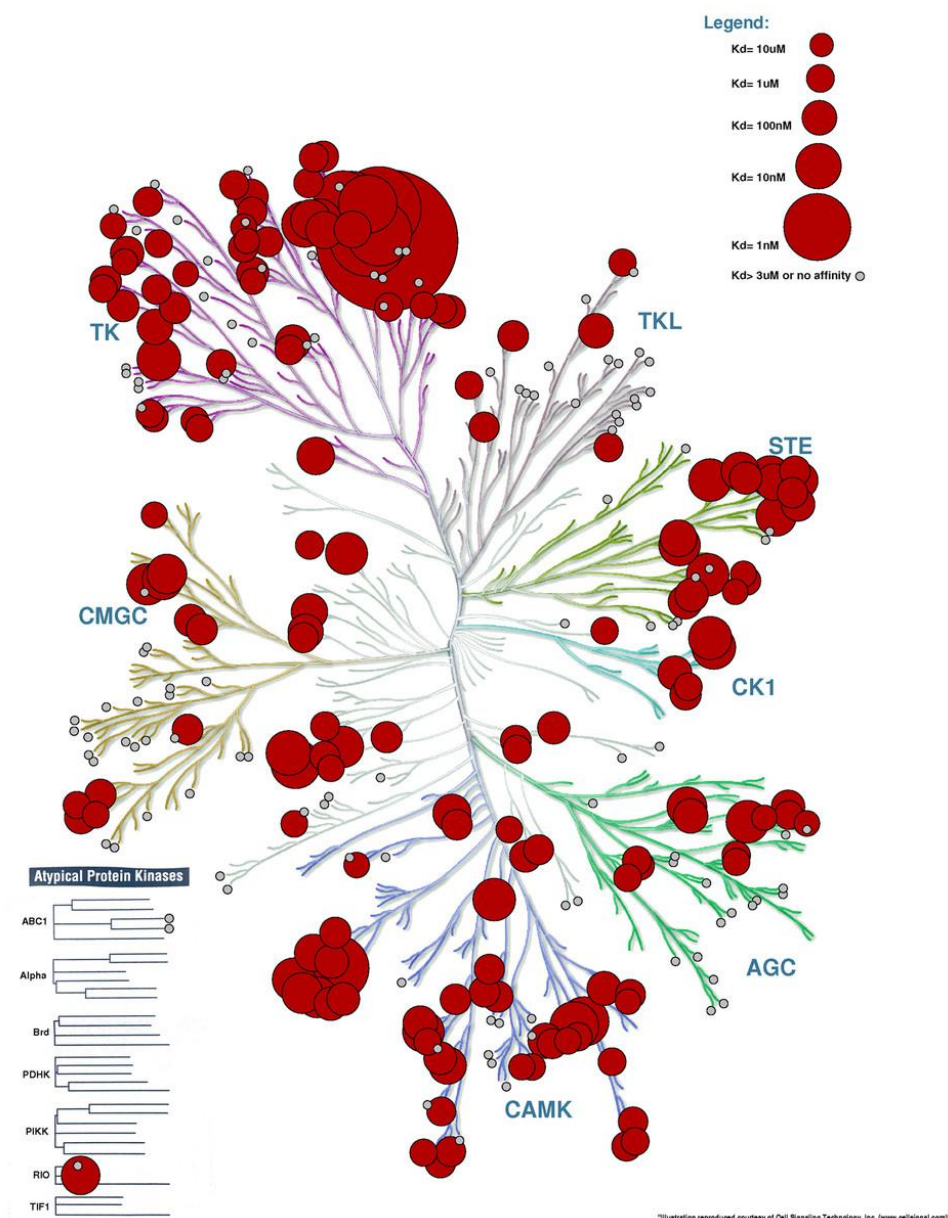
Pacientes com carcinoma de células renais metastáticos são compostos por um grupo heterogêneo, não se aplicando a mesma terapia inicial para todos<sup>32</sup>. Por exemplo, em casos selecionados tem-se indicação de ressecção cirúrgica do tumor primário mesmo em pacientes metastáticos, como forma de aumentar a sobrevida global, chamado cirurgia de citorredução<sup>34</sup>. Porém, de forma geral, para aqueles pacientes com doença disseminada, terapia sistêmica é o tratamento padrão<sup>33, 34</sup>. Quimioterapia nunca demonstrou benefício, provavelmente por este tipo de tumor se desenvolver nos túbulos proximais renais, os quais apresentam altos níveis de proteínas resistentes a múltiplas drogas (MDR proteins)<sup>33</sup>. Porém, como citado anteriormente, em carcinoma de células renais, especialmente naqueles de subtipo células claras, ocorre acúmulo do fator indutor de hipóxia devido a inativação do gene de von Hippel-Lindau, resultando na superexpressão do fator de crescimento endotelial (VEGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), ambos promotores da angiogênese. A angiogênese é considerada um dos pilares para o desenvolvimento e progressão do câncer<sup>35</sup>.

Nos últimos anos, avanços em biologia molecular levaram ao desenvolvimento de fármacos que têm como alvo moléculas que bloqueiam a sinalização dos receptores VEGF e PDGF, inibindo assim a angiogênese e, conseqüentemente, a progressão tumoral<sup>31</sup>. Essas medicações foram de extrema importância para o aumento da sobrevida livre de progressão em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos<sup>36</sup>. Três classes de fármacos alvo-moleculares se destacam (Anexo B), sendo elas: anticorpo monoclonais que inibem a circulação de VEGF-A, como o bevacizumabe (Avastin®, Roche); inibidores da proteína mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*), proteína responsável pela regulação de micronutrientes, crescimento celular, apoptose e angiogênese, sendo o tensesolimo

(Torisel<sup>®</sup>, Pfizer) e o everolimo (Afinitor<sup>®</sup>, Novartis) os dois fármacos mais importantes; e por fim, e mais importante, os inibidores de receptores tirosina quinase, incluindo os receptores de crescimento endotelial vascular (VEGFR) e os receptores de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), sendo as drogas mais usadas em primeira linha de tratamento para câncer de rim: o sunitinibe (Sutent<sup>®</sup>, Pfizer), sorafenibe (Nexavar<sup>®</sup>, Bayer) e pazopanibe (Votrient<sup>®</sup>, GSK)<sup>31</sup>.

#### **1.4.1 Sunitinibe**

Um dos agentes mais utilizados na prática clínica, o sunitinibe é um fármaco de administração via oral com ação inibidora em múltiplos receptores tirosina quinase, tais como VEGFR-1, VEGFR-2, KIT, e família PDGFR (Figura 4)<sup>37</sup>, que apresenta atividade antitumoral e antiangiogênica<sup>37</sup>. A primeira descrição do sunitinibe em carcinoma de células renais metastático foi feita por Faivre e colegas em 2006 em estudo fase I. Neste estudo, 3 pacientes com carcinoma de células renais metastáticos apresentaram resposta objetiva sustentada com duração de até 54 semanas<sup>38</sup>. A partir deste resultado, estudos fase II conduzidos por Motzer e colegas, confirmaram sua eficácia<sup>39</sup>. Em 2007 foi o resultado de um estudo fase III conduzido também por Motzer e colegas que introduziu o sunitinibe como primeira linha de tratamento para pacientes com carcinoma de células renais metastático<sup>40</sup>. Neste estudo, pacientes eram randomizados em dois braços, sunitinibe e interferon- $\alpha$ , este último considerado na época como o tratamento padrão. Os resultados foram animadores em relação a taxa de resposta objetiva, 31% no braço sunitinibe versus 6% no braço do interferon- $\alpha$ , e em relação ao tempo para progressão da doença, sendo 11 meses para o braço do sunitinibe e 5 meses para o braço do interferon- $\alpha$ , além do perfil de tolerabilidade ser bastante aceitável<sup>40</sup>. Na atualização deste estudo, em 2009, a sobrevida global mediana também apresentou um aumento considerável, de 26,4 meses no braço sunitinibe versus 21,8 meses no braço interferon- $\alpha$ <sup>22</sup>. Foi a partir deste estudo que o sunitinibe foi introduzido no mercado como primeira linha de tratamento em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos, sendo também incorporado em nossa instituição desde 2008.

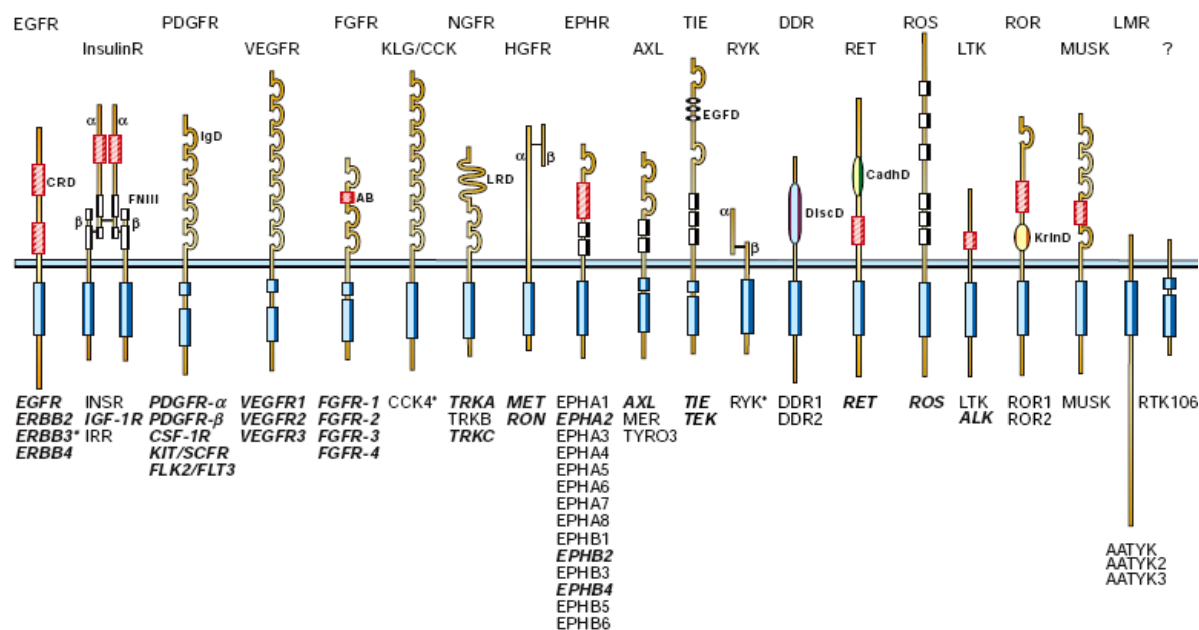


Fonte: Chartier et al<sup>41</sup>

Figura 4 - Ilustração representando a afinidade do sunitinibe por diferentes quinases.

O sunitinibe é tal como descrito anteriormente, um potente inibidor dos receptores tirosina quinase<sup>37</sup>. Os receptores de tirosina quinase são proteínas que interagem com fatores de crescimento, e fazem parte de uma grande família de proteínas transmembranares com uma diversidade de estruturas de ligantes extracelulares, mas que possuem em comum um domínio de atividade tirosina quinase intracelular (Figura 5). A partir dessa interação receptor/fator de crescimento, sinais de transdução são enviados

para o interior da própria célula, que culminarão com distintas atividades, podendo variar desde sua sobrevivência até a sua morte programada <sup>42, 43</sup>.



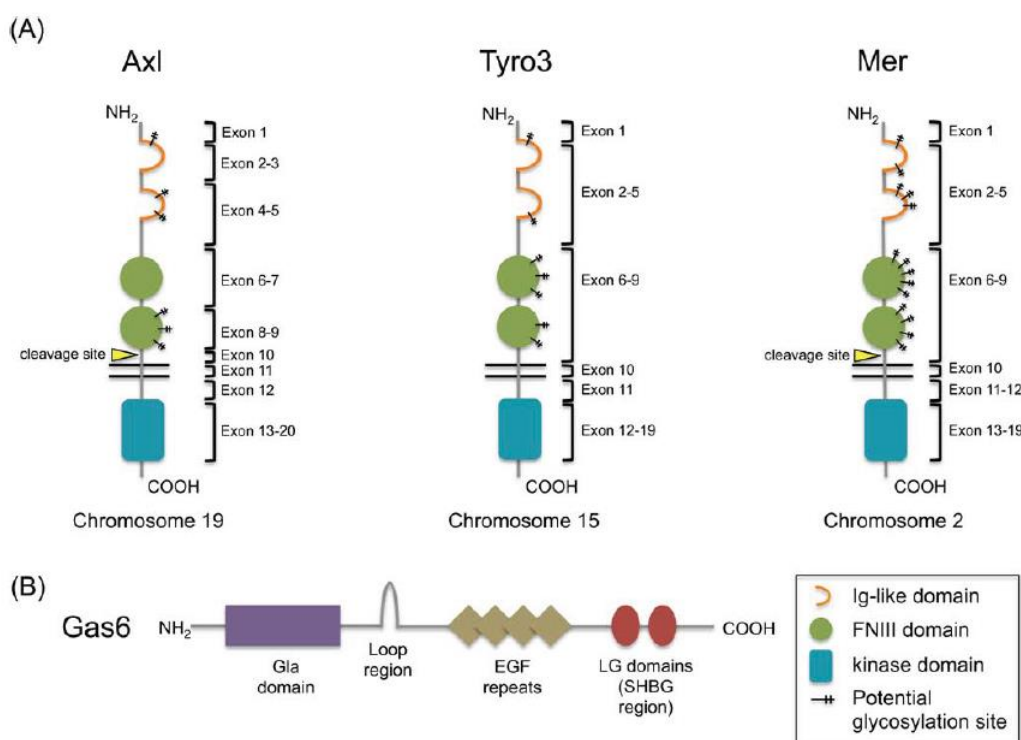
Fonte: Blume-Jensen P. et al<sup>44</sup>

Figura 5 - Ilustração da família de receptores tirosina quinase.

#### 1.4.2 Receptor tirosina quinase AXL

Existem 20 famílias distintas de receptores tirosina quinase categorizadas de acordo com a similaridade de suas regiões extracelulares (Figura 5)<sup>43</sup>. Algumas dessas famílias incluindo os receptores PDGFR e VEGFR tem demonstrado importante papel no crescimento tumoral e angiogênese, e uma importante subfamília vem ganhando destaque devido a sua superexpressão em diversos tipos de tumores sólidos, a família TAM<sup>45</sup>. A família TAM<sup>46</sup>, constituída das proteínas tirosina quinase, AXL, Tyro 3 e Mer, tem como característica comum serem constituídas pelos domínios extracelular de duas imunoglobulinas-like e duas fibronectinas tipo III, além de compartilharem o mesmo ligante Gas6<sup>47</sup>, este um membro da família dependente de vitamina K, porém sem ações anticoagulantes, servindo como fator de mitose e sobrevivência que protege as células de indução de apoptose (Figura 6) <sup>48, 49</sup>.





Fonte: Axelrod et al<sup>49</sup>

Figura 6 Ilustração da família tirosina quinase TAM (A) e seu ligante Gas6 (B).

Um dos membros desta família, o receptor AXL é um proto-oncogene que se expressa em vários tecidos celulares<sup>50</sup> incluindo células de linhagem epitelial, mesenquimal e de origem hematopoiética<sup>46</sup>, tendo papel importante em múltiplas ações celulares necessárias para neovascularização, como proliferação endotelial, migração e sobrevivência celular<sup>51</sup>. O AXL foi originalmente clonado de pacientes com leucemia mielóide crônica, e quando superexpresso, está associado com potencial de malignização<sup>52</sup>. O domínio extracelular do receptor AXL liberado por proteólise é chamado de Axl solúvel e está presente no plasma humano, assim como o ligante Gas6, que apresenta-se na circulação ligado com Axl solúvel<sup>53, 54</sup>. O fator de crescimento Gas6 via AXL apresentou efeitos inibitórios no receptor VEGF, e consequente inativação de via angiogênica em células endoteliais<sup>55</sup>. Mais recentemente foi demonstrado que a proteína tirosina quinase AXL é regulada de forma aumentada por HIF<sup>56</sup>. Vale ressaltar a importância da via VEGF em carcinoma de células renais tipo células claras, onde, como dito anteriormente, na maioria dos casos há deleção no gene *VHL* com aumento da expressão de HIF, fator responsável por aumento da neovascularização tumoral via VEGF. Em várias linhagens celulares de gliomas, tem-se demonstrado que receptor AXL está continuamente fosforilado, tendo papel importante na gliomagenesis e quimiorresistência de tumores cerebrais<sup>57, 58</sup>. Estudo de imuno-

histoquímica também neste tipo tumoral, evidenciou que a co-expressão das proteínas AXL e Gas6 se correlacionava com recorrência e progressão tumoral.<sup>59,60</sup> Interessante notar que a perda da sinalização de AXL também diminui o crescimento tumoral, migração e invasão<sup>60,61</sup>.

Em tumores sólidos a regulação aumentada de AXL foi evidenciado em câncer de mama<sup>62</sup>, estômago<sup>63</sup>, próstata<sup>64</sup>, entre outros, estando relacionado a um pior prognóstico nestes pacientes<sup>45</sup>.

A primeira descrição de expressão de AXL em carcinoma de células renais foi feita em 2003 por Chung e colegas, onde constatou-se o aumento dos níveis de mRNA de AXL em 20 casos de pacientes com carcinoma de células renais<sup>65</sup>. Em 2009, Gustafsson e colegas<sup>66</sup>, publicaram a avaliação de expressão de AXL numa coorte de 308 pacientes com carcinoma de células renais, por diferentes métodos. Neste estudo foram avaliadas 221 amostras tumorais por RT-PCR, evidenciando que pacientes com níveis baixos de mRNA AXL e níveis altos de mRNA Gas6 apresentaram melhor sobrevida mediana. Outra informação importante neste trabalho foi a análise de Axl solúvel e Gas6 séricos. Os níveis séricos baixos correlacionaram com melhor sobrevida destes pacientes. Em análise imuno-histoquímica, a expressão do receptor AXL foi alto em tecido renal normal, particularmente em células tubulares epiteliais. Em tecido com carcinoma de células renais, a expressão de AXL por imuno-histoquímica variou consideravelmente entre indivíduos, sendo que não houve correlação no mesmo indivíduo entre as amostras de RNA tumoral ou a concentração plasmática da proteína Axl solúvel. Também neste estudo não foi encontrado nenhuma correlação entre a expressão de AXL por imuno-histoquímica com o estadió, grau nuclear do tumor e sobrevida mediana<sup>66</sup>. Importante lembrar que nesta população de 308 pacientes, ao diagnóstico, 86 pacientes apresentavam carcinoma de células renais metastáticos com histologia células claras e apenas 1 paciente foi tratado com sunitinibe.

Em 2015, um estudo publicado por Sun e colegas, analisou 110 amostras de tecidos de carcinoma de células renais tipo células claras e constatou que aproximadamente 26% apresentavam expressam aumentada de AXL. Neste mesmo estudo, evidenciou-se também que em 64 amostras de carcinoma de células renais tipo papilar, 41% apresentam expressam aumentada de AXL. Neste estudo não foi analisado sobrevida dos pacientes<sup>67</sup>. Ainda em carcinoma de células renais, observou-se que em tumores mais agressivos, no qual pacientes apresentavam pior sobrevida, a expressão de AXL foi aumentada. Todos os pacientes com expressão aumentada de AXL morreram dentro de 80 meses do diagnóstico,

conferindo ao AXL um possível papel de indicador prognóstico<sup>56</sup>. Estudos recentes *in vitro* também evidenciaram que a proteína AXL é responsável pela migração, neovascularização e crescimento em carcinoma de células renais<sup>68</sup>.

### 1.4.3 Biomarcadores

Biomarcador é qualquer indicador biológico que possa ser usado para identificar alguma característica de certa doença ou de seu tratamento. O contexto específico onde um biomarcador possa influenciar uma decisão médica inclui<sup>69</sup>: detecção, onde o uso de biomarcador pode estabelecer um diagnóstico; prognóstico, na qual mensura-se a probabilidade de um específico desfecho clínico, como recorrência, progressão ou sobrevida; predição, onde identifica-se a chance de resposta a uma terapia específica; indicador de resposta, no qual biomarcadores demonstram a resposta farmacológica ou fisiológica de um tratamento, não indicando que o paciente tenha benefício ao tratamento.

Numerosos marcadores tumorais moleculares estão sendo analisados e investigados para o tratamento ou prognóstico de carcinoma de células renais, como anidrase carbônica IX, fator de crescimento endotelial, fator indutor de hipóxia, Ki67, p53, PTEN, entre outros<sup>69</sup>. Até a presente data não foi aprovado nenhum teste molecular que identifique quais pacientes o médico irá mudar sua conduta em relação a algum tipo de biomarcador para carcinoma de células renais. Razões para não termos tais biomarcadores inclui a ausência de candidatos fortes, interação de múltiplos fatores, inadequação de tamanhos de amostras em estudos para identificar um biomarcador específico, dentre outros. Sem esses testes disponíveis, a histologia e a estratificação de risco pelos escores prognósticos de Motzer e ou de Heng, são essenciais para individualização do tratamento, porém são testes inespecíficos que se baseiam em análises clínicas e bioquímicas retrospectivas.

Na tentativa de identificar um biomarcador, estudo recente do nosso grupo conduzido em nossa instituição, demonstrou que em linhagens de glioblastoma, o sunitinibe também agia e tinha como alvo o AXL<sup>70</sup>. Mais recentemente, mostramos que neste tipo tumoral (gliomas) o AXL era um potencial biomarcador preditivo da resposta ao sunitinibe<sup>71</sup>. Em carcinoma de células renais é desconhecido o papel do AXL como fator preditivo de resposta ao sunitinibe.

## **2 JUSTIFICATIVA**

Pacientes com carcinoma de células renais metastático são um grupo heterogêneo e atualmente numerosas terapias sistêmicas estão disponíveis, portanto a identificação de um biomarcador tanto prognóstico ou de predição de resposta se faz necessário, podendo-se assim melhorar a individualização da terapia em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos, especificamente naqueles tratados com sunitinibe.

### 3 OBJETIVO

- Determinar o perfil epidemiológico, e a associação das características clínico-patológicas dos pacientes com carcinoma de células renais metastáticos que fizeram uso de sunitinibe com a sobrevida global.

- Revisão histopatológica dos casos e realização de *tissue microarray* (TMA) dos pacientes selecionados.

- Avaliar a expressão por imuno-histoquímica da proteína AXL em tecido renal normal e tumoral, além de tecido metastático.

- Correlacionar o perfil de expressão de AXL com as características epidemiológicas e clínico-patológicas dos pacientes, em particular o seu impacto no prognóstico e resposta terapêutica ao uso desta medicação.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 População do Estudo

Estudo retrospectivo através de avaliação de prontuário, no qual foi avaliado dados epidemiológicos e clínico-patológicos, além de desfechos radiológicos de pacientes com câncer de rim metastáticos, tratados com sunitinibe no Departamento de Oncologia Clínica do Hospital do Câncer de Barretos entre 2008 e 2013, sendo esta amostra definida por conveniência. Importante ressaltar que entre 2008 a 2011 o atendimento dos pacientes com câncer de rim metastáticos era realizado pela equipe de Oncologia Geral, e a partir de 2012 foi criado o subdepartamento de Onco-Urologia, com médicos oncologistas dedicados exclusivamente ao atendimento de pacientes com neoplasias malignas do trato gênito-urinário.

O levantamento de dados foi baseado em ficha de coleta de dados (Anexo C). Foram incluídos para análise retrospectiva de dados epidemiológicos e clínico-patológico 114 pacientes.

#### 4.1.1 Critérios de elegibilidade

Pacientes com carcinoma de células renais metastáticos, independente da histologia, tratados com sunitinibe no Hospital do Câncer de Barretos entre 2008 e 2013.

Incluímos em análise patológica apenas aqueles pacientes com amostra suficiente para análise.

### 4.2 Revisão histopatológica e realização do *tissue microarray* (TMA)

Dos 114 pacientes revisados por prontuário, sendo todos tratados com sunitinibe em algum momento da história natural de sua doença, 16 pacientes não possuíam material biológico (tumor fixado em formol e incluído em parafina) para análise ou revisão histopatológica, e dos 98 pacientes restantes que apresentaram material, foi realizado revisão e reclassificação histopatológica de todos os casos de acordo com a classificação de Vancouver para neoplasias renais da Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP)<sup>26</sup> endossada pela World Health Organization em 2016<sup>10</sup>, pela uro-patologista deste serviço, Mariana Morini.

Afim de ter uma maior representatividade do tumor, optamos por confecção de *tissue microarray* (TMA), com 2 cores de 1,0 mm do tecido tumoral. Naqueles pacientes que se

tinha material de nefrectomia, para controle interno do experimento, também se realizou TMA de áreas renais não afetadas pela neoplasia, também com 2 cores de 1,0 mm. Pacientes que possuíam pouca quantidade material tumoral para confecção de TMA, decidiu-se por cortar lâminas dos blocos de parafina afim de realizar as reações de imuno-histoquímica.

Infelizmente não foi possível realizar teste imuno-histoquímico em sete pacientes devido a pouco material disponível para análise. Dos 91 pacientes com material biológico suficiente para análise, 23 pacientes apresentavam material biológico das peças cirúrgicas de nefrectomia e material de metástases. Em 33 pacientes do banco de dados tinha-se material apenas das peças de nefrectomia. Em 22 pacientes tinha-se a core biópsia do rim afetado pelo tumor, sendo que um paciente tinha-se tanto a core biópsia do rim afeado e o material da metástase. Em 13 pacientes tinha-se apenas o material das biópsias de metástases (figura 7).

Nos 56 pacientes que possuíam a peça cirúrgica de nefrectomia, áreas tumorais e normais existentes foram marcadas nas lâminas de hematoxilina-eosina (HE), para posterior confecção de TMA. Em 24 pacientes com material suficiente de metástases ou core biópsia, áreas tumorais foram marcadas nas lâminas de HE, para confecção de TMA. Em 34 pacientes que não se tinha material de core biópsia ou de metástase suficientes para confecção de TMA, a reação de imuno-histoquímica estudada foi realizada em lâmina de material parafinado.

Importante ressaltar somente aqueles que possuíam material tumoral suficiente foram incluídos para análise de material biológico.

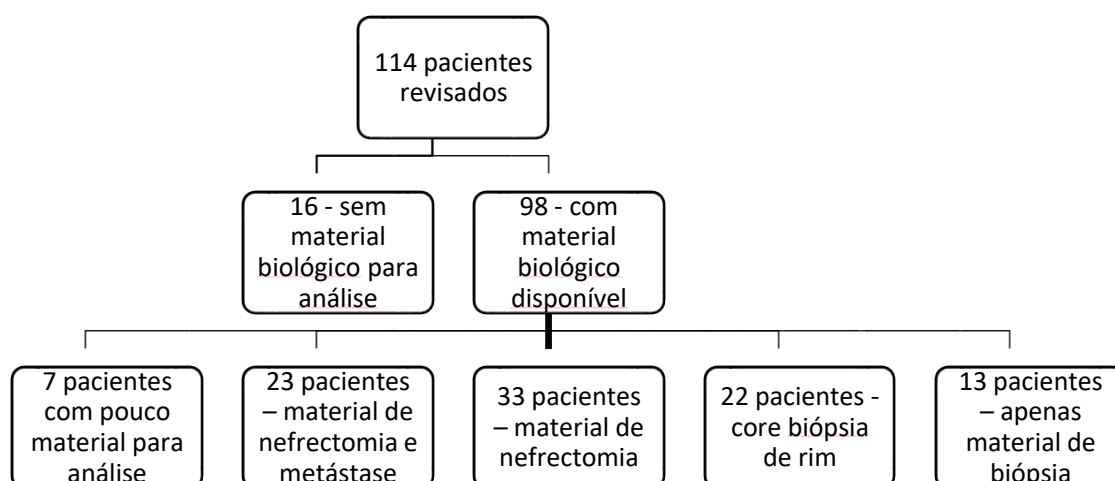


Figura 7 - Fluxograma de pacientes revisados e a distribuição de pacientes com e sem material biológico disponível para análise.

### 4.3 Avaliação de expressão imuno-histoquímica de AXL

Para padronização da reação de imuno-histoquímica, utilizamos dois anticorpos contra a forma total de AXL, *Axl* (Cat #AF154 R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), o qual descreveu-se de anticorpo do fabricante R&B e *Axl* ((c-20): sc-1096, Santa Cruz Biotechnology, INC.), o qual descreveu-se anticorpo do fabricante Santa Cruz. Para avaliação de expressão de AXL por imuno-histoquímica usou-se como controle positivo tecido mamário normal, pois AXL de membrana é expresso nas células ductais luminais com expressão variável em citoplasma<sup>72</sup>, além de ter sido usado também *cell-block* de linhagem celular de glioblastoma, SNB19, a qual expressa fortemente AXL, como evidenciado em estudo anterior do grupo<sup>71</sup>. Usou-se como controle negativo *cell-block* de linhagem celular SNB19 transfectada com *short hairping RNA* para AXL, o qual inibe a expressão de AXL (shSNB19)<sup>71</sup>.

A análise microscópica das reações foi realizada no microscópio Nikon Eclipse E200 e foram consideradas positivas as células que marcaram membrana e citoplasma. Foram analisados nas reações de imuno-histoquímica tanto da extensão quanta da intensidade da expressão do antígeno contra a forma total de AXL. Em relação a extensão foi considerado negativo quando nenhuma ou menor igual a 1% das células neoplásicas apresentavam marcação; positividade 1+ quando mais que 1% e menor igual a 10% das células neoplásicas



apresentavam marcação; positividade 2+ maior que 10% e menor igual a 50%; e positividade 3+ maior que 50% das células neoplásicas marcando. Em relação a intensidade, graduou-se como negativo quando não havia nenhuma marcação, positividade 1+ quando as células neoplásicas estavam marcadas de grau fraco; positividade 2+ de grau moderado e positividade 3+ as células neoplásicas marcadas de grau forte. Posteriormente foi feita a somatória da intensidade e extensão e criou-se uma escala quantitativa de 0 a 6+. Dividiu-se os pacientes em dois grupos de acordo com escore, aqueles com somatória de 0 a 2+ foram considerados AXL negativo (AXL -) e o grupo com somatória 3+ a 6+ foram considerados AXL positivo (AXL +). Para efeitos qualitativos ainda consideramos os casos em moderadamente (3-4+) e fortemente (5-6+) positivos. Como cada amostra tumoral tinham dois poços de TMA, utilizou-se como referência aquele poço com maior graduação. As imagens foram capturadas com o software NIS Elements.

#### **4.4 Análise estatística**

Para finalidade deste estudo, o levantamento dos dados de interesse foi realizado por meio de ficha individual padronizada (anexo C). Para registro e arquivo das informações, bem como o processamento estatístico, foi criado um banco de dados específico em SPSS, com os dados demográficos, clínico-patológicos e imuno-histoquímicos.

Para testar a associação entre as frequências de pacientes com câncer de rim do subtipo células claras com os pacientes do subtipo não células claras e suas associações com diferentes características clínico-patológicas como sítio de metástase, foi utilizado o teste de  $\chi^2$  ou teste exato de Fisher, com p valor < 0,05.

Curvas de sobrevida foram estimadas usando o método de *Kaplan-Meier*. O método de log-rank foi utilizado para testar a significação das diferenças nas distribuições das sobrevidas. Foi estimada a sobrevida global (SG), sendo considerada a diferença entre a data do diagnóstico de metástase até a data do óbito por qualquer motivo (sendo este o evento de interesse). Caso o evento não tenha ocorrido, foi considerado a data da última informação objetiva do paciente. Posteriormente, para verificar a relação conjunta entre as características do paciente e a sobrevida, foi utilizado a regressão de Cox múltipla. Para isso selecionamos apenas as variáveis que obtiveram p-valor menor que 0,2 no teste anterior. Incluiu-se as variáveis, características demográficas como sexo e idade, além de fatores clínico-patológicos que conferem maior agressividade tumoral, como ausência de nefrectomia prévia, KPS, hemoglobina, cálcio, número de neutrófilos e número de

plaquetas ao diagnóstico de metástase, tempo entre o diagnóstico de câncer de rim até o início do tratamento sistêmico para doença metastática, número de sítios de metástase ao diagnóstico, metástase óssea, hepática e em sistema nervoso central, tipo histológico, características sarcomatoides do tumor e a expressão de AXL em tecido tumoral renal<sup>27, 29, 30, 73</sup>.

Para testar a associação entre a frequência de expressão de AXL e as diferentes características demográficas, clínicas, bioquímicas e patológicas citadas anteriormente, além da variável “resposta ao tratamento com sunitinibe”, foi utilizado o teste de  $\chi^2$  ou teste exato de Fisher. Em análise univariada, as variáveis que obtiveram p valor < 0,2, foram inseridas no modelo de múltiplas variáveis.

Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ , sendo que em análise com múltiplas variáveis utilizou-se o método de backward para retirada das variáveis em que o p foi maior igual a 0,05, até chegar em todas as variáveis significantes. Todas estas análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS para Windows, versão 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização da população do estudo

#### 5.1.1 Tipo histológico, sítios de metástases, status dos pacientes

O perfil epidemiológico evidenciou que dos 114 pacientes a maioria é do sexo masculino, sendo composto de 68% (77) de homens e 32% (35) de mulheres, mantendo-se a proporção observada de câncer de rim em coortes internacionais de dois homens para uma mulher<sup>11</sup>. Interessante notar que 1,8% (2) dos pacientes apresentavam história familiar de câncer renal em parente de primeiro grau.

O tipo histológico mais frequente foi carcinoma de células claras, sendo 82% (93) dos pacientes, e 18% (21) de pacientes não células claras, sendo o subtipo papilar o mais frequente, com 8% (9) dos pacientes (tabela 2). Quatro pacientes, dos 93 descritos prévios do subtipo células claras, apresentaram células claras com componente sarcomatoide. Além de dois pacientes com carcinoma SOE, apresentarem 100% de componente sarcomatoide. Nota-se também que a proporção é semelhante ao previamente publicado <sup>2, 3, 27</sup>.

Tabela 2 - Frequência e porcentagem segundo o subtipo histológico de pacientes com carcinoma de células renais metastáticos.

<b>Tipo histológico</b>	<b>Frequência</b>	<b>Porcentagem</b>
Células claras	93	82%
Papilar	9	8%
Cromóforo	2	2%
Carcinoma SOE	10	9%

Esta população era composta de pacientes com metástases à distância em algum momento da história natural do carcinoma de células renais.

Um pouco mais da metade dos pacientes, 53% (60) já se apresentavam com metástases ao diagnóstico inicial. Ao diagnóstico de doença metastática, a maioria dos pacientes, 57% (65), tinha apenas um sítio de metástase, independente do subtipo histológico, sendo que a maioria dos pacientes do subtipo células claras, 55% (51), também tinham apenas um sítio de metástase ao diagnóstico. A maioria dos pacientes com

carcinoma de células renais do subtipo não células claras, 67% (14) dos pacientes, também apresentavam apenas um sítio de metástase ao diagnóstico, (tabela 3).

Tabela 3 - Número de sítios de metástases em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos.

<b>Sítio de metástase</b>	<b>Células claras 93 (100%)</b>	<b>Não células claras 21 (100%)</b>	<b>p valor</b>
1	51 (55%)	14 (67%)	0,32
> 1	42 (45%)	7 (33%)	

Em relação a porcentagem de metástases por tecido, a maioria dos pacientes com carcinoma de células renais do tipo células, 66% (61) dos pacientes, apresentavam metástases pulmonares, sendo que a maioria dos pacientes com câncer de rim do tipo não células claras, 62% (13) dos pacientes, apresentavam metástases linfonodais. Trinta e quatro (37%) pacientes com câncer de rim tipo células claras apresentavam doença linfonodal, sendo que a diferença de metástase linfonodal para não células claras foi menor, clinicamente significativa, sugerindo que pacientes com câncer de rim do tipo não células claras se apresentam com maior incidência de metástase linfonodal ao diagnóstico, como evidenciado em trabalhos anteriores<sup>2</sup>. Em relação aos outros sítios de metástases, não houve diferença estatística entre os dois subtipos, sendo os pacientes com subtipo células claras tiveram maior metástases óssea, hepática, adrenal e em sistema nervoso central, em ordem crescente. Nota-se que 13% (12) dos pacientes com carcinoma de células claras apresentam sítios não usuais de metástases, como por exemplo, em tireoide, duodeno, epiplon e em tecido subcutâneo, característica deste subtipo histológico<sup>2</sup>. Os pacientes com tipo histológico não células claras, tiveram maior incidência, em ordem decrescente de metástases óssea, adrenal, hepática e em sistema nervoso central (tabela 4).

Tabela 4 - Frequência e porcentagem segundo o sítio de metástases por tecido de pacientes com carcinoma de células renais metastáticos.

Sítio de Metástase	Células claras	Não células claras	p valor
	93 (100%)	21 (100%)	
Pulmão	61 (66%)	12 (57%)	0,46
Linfonodos	34 (37%)	13 (62%)	0,03
Ossos	34 (37%)	9 (43%)	0,59
Fígado	13 (14%)	3 (14%)	0,97
Adrenal	10 (11%)	4 (19%)	0,29
SNC	5 (5%)	3 (14%)	0,14
Outros tecidos*	12 (13%)	0 (0%)	0,08

SNC, sistema nervoso central; \*, 3 pacientes com metástase em pâncreas, 2 em tireoide, 2 em partes moles, 1 em epiplon, 2 em tecido subcutâneo, 1 em duodeno

Em relação ao status do paciente, 77 pacientes (67%) morreram pela doença, 14 pacientes (12%) estavam vivos com doença e 2 (2%) pacientes estavam vivos sem doença ativa. Na tabela 5 separou-se os pacientes do subtipo células claras e não células claras em relação ao status. A perda de seguimento foi alta, 18% (20) dos pacientes, sendo a última atualização em julho de 2015 (tabela 5).

Tabela 5 - Frequência e porcentagem do status de pacientes com carcinoma de células renais metastáticos tipo células claras e células não claras.

Status	Células claras	Não células claras
	93 (100%)	21 (100%)
Vivo sem doença	1 (1%)	1 (5%)
Vivo com doença	14 (15%)	0 (0%)
Óbito pela doença	62 (67%)	15 (71%)
Óbito por outras causas	1 (1%)	0 (0%)
Perda de seguimento	15 (16%)	5 (24%)

### 5.1.2 Tratamento sistêmico

Em relação ao tratamento sistêmico, 69% (77) dos pacientes fizeram inibidor de tirosina quinase (TKI) na primeira linha, sendo em sua grande maioria, quase 100% dos pacientes, usaram sunitinibe como tratamento padrão. Em pacientes com carcinoma de não células claras a terapia de escolha para primeira linha também foi TKI, em 79% (15) dos pacientes. Vinte e três por cento (26) dos pacientes usaram inibidor de tirosina-quinase na segunda linha, sendo o sunitinibe também a opção de tratamento (tabela 6).

Tabela 6 - Frequência e porcentagem em relação a linha de tratamento com sunitinibe em pacientes com carcinoma de células renais.

Linha do tratamento de TKI*	Células claras	Não células claras	Total
	92 (100%)	19 (100%)	111 (100%)
1ª	62 (67%)	15 (79%)	77 (69%)
2ª	23 (25%)	3 (16%)	26 (23%)
3ª	6 (7%)	1 (5%)	7 (6%)
4ª	1 (1%)	0 (0%)	1 (1%)

\* Inibidor de tirosina quinase

### 5.1.3 Curvas de sobrevida global

A sobrevida global mediana desta coorte de pacientes foi de 19,1 meses com intervalo de confiança de 95% entre 10,7-28,9 meses, sendo que em 1 ano, 3 anos e 5 anos a chance de um paciente estar vivo foi de 63%, 32% e 0,4%, respectivamente (Figura 8). A sobrevida global mediana desta coorte foi um pouco menor quando comparado com dados internacionais coletados por Heng e colegas em 2009 o qual foi de 22 meses (IC 95% 20,2 a 26,5 meses)<sup>27</sup>.

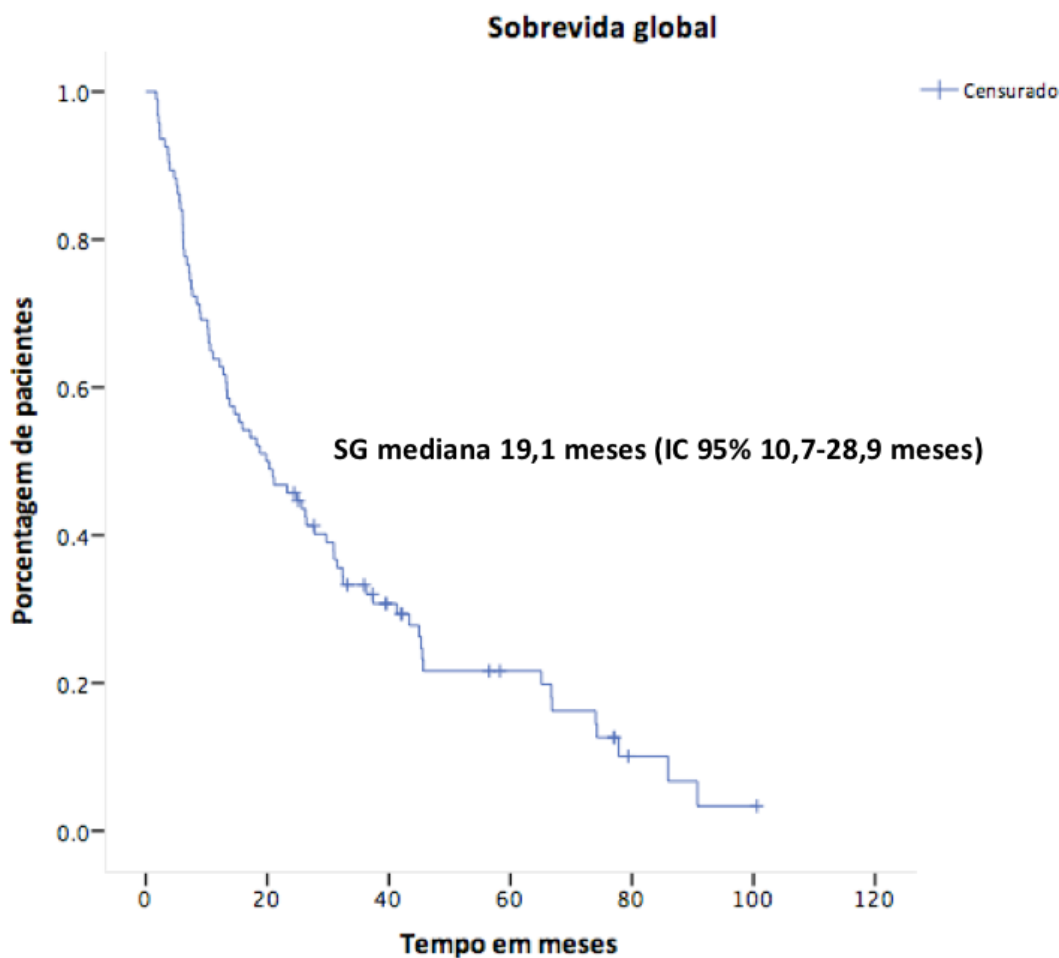


Figura 8 - Sobrevida global dos pacientes com carcinoma de células renais metastáticos tratados no Hospital do Câncer de Barretos de 2008 a 2013.

Dividiu-se os pacientes de acordo com a histologia, sendo que a sobrevida global mediana de pacientes com carcinoma de células claras metastáticos foi 20,9 meses com intervalo de confiança de 95% entre 11,8-30 meses, e a sobrevida global mediana de pacientes com carcinoma não células claras foi de 10,3 meses com intervalo de confiança de 95% entre 0,7-20 meses, no entanto esta diferença não foi significativa ( $p = 0,16$ ) (figura 9). Quando se compara ao trabalho de Heng publicado em 2009, nota-se que pacientes com histologia não células claras também tiveram um tempo de sobrevida global mediana menor em comparação com pacientes com subtipo histológico células claras, respectivamente 16,8 meses versus 22,7 meses<sup>27</sup>.



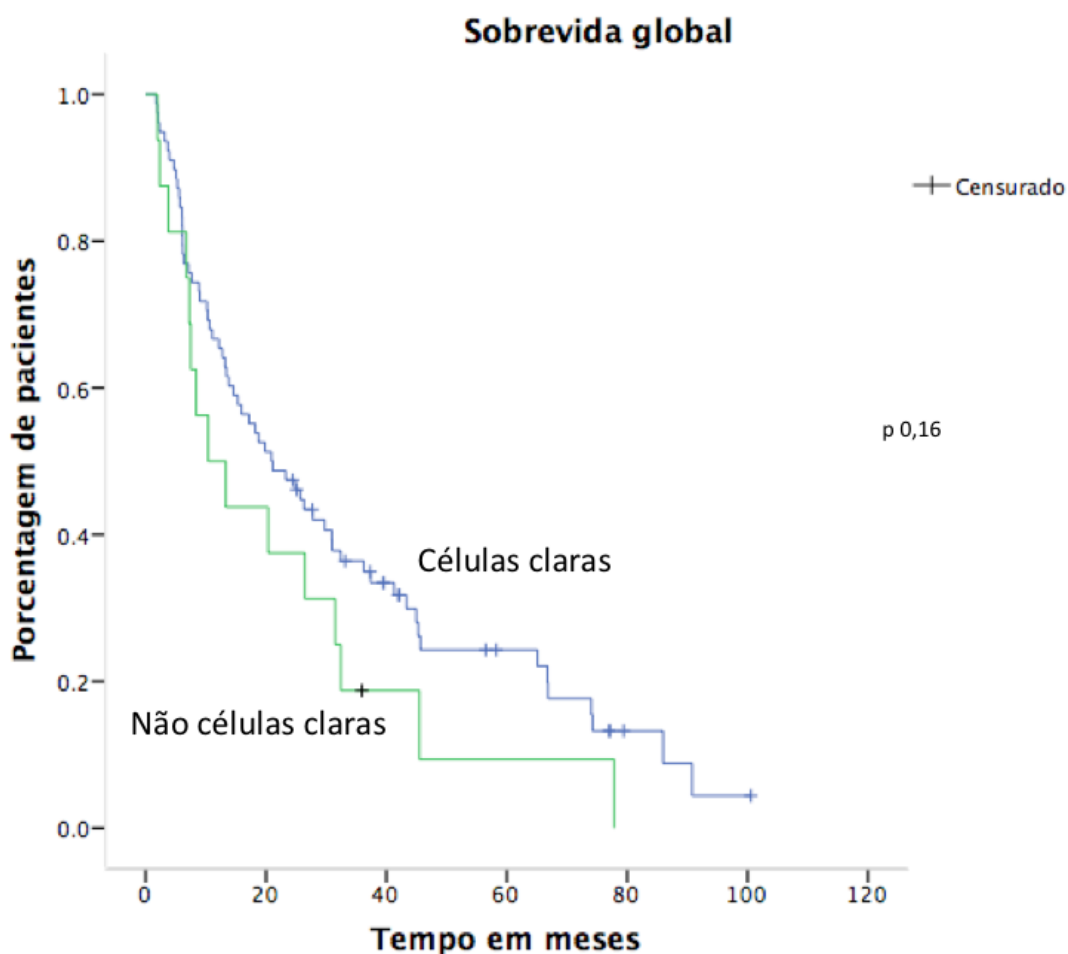


Figura 9 - Sobrevida global dos pacientes com carcinoma de células renais metastáticos de acordo com o subtipo histológico tratados no Hospital do Câncer de Barretos de 2008 a 2013.

Classificou-se todos pacientes de acordo com os critérios de Heng, no entanto 67 pacientes (59%) não possuíam todos os critérios clínicos e bioquímicos suficientes, não sendo possível classificá-los em nenhum grupo de risco prognóstico. Antes de 2011, na altura da criação do ambulatório de especialidade de Onco-Urologia, o cálcio sérico não era avaliado rotineiramente antes do início do tratamento de primeira linha para os pacientes câncer renal metastático (tabela 7).

Tabela 7 - Frequência e porcentagem do ano de início de acompanhamento em ambulatório da oncologia clínica do paciente carcinoma de células renais no Hospital do Câncer de Barretos no período entre 2008 e 2013 e sua relação com coleta de cálcio sérico.

Ano do início do acompanhamento	Coleta de cálcio sérico			p valor
	Não	Sim	Total	
2008 a 2011	47 (66%)	24 (34%)	71 (100%)	<0,001
A partir de 2012	13 (31%)	29 (69%)	42 (100%)	

Dos pacientes que possuíam todos os critérios clínicos e bioquímicos, dois pacientes (4%) eram de bom prognóstico, 20 pacientes (43%) de prognóstico intermediário e 25 pacientes (53 %) de prognóstico ruim. Interessante notar que 10 pacientes (21%) eram do subtipo não células claras. Quando calculado a sobrevida global mediana dos diferentes subgrupos, foi retirado os dois pacientes de prognóstico favorável devido ao baixo número de casos. Calculou-se então, a sobrevida global mediana de acordo com os riscos intermediário e ruim e encontramos diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,047$ ) (Figura 10). Pacientes de prognóstico intermediário tiveram sobrevida global mediana de 21,1 meses (IC 95% 7,1 – 35 meses) e os pacientes de prognóstico ruim a sobrevida global mediana foi de 7,6 meses (IC 95% 2,5-12,8 meses) (Figura 10). Quando comparado com a sobrevida global mediana publicado por Heng e colegas dos diferentes subgrupos, a sobrevida global mediana no grupo de prognóstico intermediário foi de 27 meses, maior que esta coorte. Nos pacientes de prognóstico ruim a sobrevida foi um pouco mais semelhante quando comparada com a coorte de Heng, o qual foi de 8,8 meses<sup>27</sup>.

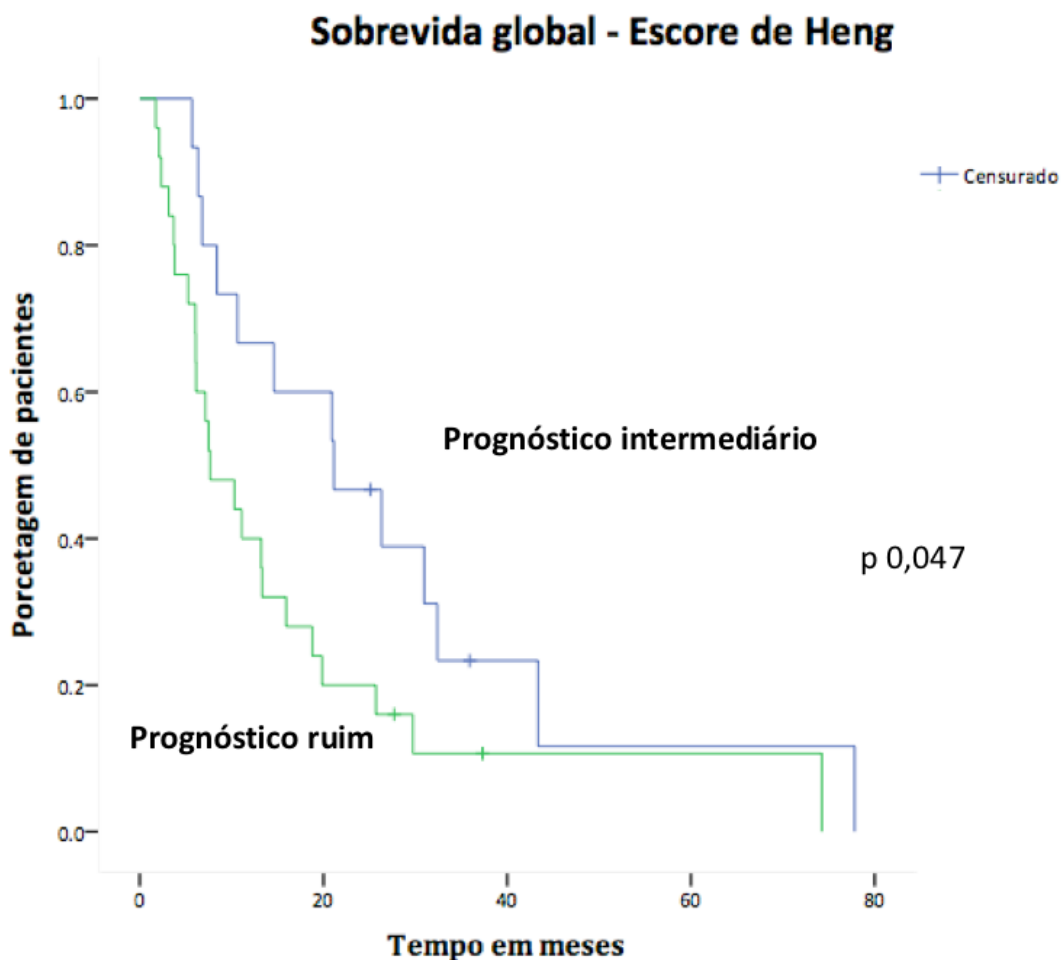


Figura 10 - Sobrevida global de acordo com os critérios de Heng dos pacientes do Hospital do Câncer de Barretos tratados com sunitinibe entre 2008 e 2013.

## 5.2 Análises da expressão de AXL

### 5.2.1 Reações de imuno-histoquímicas

Na primeira fase deste experimento todos os tecidos parafinados foram desparafinizados em xilol, re-hidratados através de soluções graduadas de etanol e lavadas com água destilada. A recuperação antigênica foi feita em panela Pascal em solução de citrato e EDTA (ph6) por 4 minutos a 125 °C seguidos de 20 minutos a 90 °C. A peroxidase endógena foi bloqueada segundo método do complexo avidinabiotina-peroxidase (*Cell&Tissue Stainig Kit*) de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida comparou-se os anticorpos do fabricante Santa Cruz e da R&D, em diferentes diluições contra a forma total do AXL, sendo que ambos os anticorpos foram incubados *overnight* a 4°C em câmara fria. Para o anticorpo do fabricante Santa Cruz diluiu-se de acordo com a especificação do fabricante, 1:50 e 1:100. As marcações não ficaram adequadas, com pouca intensidade, tanto nos controles quanto em tecido renal, e não se utilizou mais o anticorpo

deste fabricante. Para o anticorpo do fabricante R&D, começou-se com a diluição 1:20 de acordo com a especificações do fabricante, porém, apresentou-se com marcação pouco intensa nos controles. Concentrou-se então com diluição 1:15 o qual se apresentou com melhor intensidade tanto nos controles quanto em tecido tumoral renal. No entanto, notou-se que todas as lâminas não ficaram homogênea coradas em sua extensão, sendo atribuído tal efeito ao processamento manual.

Em uma segunda fase deste experimento optou-se por realizar a desparafinização e recuperação antigênica de forma automatizada. As lâminas foram desparafinizadas em estufa à 80°C por 1h e a recuperação foi realizada no equipamento PT LINK - Dako, usando o tampão de recuperação antigênica comercial *Envision flex target retrieval solution high ph 1x*, da empresa Dako, com pH: 9,0. Manteve-se apenas a utilização do anticorpo do fabricante R&D e iniciou-se com a diluição 1:15 com o mesmo padrão de recuperação endógena e incubação *overnight* a 4 °C em câmara fria. Notou-se que a marcação ficou muito intensa. Decidido, portanto, diminuir o tempo de incubação de *overnight* para 2 horas, e com alteração da concentração de 1:15 para 1:50. Estas modificações deram resultados adequados de intensidade e extensão da marcação, sendo estes parâmetros (2 horas de incubação de anticorpo primário, diluição de 1:50, e automatizado -PT LINK - Dako) o padrão para os experimentos subsequentes.

### **5.2.2 Tipo tecidual e número de pacientes**

Foram feitas reações de imuno-histoquímica do anticorpo anti-AXL em 70 amostras tumorais de tecido primário de carcinoma de células renais e 29 amostras tumorais de tecido metastático. Cinquenta e nove amostras tumorais de tecido primário foram feitas em TMA e 11 foram feitas em lâminas devido ao pouco material disponível. Vinte e quatro amostras tumorais de metástase foram feitas em TMA e quatro amostras em lâminas. Infelizmente não foi possível corar sete amostras de tecido primário e uma amostra de metástase por falta de anticorpo anti-AXL R&D. Corou-se também 54 amostras de tecido normal de nefrectomia em TMA daqueles pacientes que realizaram tal procedimento. As reações feitas em TMA foram corados nos dois cores de 1,0 mm. Infelizmente em 11 amostras tumorais de TMA não foram possíveis a avaliação de AXL devido a material danificado dos dois cores (Figura 11).

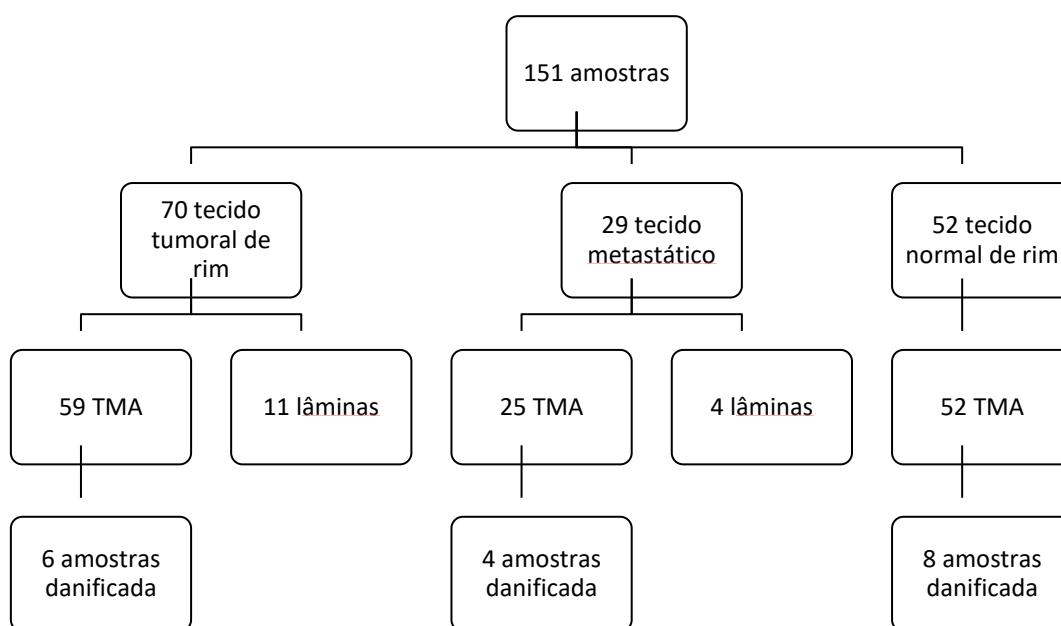


Figura 11 - Distribuição de material de tecido de rim normal e tumoral, além de tecido metastático em relação as reações de imuno-histoquímica realizadas em TMA ou lâmina na população.

Em conclusão, dos 114 pacientes da coorte original, corou-se material de 77 pacientes, sendo que suas amostras tumorais foram distribuídas da seguinte maneira (figura 12):

- 9 pacientes com amostras tecido renal normal e tumoral, além de metástase;
- 32 pacientes com amostras tecido renal normal e tumoral;
- 3 pacientes com amostras tecido renal normal;
- 5 pacientes com amostras tecido tumoral e metástase;
- 18 pacientes apenas com amostra de tecido renal tumoral;
- 10 pacientes apenas com amostra de metástase;

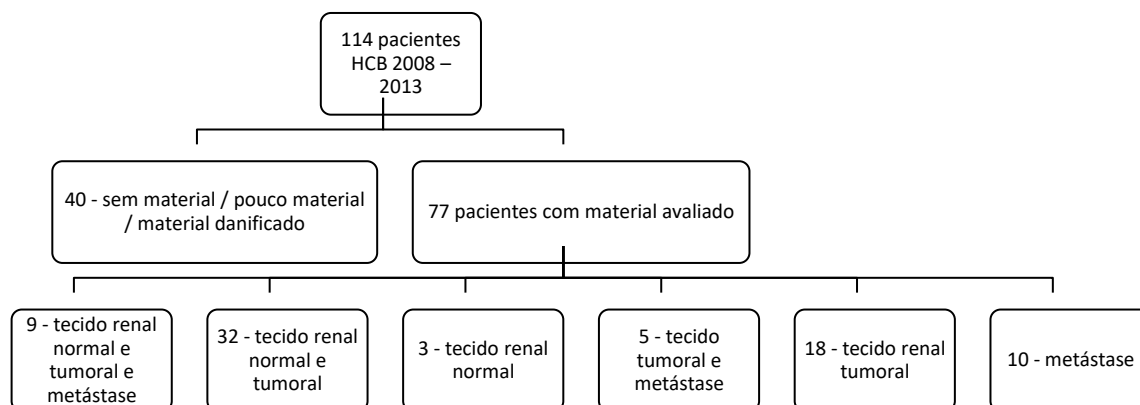


Figura 12 - Distribuição dos pacientes de acordo com a realização dos testes de imunohistoquímica em seus diferentes tecidos.

### 5.2.3 Perfil de expressão de AXL

Como descrito em materiais e métodos, graduou-se as reações imunohistoquímicas tanto na sua intensidade (0 a 3+) quanto em sua extensão (0 a 3+), e negatividade e positividade era resultante do somatório de ambos (Figura 13). As amostras foram classificadas em negativas (0-2+), e positivas (3-6+). Qualitativamente, os casos positivos ainda foram subclassificadas em moderadamente positivas (3-4), e fortemente positivas (5-6). A expressão quando presente era citoplasmática e membranar (Figura 13) nas células neoplásicas e normais. As células endoteliais também evidenciaram imunopositividade (Figure 13).

No tecido renal normal observamos a ausência de AXL na maioria dos 52%, e interessante nenhum tecido normal foi fortemente positivo (Tabela 8). Os casos fortemente positivos passaram de 0% no tecido normal, para 17% nos tecidos tumorais primários, e para 29% nos tecidos tumorais metastáticos (Tabela 8 e Figura 14).

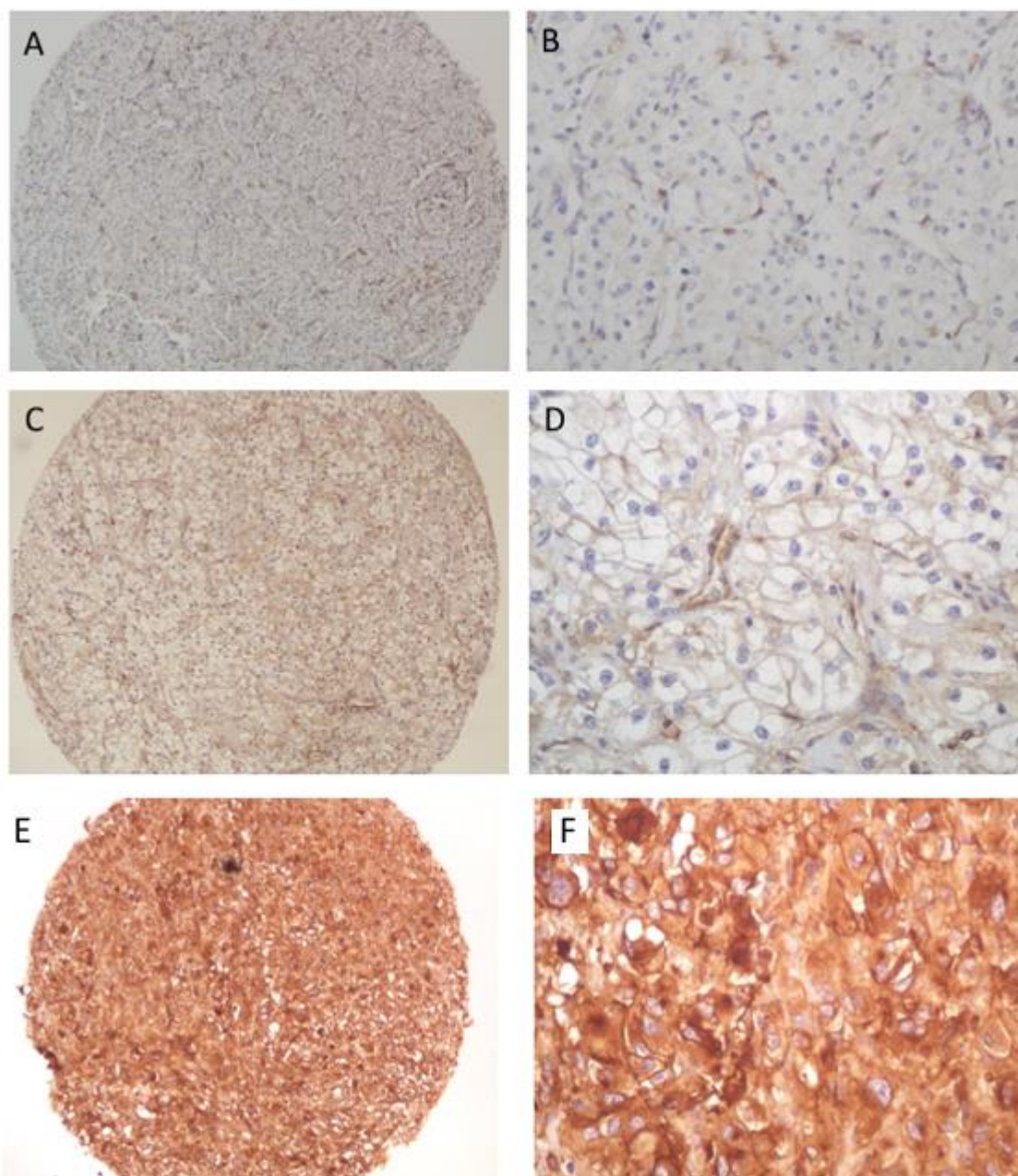


Figura 13 – A e B) Análise de imuno-histoquímica escore 0 de AXL de um paciente com carcinoma de células renais tipo células claras, tecido tumoral renal. A) 100X; B) 400X. Nota-se a marcação positiva das células endoteliais. D e C) Análise de imuno-histoquímica de escore 4, intensidade (1+) e extensão (3+), em carcinoma de células renais tipo células claras, tecido tumoral renal. C) 100X; D) 400X. E e F) Análise de imuno-histoquímica escore 6, extensão (3+) intensidade (3+), em carcinoma de células renais tipo células claras, tecido tumoral renal. E) 100X; F) 400X.

Tabela 8 - Frequência e a porcentagem das amostras de tecido renal normal e tecido tumoral de lesão renal primária e biópsias de metástases em relação a escore da expressão de AXL.

Escore AXL	Tecido renal normal		Tecido renal tumoral		Metástase	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
0	23	(52%)	26	(41%)	15	(63%)
1+	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)
2+	6	(14%)	8	(13%)	0	(0%)
3+	12	(27%)	4	(6%)	1	(4%)
4+	3	(7%)	15	(23%)	1	(4%)
5+	0	(0%)	4	(6%)	5	(21%)
6+	0	(0%)	7	(11%)	2	(8%)
Total	44	(100%)	64	(100%)	24	(100%)

\*n – número

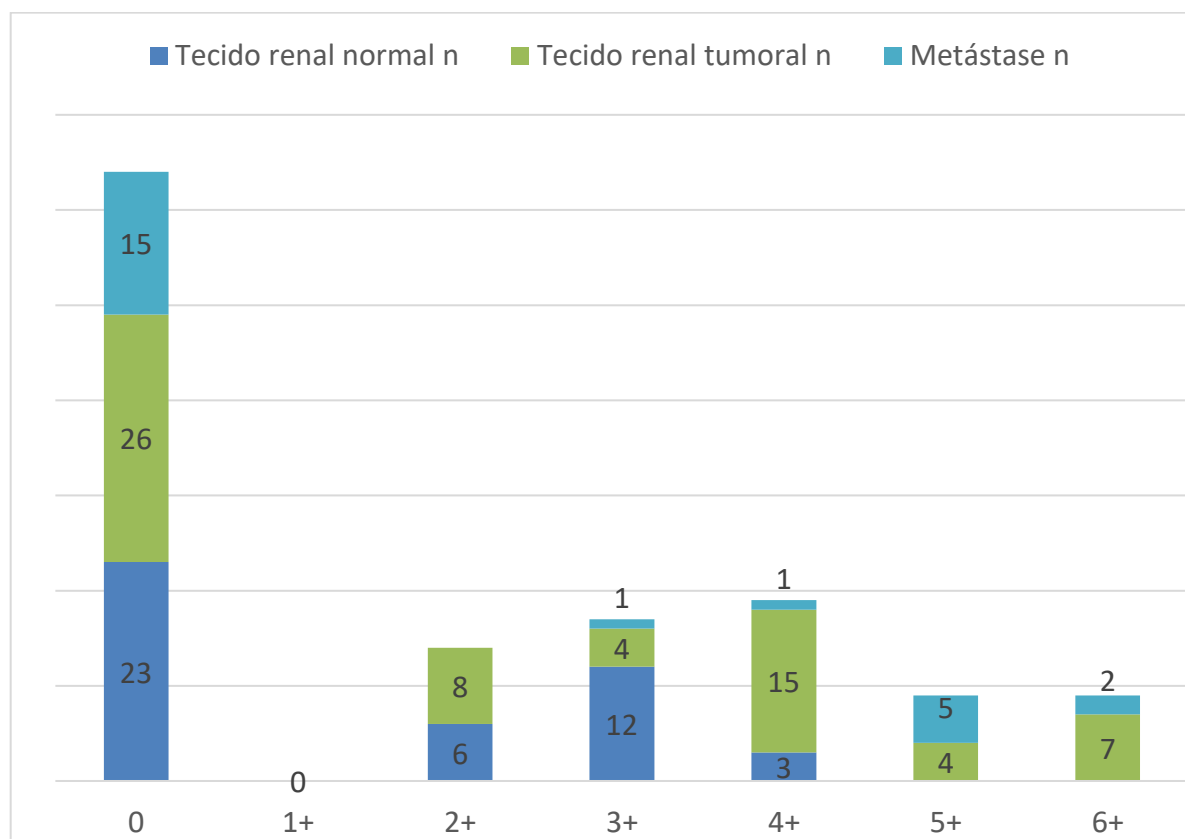


Figura 14 - Frequência das amostras de tecido renal normal e tecido tumorais de lesão renal primárias e biópsias de metástases em relação a escore da expressão de AXL.



Em seguida classificamos dicotomicamente os casos em negativos e positivos baseado na expressão imuno-histoquímica de AXL. Aqueles pacientes que obtiveram a somatória de extensão e intensidade de 0 a 2+ foram classificados como negativos e aqueles pacientes que na somatória tiveram escore entre 3+ e 6+ foram classificados como positivos. Nos pacientes com carcinoma de células claras houve uma maior quantidade de expressão negativa de AXL em comparação com expressão positiva, porém nenhuma diferença foi estatisticamente significativa. Em relação aos pacientes com carcinoma de células renais não células claras, houve uma maior expressão de positividade de AXL em tecido renal tumoral, porém em nenhum caso foi estatisticamente significativa (tabela 9).

Tabela 9 - Expressão qualitativa de AXL em pacientes com carcinoma de células renais do subtipo células claras e não células claras e entre os diferentes tipos de tecidos.

Expressão de AXL		Células claras n (%)	Não células claras n (%)	p valor
Tecido normal renal	Negativo	24 (69%)	5 (56%)	0,64*
	Positivo	11 (31%)	4 (44%)	
	Total	35 (100%)	9 (100%)	
Tecido tumoral renal	Negativo	29 (57%)	5 (38%)	0,23*
	Positivo	22 (43%)	8 (62%)	
	Total	51 (100%)	13 (100%)	
Tecido metastático	Negativo	12 (60%)	3 (75%)	1**
	Positivo	8 (40%)	1 (25%)	
	Total	20 (100%)	4 (100%)	

\* teste qui-quadrado \*\* teste de Fisher

Para avaliar se houve aumento da expressão de AXL a medida que os tecidos se tornassem mais indiferenciados, ou seja, aumento da expressão de AXL de tecido normal de rim para tecido tumoral e posteriormente para metástase, separou-se os pacientes com expressão negativa e positiva de AXL e comparou-se a positividade da expressão de tecido normal com tecido tumoral e de tecido tumoral com tecido metastático usando o teste de McNemar com p valor < 0,025 pela correção de Bonferrone. Separou os pacientes que

tinham tecido corado tanto de tecido renal normal quanto de tecido renal tumoral, e posteriormente os pacientes que tinham tecido corado tanto de tecido renal tumoral quanto de tecido metastático. Não se separou por subtipo histológico devido à baixa frequência das amostras. Em 41 pacientes tinha-se material corado tanto tecido renal normal quanto do tecido renal tumoral (tabela 10 e figura 15), e em 14 pacientes tinha-se tecido renal tumoral e da metástase (tabela 11 e figura 16). Apesar de haver um aumento na positividade do AXL, tanto quando comparado tecido normal renal com tecido tumoral renal, quando comparado tecido tumoral renal com tecido metastático, estes aumentos não foram clinicamente significantes (tabelas 10 e 11).

Tabela 10 - Expressão qualitativa de AXL em 41 pacientes com carcinoma de células renais tanto de tecido renal normal quanto de tecido renal tumoral tratados com Sunitinibe no Hospital do Câncer de Barretos de 2008 a 2013.

		Tecido tumoral de rim			p valor
		Negativo	Positivo	Total	
Tecido normal de rim	Negativo	12 (29%)	14 (34%)	26 (63%)	0,11
	Positivo	6 (15%)	9 (22%)	15 (37%)	
	Total	18 (44%)	23 (56%)	41 (100%)	

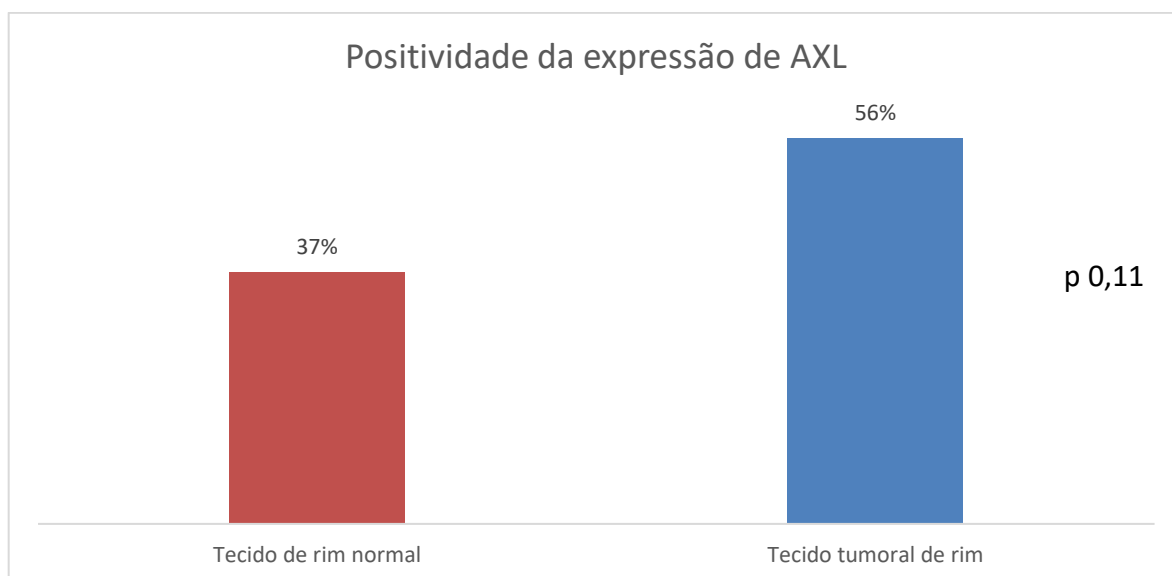


Figura 15 - Positividade da expressão AXL em 41 pacientes com carcinoma de células renais tanto de tecido renal normal quanto de tecido renal tumoral.

Tabela 11 - Expressão qualitativa de AXL em 14 pacientes com carcinoma de células renais tanto de tecido renal tumoral quanto de tecido metastático.

		Tecido tumoral de rim			p valor
		Negativo	Positivo	Total	
Tecido Metastático	Negativo	4 (29%)	3 (21%)	7 (50%)	0,72
	Positivo	5 (36%)	2 (14%)	7 (50%)	
	Total	9 (64%)	5 (36%)	14 (100%)	

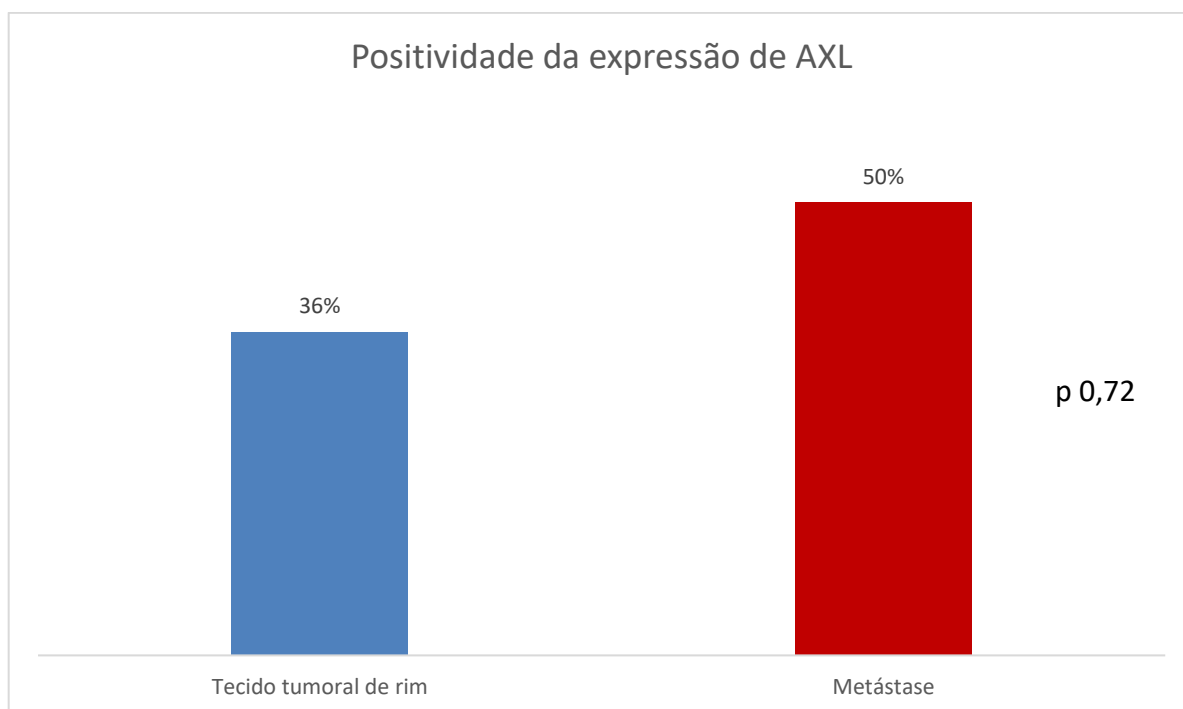


Figura 16 - Positividade da expressão AXL em 14 pacientes com carcinoma de células renais tanto de tecido renal tumoral quanto de tecido metastático.

Para demonstrar a evolução da expressão de AXL de tecidos mais diferenciados para tecidos menos diferenciados, selecionou-se os nove pacientes que tinham tecido normal, tumoral primário e tecido metastático. Oito desses pacientes eram de histologia células claras e um paciente tinha histologia papilar. Não foi possível demonstrar um padrão na evolução da positividade destes pacientes e nem correlacionar o aumento da expressão de AXL com a sobrevida global (tabela 12 e figura 17).

Tabela 12 - Identificação dos pacientes que apresentaram mudança de escore da somatória de intensidade e extensão da expressão de AXL quando comparado com tecido renal normal e tumoral de rim e posteriormente com tecido metastático.

Paciente	Expressão de AXL em tecido normal	Expressão de AXL em tecido tumoral renal	Expressão de AXL em metástase	Sobrevida global (meses)
6	0	0	0	45
7*	+3	+5	+5	35
42	+3	0	0	100
52	0	+2	+6	42
55	+3	+4	0	12
57	+4	0	+5	2
68	+2	0	+4	85
75	0	+5	0	20
79	+2	0	+5	39

\* paciente com histologia de carcinoma de células renais tipo papilar

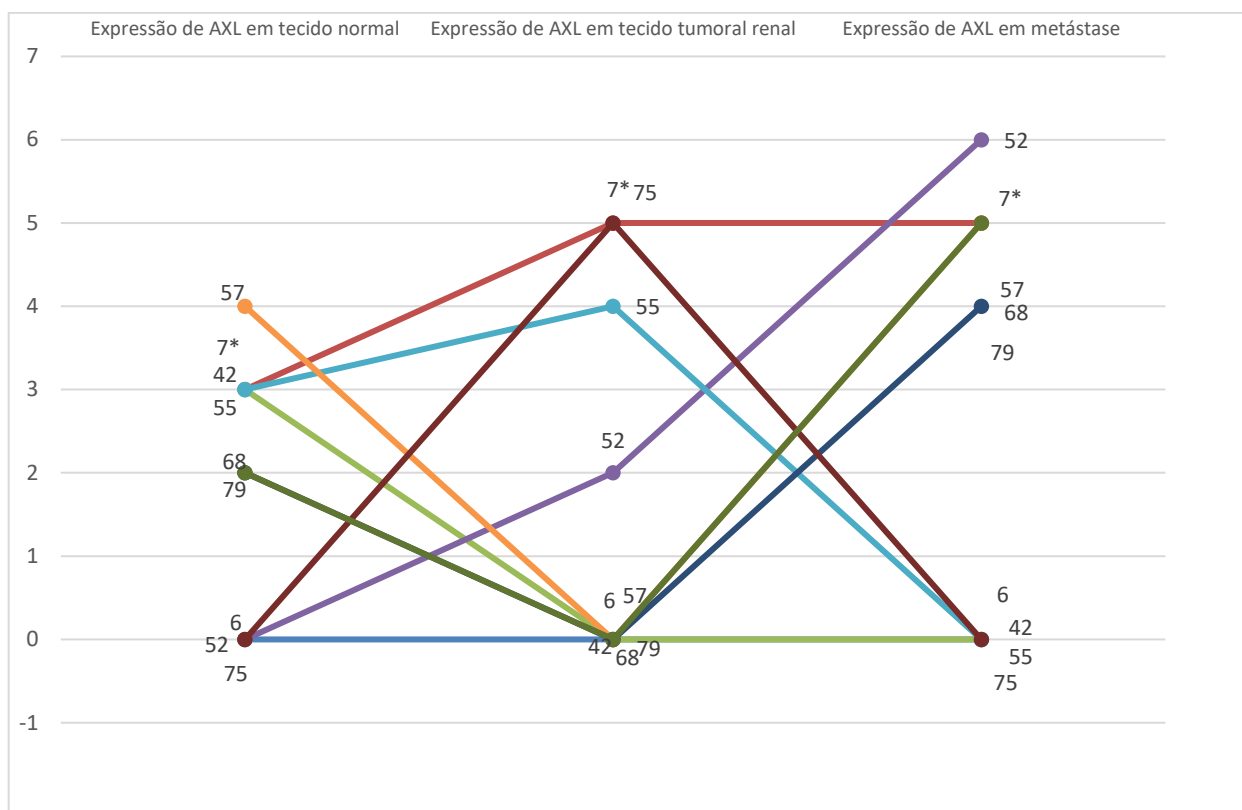


Figura 17 - Identificação dos pacientes que apresentaram de mudança de escore da somatória de intensidade e extensão da expressão de AXL quando comparado com tecido renal normal e tumoral de rim e posteriormente com tecido metastático.

### 5.3 Análises uni e multivariadas de sobrevida

#### 5.3.1 Todos subtipos histológicos

A fim de realizar análise univariada de fatores clinico-patológicos e bioquímicos prognósticos, selecionou-se 15 variáveis previamente analisadas em outros trabalhos e interrogámos o papel da expressão de AXL em tecido tumoral como uma nova variável<sup>27, 29, 30, 73</sup>. Inicialmente fez-se análise de sobrevida global usando o método de *Kaplan-Meier* para todos os casos, independente da histologia (tabela 13).

Tabela 13 - Análise univariada de sobrevida global mediana em relação as características demográficas, clínicas e patológicas, nos pacientes com carcinoma de células renais metastáticos.

Parâmetro	Nº de pacientes		Sobrevida global mediana (meses)	Log-rank p	
	Total	Mortos			
Sexo					
	Masculino	64	51	18,7	0,65
	Feminino	30	27	19,8	
Idade					
	< 57 anos	44	31	25,6	0,007
	≥ 57 anos	50	47	14,6	
Nefrectomia					
	Sim	69	54	27,7	0,001
	Não	25	24	13,3	
Hemoglobina (g/dL)					
	> 14	23	14	43,3	0,02
	≤ 14	62	55	14,6	
Hipercalcemia					
	Não	22	20	12,7	0,60
	Sim	24	21	11,0	
Neutróficos (/mm <sup>3</sup> )					
	≤ 7500	69	54	21,1	0,11
	> 7500	15	14	7,6	
Plaquetas					
	≤ 450.000	80	64	19,8	0,09
	> 450.000	4	4	5,0	
KPS					
	> 70	61	49	21,1	0,08
	≤ 70	22	20	10,2	

Continua na próxima página...

Tabela 13 (continuação) - Análise univariada de sobrevida global mediana em relação as características demográficas, clínicas e patológicas, nos pacientes com carcinoma de células renais metastáticos.

Parâmetro	Nº de pacientes		Sobrevida global mediana (meses)	Log-rank p
	Total	Mortos		
Tempo entre o diagnóstico de câncer e o início do tratamento sistêmico				
> 1 ano	34	27	30,9	0,09
≤ 1 ano	58	50	14,6	
Nº de sítios de metástase				
1 sítio	39	30	29,7	0,003
> 1 sítio	55	48	13,2	
Metástase óssea				
Não	56	43	30,9	0,05
Sim	38	35	11,0	
Metástase hepática				
Não	82	68	18,7	0,26
Sim	12	10	31,5	
Metástase SNC				
Não	87	71	20,9	0,05
Sim	7	7	7,2	
Tipo histológico				
Células Claras	78	63	20,9	0,16
Não células claras	16	15	10,3	
Características sarcomatoide				
Não	88	73	20,9	0,13
Sim	6	5	7,6	
AXL (tecido tumoral renal)				
Negativo	28	21	21,1	0,24
Positivo	27	23	13,5	

A positividade de expressão de AXL em tecido tumoral renal foi relacionado a um pior prognóstico, porém não foi clinicamente significativa, sendo que pacientes que apresentavam AXL negativo tiveram sobrevida mediana de 21,1 meses (IC 95% 0,0 – 54,2 meses) e aqueles pacientes com AXL positivo tiveram sobrevida de 13,5 meses (IC 95% 1,4 – 25,4 meses) porém com p 0,24 (figura 18).



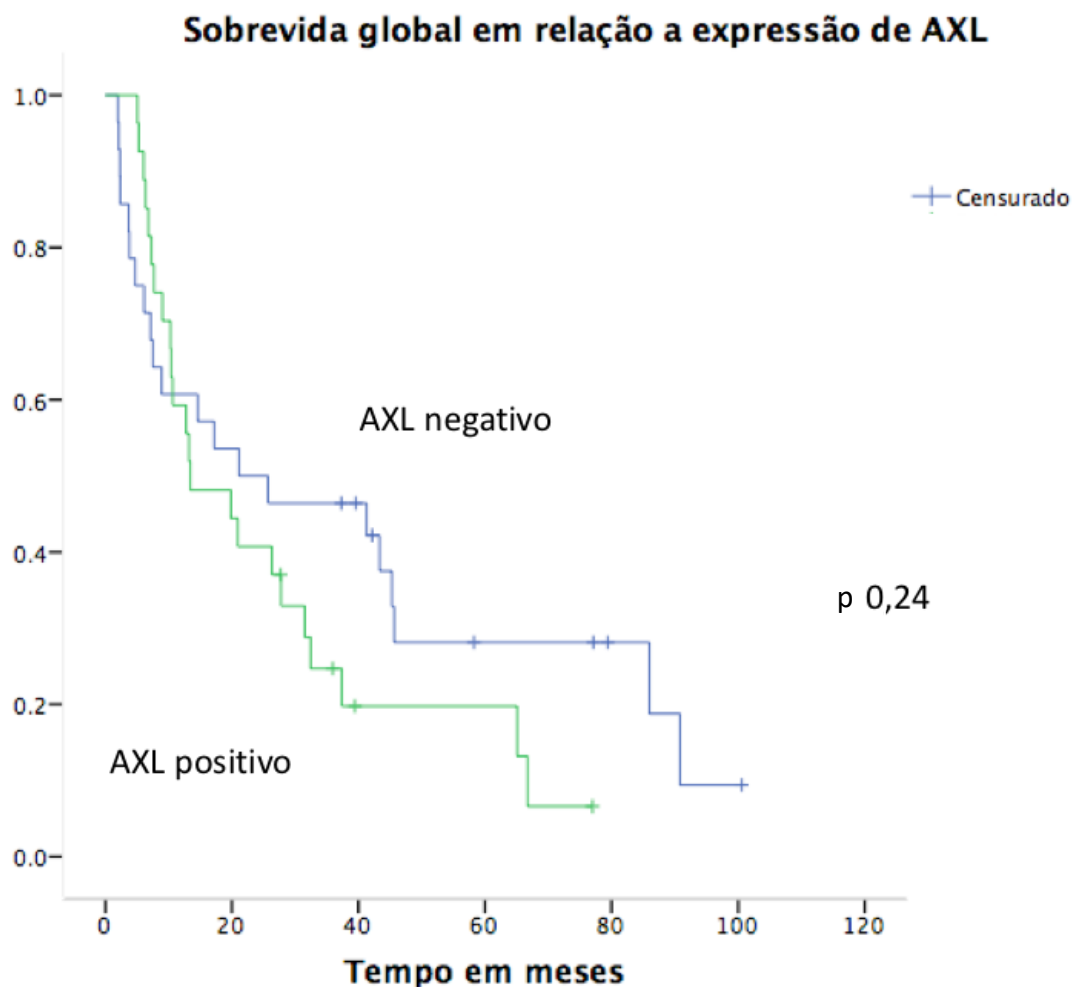


Figura 18 - Sobrevida global em relação à expressão de AXL em tecido tumoral renal em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos.

Posteriormente, selecionou-se as variáveis com p-valor < 0,2 e verificou-se a relação conjunta entre as características clínicas, demográficas e patológica dos pacientes e sua relação com a sobrevida através da regressão de Cox com múltiplas variáveis. As características clinicamente significantes que se correlacionam com uma pior sobrevida do paciente foram: idade  $\geq 57$  anos, ausência de nefrectomia, neutrofilia (neutrófilos  $\geq 7500 / \text{mm}^3$ ), anemia (hemoglobina < 14 g/mL) e mais de um sítio de metástase (tabela 14).

Tabela 14 - Associação de sobrevida global com características clínicas, demográficas e bioquímicas dos pacientes com carcinoma de células renais metastáticos.

Fatores de risco	p valor	Hazard ratio (IC 95%)
Idade > 57 anos	0,021	1,86 (1,09 - 3,15)
Ausência de Nefrectomia	<0,0001	2,91 (1,68 - 5,03)
Neutrofilia	<0,0001	3,96 (1,99 - 7,89)
Anemia	0,01	2,57 (1,26 - 5,26)
Mais que um sítio de metástase	0,001	2,39 (1,42 - 4,02)

Fez-se uma exceção em relação a análise multivariada devido a importância da variável AXL. Apesar desta variável não ser clinicamente significativa em análise univariada, com p valor de 0,24, devido a sua importância neste trabalho, foi analisado esta variável e sua relação com a sobrevida através da regressão de Cox com múltiplas variáveis com  $p < 0,02$  em análise univariada. Nesta avaliação a presença de AXL positivo comportou-se como um fator de mau prognóstico com p valor 0,035 e *hazard ratio* de 2,27 (IC 95% 1,06 – 4,85). Nota-se que são mantidas as outras variáveis de mal prognóstico, como idade  $\geq 57$  anos, ausência de nefrectomia, neutrofilia e mais que um sítio de metástase. Apenas a variável anemia não foi clinicamente significativa nestas associações (tabela 15). Demonstrando-se nesta análise a presença de AXL em tecido tumoral renal como fator de mal prognóstico, pelo método de imuno-histoquímica.

Tabela 15 - Associação de sobrevida global com características clínicas, demográficas e bioquímicas dos pacientes com carcinoma de células renais metastáticos.

<b>Fatores de risco</b>	<b>p valor</b>	<b>Hazard ratio (IC 95%)</b>
Idade $\geq$ 57 anos	0,009	2,62 (1,26-5,42)
Ausência de nefrectomia	<0,0001	6,45 (2,47-16,85)
Neutrófilos > 7500 /mm <sup>3</sup>	0,022	2,81 (1,15 - 6,81)
AXL positivo	0,034	2,27 (1,06 - 4,85)
Mais que um sítio de metástase	0,037	2,15 (1,04 - 4,43)

### 5.3.2 Subtipo células claras

A mesma análise de sobrevida com as mesmas variáveis, foi realizada apenas para os casos com a histologia células claras (tabela 16). As características clínicas, demográficas, laboratoriais e patológicas associadas com menor sobrevida e clinicamente significante com  $p < 0,2$  foram idade  $\geq$  57 anos, ausência de nefrectomia prévia, anemia (hemoglobina  $\leq$  14 g/dL), tempo entre o diagnóstico de câncer e o início do tratamento sistêmico  $\leq$  1 ano, mais que um sítio de metástase, presença de metástases ósseas e neste subgrupo de pacientes a presença de expressão de AXL em tecido tumoral renal foi associado a uma menor sobrevida, com  $p$  0,098. Pacientes com carcinoma de células renais tipo células claras com presença de expressão de AXL tiveram sobrevida global mediana de 13,4 meses (IC 95% 2,8 a 23,9 meses) e pacientes com ausência de expressão de AXL tiveram sobrevida global mediana de 41,2 meses (IC 95% 10,2 a 72,3 meses) (figura 19).

Tabela 16 - Análise univariada de sobrevida global mediana em relação as características demográficas, clínicas e patológicas, nos pacientes com carcinoma de células renais tipo células claras metastáticos.

Parâmetro	N de pacientes		Sobrevida global mediana (meses)	Log-rank p	
	Total	Mortos			
	Sexo				
	Masculino	53	41	11,7	0,70
	Feminino	25	22	8,5	
Idade					
	< 57 anos	39	27	30,9	0,01
	≥ 57 anos	39	36	18,2	
Nefrectomia					
	Sim	57	43	30,9	0,001
	Não	21	20	14,6	
Hemoglobina (g/dL)					
	> 14	20	12	43,3	0,027
	≤ 14	52	45	15,3	
Hipercalcemia					
	Não	18	16	12,7	0,93
	Sim	19	17	13,2	
Neutrófilos (/mm <sup>3</sup> )					
	≤ 7500	58	44	23,2	0,22
	> 7500	13	12	10,1	
Plaquetas					
	≤ 450.000	68	53	20,9	0,26*
	> 450.000	3	3	5,2	
KPS					
	> 70	50	39	21,1	0,27
	≤ 70	18	16	11,0	

(continua na próxima página...)

Tabela 16 (continuação) - Análise univariada de sobrevida global mediana em características demográficas, clínicas e patológicas, nos pacientes com carcinoma renais tipo células claras metastáticos.

Parâmetro	N de pacientes		Sobrevida global mediana (meses)	Log-rank p
	Total	Mortos		
N de sítios de metástase				
1 sítio	35	27	29,7	0,014
> 1 sítio	43	36	13,8	
Metástase óssea				
Não	48	36	30,9	0,015
Sim	30	27	13,2	
Metástase hepática				
Não	68	55	19,8	0,24
Sim	10	8	45,6	
Metástase SNC				
Não	74	59	21,1	0,23*
Sim	4	4	6,1	
Características sarcomatoide				
Não	74	60	21,1	0,51*
Sim	4	3	8,8	
AXL				
Negativo	24	17	41,2	0,098
Positivo	21	18	13	

\*teste de Fisher

### Sobrevida global em pacientes com carcinoma renal de células claras em relação a expressão de AXL

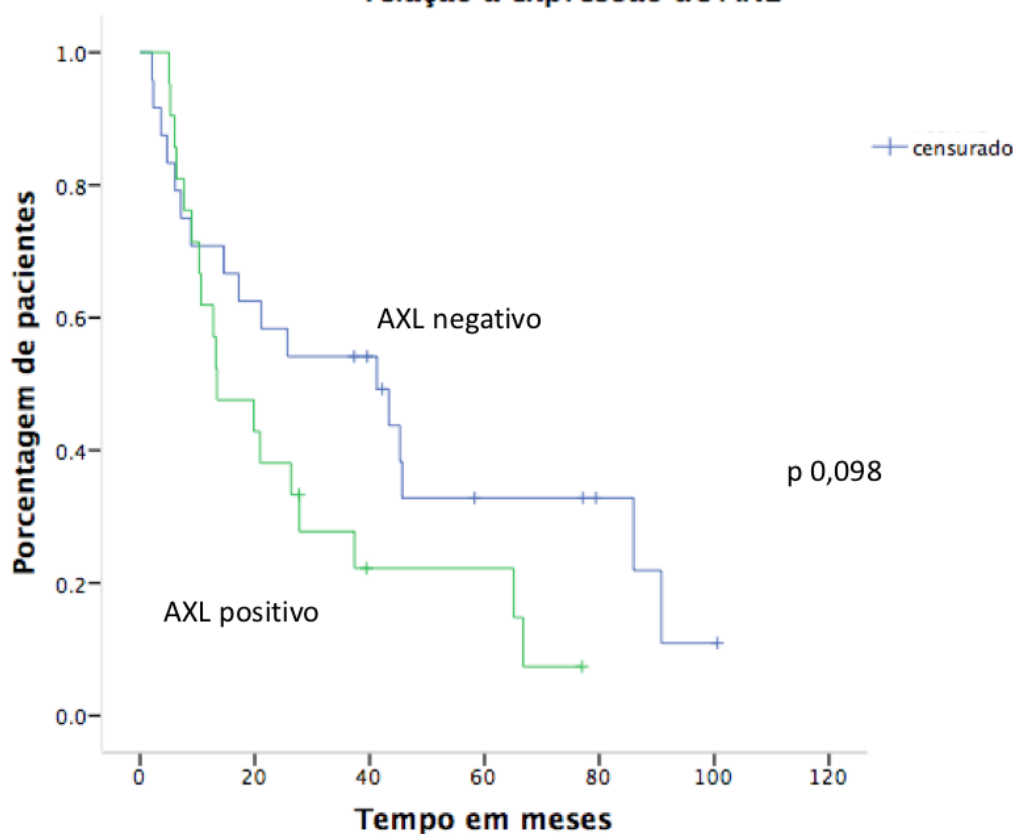


Figura 19 - Sobrevida global em relação à expressão de AXL em tecido tumoral renal em pacientes com carcinoma de células renais do subtipo células claras metastáticos.

No entanto, em regressão de Cox de múltiplas variáveis, AXL não obteve  $p < 0,05$ , sendo que apenas as variáveis que se correlacionaram com menor sobrevida foram idade  $\geq 57$  anos, ausência de nefrectomia e presença de mais de um sítio de metástase (tabela 17).

Tabela 17 - Associação de sobrevida global mediana com características clínicas, demográficas e bioquímicas dos pacientes com carcinoma de células renais do subtipo células claras metastáticos.

Fatores de risco	p valor	Hazard ratio (IC 95%)
Idade $\geq 57$ anos	0,034	1,75 (1,04 - 2,95)
Ausência de Nefrectomia	0,006	2,15 (1,24 - 3,73)
Maior que um sítio de metástase	0,021	1,85 (1,09 - 3,12)

Não foi realizada análise em separado dos subtipos não células claras devido a uma pequena quantidade de casos de diferentes histologias.

#### **5.4 Análise uni e multivariada da expressão de AXL com características clínicas e patológicas**

##### **5.4.1 Todos subtipos histológicos**

Posteriormente avaliou-se em toda coorte de pacientes independente da histologia a associação entre a frequência de expressão de AXL com quase todas as características demográficas, clínicas, bioquímicas e patológica testadas anteriormente para sobrevida global. Não foi avaliado ausência ou presença de nefrectomia prévia, por esta variável não estar associada diretamente com a presença ou ausência de expressão de nenhuma característica tumoral. Acrescentou-se, no entanto, a resposta ao tratamento com sunitinibe como variável. Realizou-se a análise univariada e subsequente análise multivariada para as variáveis com significância estatística. As variáveis que tiveram diferença estatística entre a expressão AXL foram idade, hemoglobina, KPS e resposta ao tratamento com sunitinibe (tabela 18). Em duas variáveis, o aumento da expressão de AXL em tecido tumoral renal foi relacionado com as características de menor sobrevida global em análise multivariada, ou seja, pacientes com idade  $\geq 57$  anos tiveram expressão positiva de AXL em tecido tumoral (56% ou 18 pacientes) quando comparado com ausência de expressão de AXL, pacientes com anemia (hemoglobina  $< 14$  g/dL) também tiveram expressão positiva de AXL (52% ou 23 pacientes) quando comparado com ausência de expressão de AXL. Apesar de clinicamente significativa, a ausência da expressão de AXL foi maior naqueles pacientes com KPS  $< 70$ , não havendo correlação com a sobrevida global destes pacientes. Interessante notar nesta análise univariada, a positividade de AXL foi relacionada com progressão da doença em relação ao uso de sunitinibe em quase 60% dos pacientes (21 pacientes) quando comparado com a ausência de expressão, podendo caracterizar a expressão positiva de AXL como um fator preditivo de mal prognóstico (figura 20).

Tabela 18 - Análise univariada da expressão de AXL em tecido tumoral renal em relação as características demográficas, clínicas e patológicas, nos pacientes com carcinoma de células renais metastáticos.

<b>Expressão de AXL em tecido tumoral renal em todos subtipos histológicos</b>				
<b>Variáveis</b>		<b>Negativo 34</b>	<b>Positivo 30</b>	<b>p valor</b>
<b>Sexo</b>				
	Masculino	20 (48%)	22 (52%)	0,223
	Feminino	14 (64%)	8 (36%)	
<b>Idade</b>				
	< 57 anos	20 (63%)	12 (38%)	0,133
	≥ 57 anos	14 (44%)	18 (56%)	
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>				
	> 14	12 (71%)	5 (29%)	0,10
	≤ 14	21 (48%)	23 (52%)	
<b>Hipercalcemia</b>				
	Não	9 (47%)	10 (53%)	0,71
	Sim	7 (54%)	6 (46%)	
<b>Neutrófilos (/mm<sup>3</sup>)</b>				
	≤ 7500	26 (51%)	25 (49%)	0,38
	> 7500	6 (67%)	3 (33%)	
<b>Plaquetas</b>				
	≤ 450.000	30 (54%)	26 (46%)	1*
	> 450.000	2 (50%)	2 (50%)	
<b>KPS</b>				
	> 70	20 (44%)	25 (56%)	0,060
	≤ 70	9 (75%)	3 (25%)	
<b>Tempo entre o diagnóstico de câncer e o início do tratamento sistêmico</b>				
	> 1 ano	13 (62%)	8 (38%)	0,28
	≤ 1 ano	20 (48%)	22 (52%)	

(continua na próxima página...)



Tabela 18 (continuação) - Análise univariada da expressão de AXL em tecido tumoral renal em relação as características demográficas, clínicas e patológicas, nos pacientes com carcinoma de células renais metastáticos.

Expressão de AXL em tecido tumoral renal em todos subtipos histológicos					
Variáveis	Negativo		Positivo		p valor
	34		30		
Número de sítios de metástases					
1 sítio	15	(58%)	11	(42%)	0,545
> 1 sítio	19	(50%)	19	(50%)	
Metástase hepática					
Não	27	(53%)	24	(47%)	0,95
Sim	7	(54%)	6	(46%)	
Metástase SNC					
Não	34	(55%)	28	(45%)	0,21*
Sim	0	(0%)	2	(100%)	
Tipo histológico					
Células claras	29	(57%)	22	(43%)	0,235
Não células claras	5	(38%)	8	(62%)	
Características sarcomatoide					
Não	32	(55%)	26	(45%)	0,40*
Sim	2	(33%)	4	(67%)	
Resposta ao tratamento com Sunitinibe					
Progressão	14	(40%)	21	(60%)	0,046
Estável, parcial ou completa	13	(68%)	6	(32%)	

\*teste de Fisher

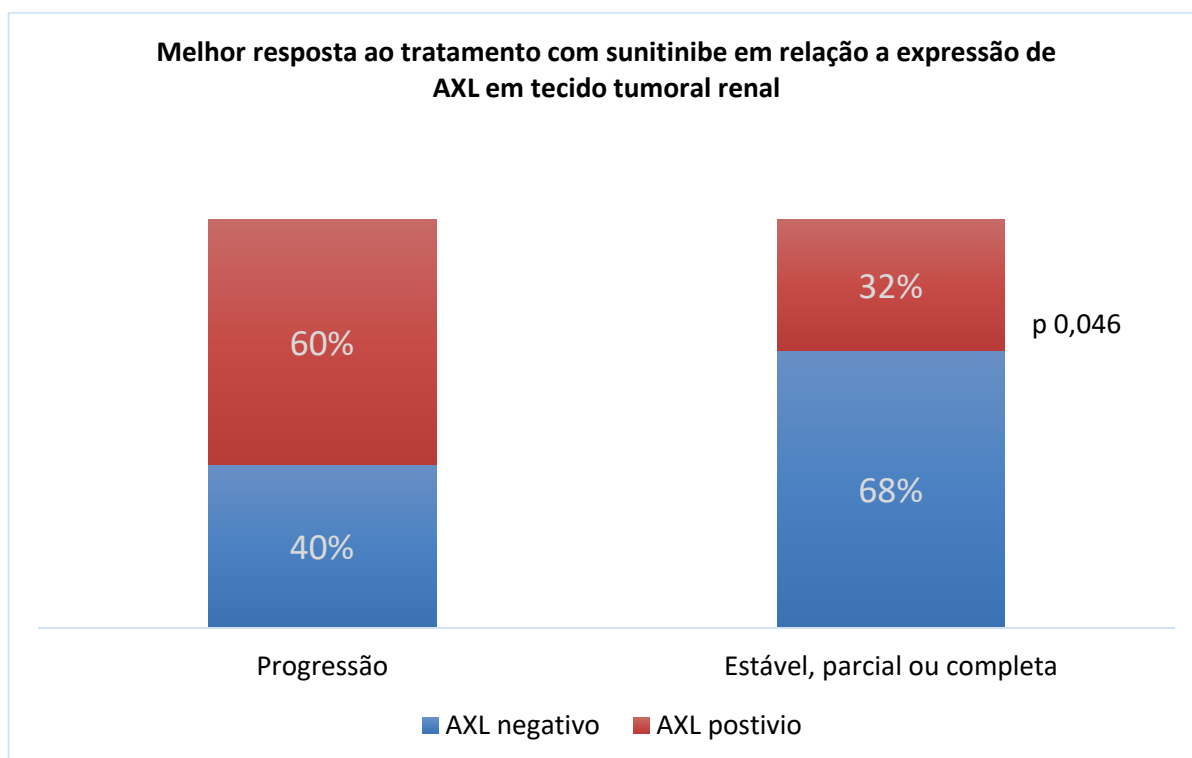


Figura 20 - Melhor resposta ao tratamento com sunitinibe em relação a expressão de AXL em tecido tumoral renal em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos.

No entanto, em análise multivariada, nenhuma das variáveis clinicamente significante em análise univariada, obteve  $p$  menor que 0,05. A variável “melhor resposta ao sunitinibe” apresentou  $p$  valor de 0,05, com *odd ratio* de 3,2 (IC 95% 0,99 a 10,58), clinicamente não significante.

#### 5.4.2 Subtipos células claras

Dividiu-se também os pacientes apenas com histologia células claras e fez análise univariada em relação a expressão de AXL em tecido tumoral de rim. As variáveis clinicamente significantes com  $p < 0,2$ , foram idade, hemoglobina, tempo entre o diagnóstico de câncer, metástase óssea e resposta ao tratamento com sunitinibe (tabela 19). Nesta análise a expressão positiva de AXL correlacionou-se apenas com uma variável que apresentou menor sobrevida global em análise multivariada, sendo a idade  $\geq 57$  anos, em 58% dos pacientes (14 pacientes) quando comparada com expressão negativa. Setenta e sete por cento (77%) dos pacientes (10 pacientes) com hemoglobina  $> 14$  g/dL apresentaram ausência de expressão de AXL quando comparados com expressão positiva, sendo que esta população de pacientes sem anemia ao diagnóstico apresentou maior

sobrevida global mediana. Duas variáveis que também em análise univariável apresentaram-se com menor sobrevida global também se correlacionaram com a expressão positiva de AXL, sendo que 74% dos pacientes (17 pacientes) com o tempo entre o diagnóstico de câncer e o início de tratamento sistêmico menor que 1 ano tinham AXL positivo e 63% dos pacientes (10 pacientes) com AXL positivo tinham presença de metástase óssea ao diagnóstico. Também no subgrupo de pacientes com células claras a positividade de AXL foi relacionada com progressão da doença em 62% dos pacientes (16 pacientes) quando comparado com a ausência de expressão, denotando mais uma vez que a expressão positiva de AXL pode estar relacionada como um fator preditivo de mal prognóstico e não de resposta ao sunitinibe.

Tabela 19 - Análise univariada da expressão de AXL em tecido tumoral renal em relação as características demográficas, clínicas e patológicas, nos pacientes com carcinoma de células renais metastáticos do subtipo células claras.

Variáveis	Expressão de AXL em tecido tumoral renal			p valor
	Negativo	Positivo		
Sexo				
	Masculino	17 (52%)	16 (48%)	0,29
	Feminino	12 (67%)	6 (33%)	
Idade				
	< 57 anos	19 (70%)	8 (30%)	0,039
	≥ 57 anos	10 (42%)	14 (58%)	
Hemoglobina (g/dL)				
	> 14	10 (77%)	3 (23%)	0,093
	≤ 14	18 (50%)	18 (50%)	
Hipercalemia				
	Não	7 (50%)	7 (50%)	1*
	Sim	5 (50%)	5 (50%)	
Neutróficos (/mm <sup>3</sup> )				
	< 7500	23 (56%)	18 (44%)	1*
	> 7500	4 (57%)	3 (43%)	
Plaquetas				
	≤ 450.000	26 (58%)	19 (42%)	0,57*
	> 450.000	1 (33%)	2 (67%)	

(continuação na próxima página...)

Tabela 19 (continuação) - Análise univariada da expressão de AXL em tecido tumoral renal em relação as características demográficas, clínicas e patológicas, nos pacientes com carcinoma de células renais metastáticos do subtipo células claras.

Variáveis	Expressão de AXL em tecido tumoral renal		p valor
	Negativo	Positivo	
KPS			
> 70	18 (50%)	18 (50%)	0,37
≤ 70	6 (67%)	3 (33%)	
Tempo entre o diagnóstico de câncer e o início do tratamento sistêmico			
> 1 ano	12 (71%)	5 (29%)	0,13
≤ 1 ano	6 (26%)	17 (74%)	
Número de sítios de metástases			
1 sítio	14 (61%)	9 (39%)	0,60
> 1 sítio	15 (54%)	13 (46%)	
Metástase óssea			
Não	23 (66%)	12 (34%)	0,059
Sim	6 (38%)	10 (63%)	
Metástase hepática			
Não	23 (56%)	18 (44%)	0,823
Sim	6 (60%)	4 (40%)	
Metástase SNC			
Não	29 (58%)	21 (42%)	0,43*
Sim	0 (0%)	1 (100%)	
Resposta ao tratamento com Sunitinibe			
Progressão	10 (38%)	16 (62%)	0,015
Estável, parcial ou completa	13 (76%)	4 (24%)	
Características Sarcomatoide			
Não	28 (60%)	19 (40%)	0,30
Sim	1 (25%)	3 (75%)	

Em análise multivariada dessas cinco variáveis estatisticamente significantes em análise univariada, demonstrou-se que associação da positividade da expressão de AXL em tecido tumoral renal foi significativa em duas variáveis naqueles pacientes com histologia células claras. Pacientes com idade  $\geq 57$  anos tinham 4,75 vezes mais chance de ter AXL positivo e presença de metástase óssea aumentava a chance de 4,78 vezes dos pacientes terem AXL positivo em tecido tumoral renal (tabela 20).

Tabela 20 - Análise multivariada da expressão de AXL em tecido tumoral renal em relação as características demográficas, clínicas e patológicas, nos pacientes com carcinoma de células renais metastáticos do subtipo células claras.

<b>Fator de risco</b>	<b>p valor</b>	<b>Hazard ratio (IC 95%)</b>
Idade $\geq 57$ anos	0,020	4,75 (1,2 - 17,7)
Presença de metástase óssea	0,029	4,78 (1,17 - 19,4)

Não foi realizada análise em separado dos subtipos não células claras devido a uma pequena quantidade de casos e diferentes histologias.

## 6. DISCUSSÃO

São escassos os relatos do perfil de pacientes Brasileiros com carcinoma de células renais metastáticos. Nesta coorte de pacientes tratados no Hospital do Câncer de Barretos no período de 2008 a 2013, as características demográficas da população foram semelhantes às relatadas em estudos internacionais<sup>2, 11</sup>. Nomeadamente, a incidência de carcinoma de células renais foi predominante no sexo masculino, com uma proporção homem:mulher de 2:1. A idade média ao diagnóstico foi de 57 anos, um pouco inferior aos dados americanos, o qual os pacientes têm idade média ao diagnóstico de 64 anos. Em relação ao subtipo histológico, também no nosso estudo o carcinoma de células claras foi a histologia mais comum, com aproximadamente 82% (93 pacientes) dos casos, estando em concordância com trabalhos anteriores<sup>2, 3</sup>, que apresentam uma variação entre 75% e 85%. Mesmo o subtipo papilar, o qual na nossa coorte teve incidência de 8% de todos os casos, foi semelhante a dados internacionais (10%)<sup>3, 20</sup>.

Nos últimos anos, pacientes com carcinoma de células renais metastático vem apresentando melhora na sobrevida global, principalmente após o advento de medicações que inibem os receptores tirosina quinase (TKI) responsáveis principalmente pela angiogênese, como é o caso do sunitinibe<sup>32</sup>. Antes da era dos TKI, em 1999, Motzar e colegas, propuseram um escore prognóstico baseados em dados clínicos e laboratoriais que dividiam os pacientes com carcinoma de células renais metastáticos tratados com interferon-alfa em três subgrupos, bom prognóstico, prognóstico intermediário e prognóstico ruim. Estes pacientes apresentavam sobrevida global mediana de 20 meses, 10 meses e 4 meses, respectivamente, com sobrevida global mediana de 10 meses<sup>30</sup>. Em 2009, Heng e colegas<sup>27</sup>, propuseram novo escore prognóstico, usando quatro fatores de risco semelhantes daquelas usadas pelo trabalho de Motzar, sendo eles, anemia, hipercalcemia, KPS  $\leq$  70, tempo entre o diagnóstico de câncer de rim e o início do tratamento sistêmico para doença metastática menor que um ano, e acrescentando dois novos fatores bioquímicos, neutrofilia e plaquetose, porém mantendo as mesmas divisões dos subgrupos, sendo que todos os pacientes tinham sido expostos ao uso de algum inibidor tirosina quinase. Apesar de serem estudos e populações distintas, nota-se um aumento considerável na sobrevida global mediana, de 10 meses para 24 meses, além de um aumento na sobrevida em todos os subgrupos, sendo que o grupo de bom prognóstico a

sobrevida global mediana foi de 43 meses, no grupo de prognóstico intermediário a sobrevida foi de 27 meses, e no grupo de prognóstico ruim, a sobrevida foi de 8 meses<sup>32</sup>.

Poucos dados de sobrevida usando escores prognósticos validados de pacientes com câncer de rim metastáticos foram confirmados em população brasileira, principalmente em uma instituição com atendimento SUS. Neste estudo não foi possível classificar 60% dos pacientes em nenhum grupo de risco, devido principalmente a falta de coleta de cálcio sérico pré-tratamento, além de não ter sido possível calcular a sobrevida global mediana do subgrupo de bom prognóstico, por este apresentar apenas dois pacientes. No entanto, constatamos que a sobrevida dos subgrupos de prognóstico intermediário e prognóstico ruim são um pouco inferiores daquelas publicadas por Heng, porém superiores daquelas apresentadas por Motzar, sendo que em nosso estudo a sobrevida global mediana para prognóstico intermediário foi de 21,1 meses (IC 95% 7,1 – 35 meses), sendo estatisticamente superior ( $p= 0,047$ ) ao do grupo de prognóstico ruim (7,6 meses, IC 95% 2,5-12,8 meses). Mesmo a sobrevida global mediana desta população foi de 19,1 meses (IC 95% 10,7 – 28,9 meses), um pouco inferior a sobrevida publicada por Heng em 2009, de 24 meses, porém bastante superior àquela publicada por Motzar (10 meses) em 1999, em uma época que não se dispunha de inibidores tirosina quinase. Portanto, em uma instituição que atende 100% SUS, no qual a primeira linha de tratamento é um inibidor de tirosina quinase desde 2008, a sobrevida global mediana de pacientes com carcinoma de células renais metastáticas se assemelha com sobrevida de estudo internacional de uma coorte de mais de 600 pacientes<sup>27</sup>. Importante ressaltar que no Brasil a caixa com 28 comprimidos do sunitinibe custa em torno R\$ 16.550,00<sup>74</sup>, lembrando que um ciclo de tratamento com 28 comprimidos corresponde a 42 dias, e em contrapartida tem-se que pelo manual de procedimentos do SUS o valor repassado por paciente ao mês com carcinoma de rim é de R\$ 571,50<sup>75</sup>. No estado de São Paulo, o medicamento sunitinibe é fornecido aos pacientes com carcinoma de células renais desde 2008 pela Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo<sup>76</sup>. Além disso, um dos motivos que tornaram possível a avaliação da sobrevida global mediana estratificada por grupos prognósticos no Hospital do Câncer de Barretos foi a criação do subgrupo de Onco-Urologia. Com a criação deste grupo especializado em doenças oncológicas do trato gênito-urinário a avaliação do paciente pré-tratamento melhorou, como se viu no aumento clinicamente significativo da coleta de cálcio sérico após 2012, essencial na classificação prognóstica tanto de Heng quanto de Motzar.

Para avaliação mais detalhada desta série em relação as características demográficas, clínicas e bioquímicas com a sobrevida global, independente do subtipo histológico, foram realizadas análises univariadas das diferentes variáveis descritas em trabalhos anteriores<sup>27, 29, 30, 73</sup>. Em sintonia com os relatos prévios, no nosso estudo essas variáveis também se associaram com um pior prognóstico de pacientes com carcinoma de células renais. Quando compara-se com as análises univariadas usadas por Heng e colegas para elaboração do escore prognóstico, temos que os fatores que foram estatisticamente significantes nas duas coortes e que se relacionaram a uma pior sobrevida global foram: ausência de nefrectomia prévia, KPS  $\leq$  70, tempo entre o diagnóstico da doença de rim e o início do tratamento sistêmico  $\leq$  1 ano, presença de mais de um sítio de metástase, presença de metástase em sistema nervoso central, presença de anemia, neutrofilia e plaquetose ao diagnóstico de metástase, características sarcomatoides do tumor e histologia não células claras. No nosso estudo identificamos duas variáveis que foram clinicamente significantes e que não estão descritas em nenhum modelo prognóstico ou análise univariada de outros trabalhos, que foram idade  $\geq$  57 anos e presença de metástases ósseas. Quando realizado regressão de Cox dessas múltiplas variáveis, observa-se que quatro variáveis clinicamente significantes no nosso estudo estão presentes em outros modelos prognósticos e que determinam piora na sobrevida global que são: ausência de nefrectomia, mais que um sítio de metástase, neutrofilia e anemia ao diagnóstico de metástase. Inclusive neutrofilia e anemia fazem parte dos fatores de Heng e Motzar, os quais determinam em qual subgrupo o paciente fará parte. Nesta nossa coorte de pacientes a idade  $\geq$  57 anos foi um importante fator de mau prognóstico, sendo o primeiro estudo no qual a variável idade apresenta significância clínica em relação a sobrevida<sup>32</sup>.

Neste trabalho foi otimizada a metodologia e avaliado a expressão imuno-histoquímica de AXL em tecidos renais de pacientes diagnosticados com carcinoma de células renais para melhor entendimento do comportamento desta proteína. Encontramos a presença de AXL em 34% de tecido normal, 46% em tecido tumoral, e em 37% em tecido metastático. Não houve diferença de expressão de AXL em qualquer dos tecidos tanto de tecido renal normal, quanto de tecido renal tumoral e de tecido metastático entre células claras e não claras. Ainda em relação a expressão de AXL em diferentes tecidos não se conseguiu avaliar nesta coorte de pacientes que quanto mais indiferenciado o tecido mais positivo seria sua expressão. Em 9 casos onde tinha-se tecido renal normal e tumoral e também tecido metastático de um mesmo paciente, não se pode observar uma ordem



crescente de positividade entre tecido normal renal para tecido tumoral de rim e posteriormente para tecido metastático. Em relação a expressão de AXL entre os diferentes tipos de tecido, não houve diferença estatística quando comparado a expressão de tecido renal normal com tecido renal tumoral, e também não houve diferença quando comparado a expressão de tecido renal tumoral com tecido metastático. Em 41 pacientes que se tinha tecido renal normal e tumoral houve uma tendência de aumento da positividade de AXL, de 37% para 56%, do primeiro para o segundo, porém sem significância estatística. O mesmo ocorreu para 14 pacientes que se tinha tecido renal tumoral e tecido metastático. Pode-se observar uma tendência de aumento de positividade do tecido renal tumoral para tecido metastático, de 36% para 50%, porém sem significância estatística.

Em seguida, avaliamos o impacto clínico-patológico da expressão de AXL nesta coorte. Em análise univariada, a expressão de AXL em tecido tumoral não foi estatisticamente significativa, no entanto, observamos que aqueles pacientes que tem expressão aumentada de AXL tem uma menor sobrevida. Os nossos resultados estão de acordo com os trabalhos recentes de Rankin et al<sup>56</sup> e Gustafsson et al<sup>66</sup>, no qual a expressão aumenta de AXL confere ao paciente com carcinoma de células renais um pior prognóstico. Portanto, pela importância prognóstico da expressão de AXL, fez-se um exceção e foi realizado regressão de Cox de múltiplas variáveis com inclusão de AXL. Neste modelo mostramos que a expressão aumentada de AXL foi estatisticamente significativa, com *hazard ratio* de 2,27 (IC 95% 1,06 – 5,85), sendo associada com outras variáveis de pior prognóstico, como idade  $\geq$  57 anos, ausência de nefrectomia, neutrofilia e mais que um sítio de metástase. Esses achados apontam a importância da expressão de AXL em tecido tumoral renal como fator prognóstico ruim em pacientes com câncer de rim metastáticos.

Quando se separa apenas os pacientes com subtipo células claras, a expressão de AXL parece ganhar uma importância maior em relação ao prognóstico desses pacientes. Em análise univariada, pacientes com expressão positiva de AXL em tecido tumoral renal tiveram menor sobrevida quando comparado com aqueles pacientes com expressão negativa, sendo esta variável clinicamente significativa. Pacientes com imuno-positividade para AXL tiveram sobrevida global mediana de 13 meses em contraste com o aumento de sobrevida global de pacientes com ausência de AXL (mediana de 41,2 meses). Interessantemente, a ativação da proteína AXL foi relacionado diretamente com a deficiência de VHL, sendo ativada por HIF-1 e HIF-2, vias importantes nos pacientes com carcinoma renal tipo células claras<sup>56</sup>. Estudos *in vitro* mais recentes vêm demonstrando que

o uso crônico de sunitinibe em tecido tumoral renal induz a super-expressão de AXL, tornando um tecido mais agressivo e também resistente a essa medicação<sup>77-79</sup>. Além disso, um estudo importante reportou que o silenciamento gênico ou farmacológico (através de cabozantinibe - um potente inibidor multi tirosina quinase, especialmente de AXL e MET) de AXL, reverte a resistência ao sunitinibe<sup>77</sup>. Em 2015, Chouieri e colegas conduziram um estudo fase III, e observaram que o uso de cabozantinibe como segunda linha de tratamento de carcinoma de células renais tipo células claras após uso de TKI aumenta a sobrevida livre de progressão nestes pacientes quando comparado com everolimo. O aumento de sobrevida livre de progressão de 7,4 meses no braço do cabozantinibe versus 3,8 meses no braço do everolimo, foi acompanhado de aumento significativo na taxa de resposta (21% versus 5%,  $p < 0,001$ ), porém com efeitos adversos importantes<sup>80</sup>. Estes dados demonstram o importante papel do receptor tirosina quinase AXL no prognóstico e terapêutica de pacientes com carcinoma de células renais metastático do tipo células claras.

Dando continuidade as avaliações univariadas dos pacientes com carcinoma de células renais do subtipo células claras, observa-se que outros fatores também apresentaram importância prognóstica, e foram clinicamente significantes, como idade  $\geq 57$  anos, ausência de nefrectomia, anemia, tempo entre o diagnóstico de câncer e o início de tratamento sistêmico  $\leq 1$  ano, presença de mais que um sítio de metástase e metástase óssea. Após regressão de Cox de múltiplas variáveis, mais uma vez, os fatores que indicaram pior prognóstico nesta coorte, desta vez em pacientes com carcinoma de células renais do subtipo células claras, foram idade  $\geq 57$  anos, ausência de nefrectomia, e presença de mais de um sítio de metástase. A expressão positiva de AXL não foi clinicamente significativa em análise multivariada, podendo ser o baixo número de casos como um dos motivos para este resultado.

Analisou-se posteriormente a expressão de AXL em tecido tumoral renal com as diferentes características demográficas, clínicas, bioquímicas e patológicas em todos os subtipos histológicos testadas anteriormente para sobrevida global. Retirou-se a variável ausência ou presença de nefrectomia por não estar associada a expressão de nenhuma característica tumoral e acrescentou-se resposta ao tratamento com sunitinibe como variável. Pode-se confirmar nas variáveis clinicamente significantes em análise univariada que a expressão de AXL em tecido tumoral renal mantém associação com a sobrevida global dos diferentes fatores avaliados. Nota-se que a progressão ao uso de sunitinibe esteve

associado a positividade da expressão de AXL, denotando mais um papel prognóstico do que preditivo de resposta dessa proteína.

Quando feita análise univariada da expressão de AXL em tecido tumoral renal com as diferentes variáveis somente nos pacientes com subtipo células claras, nota-se que houve um aumento de fatores clinicamente significante que se correlacionaram com a expressão de AXL. Além da idade, anemia e progressão ao uso de sunitinibe, o tempo entre o diagnóstico de câncer de rim e o início do tratamento sistêmico  $\leq 1$  ano e presença de metástases ósseas se correlacionaram com a positividade de expressão de AXL em tecido tumoral renal. Em análise multivariada a expressão positiva de AXL em tecido tumoral renal em pacientes com carcinoma de células claras se correlacionou com idade  $\geq 57$  anos e presença de metástase óssea.

Em resumo, os achados da presente dissertação sugerem que a inclusão da avaliação imuno-histoquímica de AXL em rotina laboratorial, pode contribuir para uma melhor estratificação prognóstica destes pacientes.

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu caracterizar as principais variáveis epidemiológica, clínicas e anátomo-patológicas de uma coorte de 114 pacientes com carcinoma de células renais metastáticos tratados com sunitinibe no Hospital do Câncer de Barretos entre 2008 e 2013. Os achados evidenciaram um perfil semelhante ao descrito na literatura internacional, tal como maior frequência em homens, idade avançada de diagnóstico, preponderância do subtipo de células claras. A sobrevida global mediana da população foi de 19,1 meses, e os critérios de Heng foram também importantes para sub-classificar os distintos grupos de risco.

Após uma revisão histopatológica de acordo com os novos critérios da ISUP, confecção de TMA e otimização da reação de imuno-histoquímica de AXL, avaliamos a sua expressão em tecido renal normal, tumoral e metastático. Apesar de um aumento da expressão da positividade de AXL de tecido mais diferenciado para tecido menos diferenciado, ou seja, de tecido renal normal para tecido renal tumoral e posteriormente para tecido metastático, esse aumento não foi significativo. Não foi observada diferença de expressão entres os subtipos histológicos.

Após análise multivariada de sobrevida global, verificamos que a expressão de AXL está associada a uma pior sobrevida global, independente do subtipo histológico, juntamente com idade  $\geq 57$  anos, ausência de nefrectomia, neutroflia e mais que um sítio de metástase.

Concluindo, neste estudo demonstramos a importância da expressão imuno-histoquímica de AXL em tecido tumoral renal como fator prognóstico em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos.

## REFERÊNCIAS

1. Cho E, Adami HO, Lindblad P. *Epidemiology of renal cell cancer*. **Hematol Oncol Clin North Am**. 2011;25(4):651-65.
2. Eble JN SG, Epstein JI, et al (eds). In: Pathology and genetics of tumours of the urinary, systemand male genital organs. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC P, 2004.
3. Srigley JR, Delahunt B, Eble JN, Egevad L, Epstein JI, Grignon D, et al. *The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia*. **Am J Surg Pathol**. 2013;37(10):1469-89.
4. Karumanchi SA, Merchan J, Sukhatme VP. *Renal cancer: molecular mechanisms and newer therapeutic options*. **Curr Opin Nephrol Hypertens**. 2002;11(1):37-42.
5. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. *Global cancer statistics*. **CA Cancer J Clin**. 2011;61(2):69-90.
6. *International Agency for Research on Cancer*. [Internet] Lyon2016 [cited 2016];Available from: <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>.
7. Lipworth L, Tarone RE, McLaughlin JK. *The epidemiology of renal cell carcinoma*. **J Urol**. 2006;176(6 Pt 1):2353-8.
8. Clague J, Lin J, Cassidy A, Matin S, Tannir NM, Tamboli P, et al. *Family history and risk of renal cell carcinoma: results from a case-control study and systematic meta-analysis*. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2009;18(3):801-7.
9. Pavlovich CP, Schmidt LS. *Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma*. **Nat Rev Cancer**. 2004;4(5):381-93.
10. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. *The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours*. **European urology**. 2016;70(1):93-105.
11. *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*. [Internet] Bethesda2016 [cited 2016];Available from: <http://seer.cancer.gov>.
12. Jacobs SC, Berg SI, Lawson RK. *Synchronous bilateral renal cell carcinoma: total surgical excision*. **Cancer**. 1980;46(11):2341-5.
13. Presti JC, Jr., Rao PH, Chen Q, Reuter VE, Li FP, Fair WR, et al. *Histopathological, cytogenetic, and molecular characterization of renal cortical tumors*. **Cancer Res**. 1991;51(5):1544-52.
14. Zbar B, Brauch H, Talmadge C, Linehan M. *Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma*. **Nature**. 1987;327(6124):721-4.

15. Beroukhim R, Brunet JP, Di Napoli A, Mertz KD, Seeley A, Pires MM, et al. *Patterns of gene expression and copy-number alterations in von-hippel lindau disease-associated and sporadic clear cell carcinoma of the kidney.* **Cancer Res.** 2009;69(11):4674-81.
16. Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, Durocher JA, Mahurkar S, Zaridze D, et al. *Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors.* **Clin Cancer Res.** 2008;14(15):4726-34.
17. Sakashita N, Takeya M, Kishida T, Stackhouse TM, Zbar B, Takahashi K. *Expression of von Hippel-Lindau protein in normal and pathological human tissues.* **Histochem J.** 1999;31(2):133-44.
18. Ohh M, Kaelin WG, Jr. *The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: new perspectives.* **Mol Med Today.** 1999;5(6):257-63.
19. George DJ, Kaelin WG, Jr. *The von Hippel-Lindau protein, vascular endothelial growth factor, and kidney cancer.* **N Engl J Med.** 2003;349(5):419-21.
20. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.* **Nature.** 1999;399(6733):271-5.
21. del Vecchio MT, Lazzi S, Bruni A, Mangiavacchi P, Cevenini G, Luzi P. *DNA ploidy pattern in papillary renal cell carcinoma. Correlation with clinicopathological parameters and survival.* **Pathol Res Pract.** 1998;194(5):325-33.
22. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S, et al. *Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma.* **J Clin Oncol.** 2009;27(22):3584-90.
23. Delahunt B, Cheville JC, Martignoni G, Humphrey PA, Magi-Galluzzi C, McKenney J, et al. *The International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for renal cell carcinoma and other prognostic parameters.* **Am J Surg Pathol.** 2013;37(10):1490-504.
24. Jiang F, Richter J, Schraml P, Bubendorf L, Gasser T, Sauter G, et al. *Chromosomal imbalances in papillary renal cell carcinoma: genetic differences between histological subtypes.* **Am J Pathol.** 1998;153(5):1467-73.
25. Contractor H, Zariwala M, Bugert P, Zeisler J, Kovacs G. *Mutation of the p53 tumour suppressor gene occurs preferentially in the chromophobe type of renal cell tumour.* **J Pathol.** 1997;181(2):136-9.
26. Speicher MR, Schoell B, du Manoir S, Schrock E, Ried T, Cremer T, et al. *Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization.* **Am J Pathol.** 1994;145(2):356-64.
27. Heng DY, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, et al. *Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with*

*vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study.* **J Clin Oncol.** 2009;27(34):5794-9.

28. Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML. *Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma.* **Am J Surg Pathol.** 2003;27(5):612-24.

29. Choueiri TK, Garcia JA, Elson P, Khasawneh M, Usman S, Golshayan AR, et al. *Clinical factors associated with outcome in patients with metastatic clear-cell renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted therapy.* **Cancer.** 2007;110(3):543-50.

30. Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M. *Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma.* **J Clin Oncol.** 2002;20(1):289-96.

31. Patard JJ, Leray E, Cindolo L, Ficarra V, Rodriguez A, De La Taille A, et al. *Multi-institutional validation of a symptom based classification for renal cell carcinoma.* **J Urol.** 2004;172(3):858-62.

32. Heng DY, Xie W, Regan MM, Harshman LC, Bjarnason GA, Vaishampayan UN, et al. *External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: a population-based study.* **Lancet Oncol.** 2013;14(2):141-8.

33. Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, et al. *EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update.* **Eur Urol.** 2010;58(3):398-406.

34. Culp SH, Tannir NM, Abel EJ, Margulis V, Tamboli P, Matin SF, et al. *Can we better select patients with metastatic renal cell carcinoma for cytoreductive nephrectomy?* **Cancer.** 2010;116(14):3378-88.

35. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation.* **Cell.** 2011;144(5):646-74.

36. Singer EA, Gupta GN, Marchalik D, Srinivasan R. *Evolving therapeutic targets in renal cell carcinoma.* **Curr Opin Oncol.** 2013;25(3):273-80.

37. Le Tourneau C, Raymond E, Faivre S. *Sunitinib: a novel tyrosine kinase inhibitor. A brief review of its therapeutic potential in the treatment of renal carcinoma and gastrointestinal stromal tumors (GIST).* **Ther Clin Risk Manag.** 2007;3(2):341-8.

38. Faivre S, Delbaldo C, Vera K, Robert C, Lozahic S, Lassau N, et al. *Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer.* **J Clin Oncol.** 2006;24(1):25-35.

39. Motzer RJ, Rini BI, Bukowski RM, Curti BD, George DJ, Hudes GR, et al. *Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma.* **JAMA.** 2006;295(21):2516-24.

40. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, et al. *Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma*. **N Engl J Med**. 2007;356(2):115-24.
41. Chartier M, Chenard T, Barker J, Najmanovich R. *Kinome Render: a stand-alone and web-accessible tool to annotate the human protein kinome tree*. **PeerJ**. 2013;1:e126.
42. Schlessinger J. *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. **Cell**. 2000;103(2):211-25.
43. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. *The protein tyrosine kinase family of the human genome*. **Oncogene**. 2000;19(49):5548-57.
44. Blume-Jensen P, Hunter T. *Oncogenic kinase signalling*. **Nature**. 2001;411(6835):355-65.
45. Paccetz JD, Vogelsang M, Parker MI, Zerbini LF. *The receptor tyrosine kinase Axl in cancer: biological functions and therapeutic implications*. **Int J Cancer**. 2014;134(5):1024-33.
46. Tang H, Chen S, Wang H, Wu H, Lu Q, Han D. *TAM receptors and the regulation of erythropoiesis in mice*. **Haematologica**. 2009;94(3):326-34.
47. Hafizi S, Dahlback B. *Gas6 and protein S. Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily*. **FEBS J**. 2006;273(23):5231-44.
48. Goruppi S, Ruaro E, Schneider C. *Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts*. **Oncogene**. 1996;12(3):471-80.
49. Axelrod H, Pienta KJ. *Axl as a mediator of cellular growth and survival*. **Oncotarget**. 2014;5(19):8818-52.
50. Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK. *TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer*. **Adv Cancer Res**. 2008;100:35-83.
51. Holland SJ, Powell MJ, Franci C, Chan EW, Frieria AM, Atchison RE, et al. *Multiple roles for the receptor tyrosine kinase axl in tumor formation*. **Cancer Res**. 2005;65(20):9294-303.
52. O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, et al. *axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase*. **Mol Cell Biol**. 1991;11(10):5016-31.
53. Budagian V, Bulanova E, Orinska Z, Duitman E, Brandt K, Ludwig A, et al. *Soluble Axl is generated by ADAM10-dependent cleavage and associates with Gas6 in mouse serum*. **Mol Cell Biol**. 2005;25(21):9324-39.



54. Balogh I, Hafizi S, Stenhoff J, Hansson K, Dahlback B. *Analysis of Gas6 in human platelets and plasma*. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2005;25(6):1280-6.
55. Gallicchio M, Mitola S, Valdembri D, Fantozzi R, Varnum B, Avanzi GC, et al. *Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated endothelial cell activation by Axl tyrosine kinase receptor*. **Blood**. 2005;105(5):1970-6.
56. Rankin EB, Fuh KC, Castellini L, Viswanathan K, Finger EC, Diep AN, et al. *Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2014;111(37):13373-8.
57. Keating AK, Kim GK, Jones AE, Donson AM, Ware K, Mulcahy JM, et al. *Inhibition of Mer and Axl receptor tyrosine kinases in astrocytoma cells leads to increased apoptosis and improved chemosensitivity*. **Mol Cancer Ther**. 2010;9(5):1298-307.
58. Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, Nabioullin R, Ponugoti AH, Wiedemeyer R, et al. *Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies*. **Science**. 2007;318(5848):287-90.
59. Hutterer M, Knyazev P, Abate A, Reschke M, Maier H, Stefanova N, et al. *Axl and growth arrest-specific gene 6 are frequently overexpressed in human gliomas and predict poor prognosis in patients with glioblastoma multiforme*. **Clin Cancer Res**. 2008;14(1):130-8.
60. Vajkoczy P, Knyazev P, Kunkel A, Capelle HH, Behrndt S, von Tengg-Kobligk H, et al. *Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2006;103(15):5799-804.
61. Ito T, Ito M, Naito S, Ohtsuru A, Nagayama Y, Kanematsu T, et al. *Expression of the Axl receptor tyrosine kinase in human thyroid carcinoma*. **Thyroid**. 1999;9(6):563-7.
62. Berclaz G, Altermatt HJ, Rohrbach V, Kieffer I, Dreher E, Andres AC. *Estrogen dependent expression of the receptor tyrosine kinase axl in normal and malignant human breast*. **Ann Oncol**. 2001;12(6):819-24.
63. Wu CW, Li AF, Chi CW, Lai CH, Huang CL, Lo SS, et al. *Clinical significance of AXL kinase family in gastric cancer*. **Anticancer Res**. 2002;22(2B):1071-8.
64. Jacob AN, Kalapurakal J, Davidson WR, Kandpal G, Dunson N, Prashar Y, et al. *A receptor tyrosine kinase, UFO/Axl, and other genes isolated by a modified differential display PCR are overexpressed in metastatic prostatic carcinoma cell line DU145*. **Cancer Detect Prev**. 1999;23(4):325-32.
65. Chung BI, Malkowicz SB, Nguyen TB, Libertino JA, McGarvey TW. *Expression of the proto-oncogene Axl in renal cell carcinoma*. **DNA Cell Biol**. 2003;22(8):533-40.
66. Gustafsson A, Martuszewska D, Johansson M, Ekman C, Hafizi S, Ljungberg B, et al. *Differential expression of Axl and Gas6 in renal cell carcinoma reflecting tumor advancement and survival*. **Clin Cancer Res**. 2009;15(14):4742-9.

67. Yu H, Liu R, Ma B, Li X, Yen HY, Zhou Y, et al. *Axl receptor tyrosine kinase is a potential therapeutic target in renal cell carcinoma*. **Br J Cancer**. 2015;113(4):616-25.
68. Sun W, Fujimoto J, Tamaya T. *Coexpression of Gas6/Axl in human ovarian cancers*. **Oncology**. 2004;66(6):450-7.
69. Garcia-Donas J, Rodriguez-Antona C, Jonasch E. *Molecular markers to predict response to therapy*. **Semin Oncol**. 2013;40(4):444-58.
70. Martinho O, Silva-Oliveira R, Miranda-Goncalves V, Clara C, Almeida JR, Carvalho AL, et al. *In Vitro and In Vivo Analysis of RTK Inhibitor Efficacy and Identification of Its Novel Targets in Glioblastomas*. **Transl Oncol**. 2013;6(2):187-96.
71. Martinho O, Zucca LE, Reis RM. *AXL as a modulator of sunitinib response in glioblastoma cell lines*. **Exp Cell Res**. 2015;332(1):1-10.
72. D'Alfonso TM, Hannah J, Chen Z, Liu Y, Zhou P, Shin SJ. *Axl receptor tyrosine kinase expression in breast cancer*. **J Clin Pathol**. 2014;67(8):690-6.
73. Negrier S, Escudier B, Gomez F, Douillard JY, Ravaud A, Chevreau C, et al. *Prognostic factors of survival and rapid progression in 782 patients with metastatic renal carcinomas treated by cytokines: a report from the Groupe Francais d'Immunotherapie*. **Ann Oncol**. 2002;13(9):1460-8.
74. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [Internet] Brasília2016 [cited 2016];Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/listas-de-precos>.
75. [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=492](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=492). [Internet] Rio de Janeiro2016 [cited 2016];Available from: <http://www.inca.gov.br/>.
76. <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/esclarecimento-secretaria-da-saude-garante-que-ja-regularizou-a-distribuicao-da-vacina-onco-bcg/391/8/>. [Internet] São Paulo2016 [cited 2016];Available from: <http://www.oncoguia.org.br/>.
77. Zhou L, Liu XD, Sun M, Zhang X, German P, Bai S, et al. *Targeting MET and AXL overcomes resistance to sunitinib therapy in renal cell carcinoma*. **Oncogene**. 2016;35(21):2687-97.
78. Qu L, Ding J, Chen C, Wu ZJ, Liu B, Gao Y, et al. *Exosome-Transmitted IncARSR Promotes Sunitinib Resistance in Renal Cancer by Acting as a Competing Endogenous RNA*. **Cancer Cell**. 2016;29(5):653-68.
79. van der Mijn JC, Broxterman HJ, Knol JC, Piersma SR, De Haas RR, Dekker H, et al. *Sunitinib activates Axl signaling in renal cell cancer*. **Int J Cancer**. 2016;138(12):3002-10.
80. Choueiri TK, Escudier B, Powles T, Mainwaring PN, Rini BI, Donskov F, et al. *Cabozantinib versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma*. **N Engl J Med**. 2015;373(19):1814-23.

## ANEXOS

### Anexo A – Estadiamento do câncer de rim

American Joint Committee on Cancer (AJCC) – Sistema de classificação TNM para câncer de rim 7 edição (2010)

Tumor primário(T)

TX Tumor primário não pode ser avaliado

T0 Sem evidência de tumor primário

T1a Tumor de 4 cm ou menos em sua maior dimensão, confinado ao rim

T1b Tumor maior que 4 cm, mas não maior de 7 cm em sua maior dimensão, confinado ao rim

T2a Tumor maior que 7 cm, mas não maior de 10 cm em sua maior dimensão, confinado ao rim

T2b Tumor maior que 10 cm, confinado ao rim

T3a Tumor se estende para dentro da veia renal ou seus braços, ou invade a gordura perirrenal ou a gordura do seio renal, mas não ultrapassa a fáscia de Gerota

T3b Tumor se estende para veia cava inferior abaixo do diafragma

T3c Tumor se estende para dentro da veia cava acima do diafragma ou invade a parede da veia cava;

T4 Tumor ultrapassa a fáscia de Gerota incluindo extensão contígua a glândula suprarrenal ipsilateral

Linfonodos Regionais

NX Linfonodos regionais não podem ser avaliados

N0 Ausência de metástase em linfonodos regionais

N1 Comprometimento linfonodal regional

Metástase a Distância

M0 Ausência de metástase à distância

M1 Metástase à distância

Agrupamento (TNM)

Estádio I T1 N0 M0

Estádio II T2 N0 M0

Estádio III T1-2 N1 M0

T3 N0-1 M0

Estádio IV T4 N0-1 M0

qqT qqN M1

## Anexo B – Terapia alvo-molecular em câncer de rim

Eficácia de drogas alvo moleculares em carcinoma de células renais metastático tanto em relação a sobrevida livre de progressão quanto a sobrevida global.

Medicação	Comparador	SLP media (meses)	Razão de Hazard Para SLP	SG media (meses)	Razão de Hazard Para SG	p-value SG
Sorafenibe <sup>1</sup>	Placebo	<b>5.5 vs 2.8</b>	0.44	<b>17.8 vs 15.2</b>	0.88	0.146
Sunitinibe <sup>2</sup>	IFN- $\alpha$	<b>11.0 vs 5.0</b>	0.54	<b>26.4 vs 21.8</b>	0.82	0.051
Temsirolimo <sup>3</sup>	IFN- $\alpha$	<b>5.5 vs 3.1</b>	0.66	<b>10.9 vs 7.3</b>	0.73	0.0078
Everolimo <sup>4</sup>	Placebo	<b>4.9 vs 1.9</b>	0.33	<b>14.8 vs 14.4</b>	0.87	0.162
Bevacizumabe + IFN- $\alpha$ <sup>5,6</sup>	IFN- $\alpha$	<b>10.2 vs 5.4</b>	0.60	<b>23.3 vs 21.3</b>	0.86	0.129
Pazopanibe <sup>7,8</sup>	Placebo	<b>9.2 vs 4.2</b>	0.46	<b>22.9 vs 20.5</b>	0.91	0.224
Axitinibe <sup>9</sup>	Sorafenibe	<b>6.7 vs 4.7</b>	0.66	<b>29.4 vs 27.8*</b>	0.81	0.144

<sup>1</sup>Escudier B, et al. J Clin Oncol. 20 July 10, 2009; <sup>2</sup>Motzer RJ, et al. JCO. 27 August 1, 2009; <sup>3</sup>Torisel Prescribing Information, 2011; <sup>4</sup>Motzer RJ, et al. Cancer. September 15, 2010; <sup>5</sup>Avastin Prescribing Information, 2009; <sup>6</sup>Escudier B, et al. J Clin Oncol. 28: 2144-2150, 2010; <sup>7</sup>Votrient Prescribing Information, 2011; <sup>8</sup>Sternberg C, et al. J Clin Oncol. 28:1061-1068, 2010; <sup>9</sup>Rini BI, et al. *Lancet* 2011, not approved in Brazil; \* OS available only in cytokine-treated subgroup Michaelson et al , ASCO 2012, Abstract No. 4546.

## Anexo C – Ficha de coleta de dados

Ficha de coleta de dados do projeto de pesquisa intitulado “**EXPRESSÃO DO RECEPTOR TIROSINA QUINASE AXL EM PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS RENAI METASTÁTICOS TRATADOS COM SUNITINIBE E SUA ASSOCIAÇÃO COM DESFECHOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.**

”

FICHA DE COLETA DE DADOS			
EXPRESSÃO DO RECEPTOR TIROSINA QUINASE AXL EM PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS RENAI METASTÁTICOS TRATADOS COM SUNITINIBE E SUA ASSOCIAÇÃO COM DESFECHOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.			
Investigador Principal: Dr. Luis Eduardo Rosa Zucca – CRM-SP 119.753			
DESCRIÇÃO DEMOGRÁFICA, IDENTIFICAÇÃO E REGISTRO			
1	ID	1	
2	Iniciais do Nome	2	
3	Registro Hospitalar	3	
4	Naturalidade (Estado da Federação)	4	
5	Data de Nascimento (DD/MM/AAAA)	5	____/____/____
6	Gênero 1- Masculino; 2- Feminino	6	
7	Data do Diagnóstico do Câncer (DD/MM/AAAA)	7	____/____/____
8	Nefrectomia 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	8	
9	Data do Nefrectomia (DD/MM/AAAA)	9	____/____/____
10	Nº Exame de Patologia Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	10	
11	Se outro sítio da Biópsia/Cirurgia 0- Não; 1- Rim (Tu 1o); 2- Fígado; 3- Pulmão; 4- Ossos; 5- LFN; 6- SNC; 7- Outro; 88- N/A 99- Ignorado	11	
12	Data da Biópsia (DD/MM/AAAA)	12	____/____/____

13	<b>Nº Exame de Patologia</b> Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	13	
<b>HISTÓRIA ONCOLÓGICA FAMILIAR</b>			
14	<b>História Familiar de Câncer (parentes de 1º grau)</b> 0- Não; 1 - Mama; 2 - Próstata; 3 - Pulmão; 4 - Cérvix; 5 - Estômago; 6 - Colorretal; 7 - Ovário; 8 - SNC; 9 - Rim; 10 - Melanoma; 11 - Outro; 99- Ignorado	14	
<b>MICROSCOPIA PATOLÓGICA DA AMOSTRA TUMORAL</b>			
15	<b>Exame</b> 1- Nefrectomia; 2- Biópsia; 99- Ignorado	15	
16	<b>Tipo Histológico</b> 1- Células Claras; 2- Papilar; 3- Cromóforo; 4- Sarcomatoide Puro; 5- Células Claras e comp. Sarcomatoide; 6- Outro; 99- Ignorado	16	
17	<b>Se outro tipo Histológico, detalhar:</b> Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	17	
18	<b>Grau de Furhman</b> 1- I; 2- II; 3- III; 4- IV; 88 - NA; 99- Ignorado	18	
19	<b>% Componente Sarcomatoide:</b> Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	19	
20	<b>Tamanho do Tu primário no maior eixo</b> Em centímetros; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	20	
<b>ESTADIAMENTO TNM - AJCC</b>			
21	<b>Data do estadiamento inicial</b> (DD/MM/AAAA)	21	____/____/____
22	<b>T</b> 0- 0; 1- 1a; 2- 1b; 3- 2a; 4- 2b; 5- 3a; 6- 3b; 7- 3c; 8- 4; 9- X; 99- Ignorado	22	
23	<b>N</b> 0- 0; 1- 1; 2- X; 99- Ignorado	23	
24	<b>M</b> 0- 0; 1- 1; 99- Ignorado	24	
25	<b>Agrupamento TNM</b>	25	

	1- I; 2- II; 3- III; 4- IV; 88- N/A; 99- Ignorado		
<b>AVALIAÇÃO POR IMAGEM AO DIAGNÓSTICO DE METÁSTASE</b>			
26	Data do diagnóstico de metástase (DD/MM/AAAA)	26	____/____/____
27	Sítio Dominante de Metástase 0- Fígado; 1- Pulmão; 2- Ossos; 3- LFN; 4- SNC; 5- Outro; 88- N/A; 99- Ignorado	27	
28	Segundo sítio de metástase 0- Fígado; 1- Pulmão; 2- Ossos; 3- LFN; 4- SNC; 5- Outro; 88- N/A; 99- Ignorado	28	
29	Terceiro sítio de metástase 0- Fígado; 1- Pulmão; 2- Ossos; 3- LFN; 4- SNC; 5- Outro; 88- N/A; 99- Ignorado	29	
30	Se outras metástases, detalhar: Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	30	
<b>AVALIAÇÃO FÍSICA E LABORATORIAL AO DIAGNÓSTICO DE METÁSTASE</b>			
31	Peso Em quilos; 999- Ignorado	31	
32	Altura Em metros; 999- Ignorado	32	
33	KPS 0 - 100%; 999- Ignorado	33	
34	LDH Em UI/mL; 999- Ignorado	34	
35	Hemoglobina Em (g/dL); 999- Ignorado	35	
36	Neutrófilos Em (células/mm <sup>3</sup> ); 999- Ignorado	36	
37	Plaquetas Em (células/mm <sup>3</sup> ); 999- Ignorado	37	
38	Albumina Em (g/dL); 999- Ignorado	38	
39	Cálcio Em (mg/dL); 999- Ignorado	39	
<b>TRATAMENTO DE PRIMEIRA LINHA</b>			
40	Data do 1o Tratamento Sistêmico (DD/MM/AAAA)	40	____/____/____
41	Tipo do 1o Tratamento Sistêmico	41	



	<b>0- Imunoterapia; 1- TKi; 2- Anti-mTOR; 3- Quimioterapia; 888- N/A; 999- Ignorado</b>		
<b>42</b>	<b>Resposta ao Tratamento</b> 1- Completa; 2- Parcial; 3- Estável; 4- Progressão; 888- N/A; 999- Ignorado	<b>42</b>	
<b>43</b>	<b>Data da Progressão da Doença</b> (DD/MM/AAAA)	<b>43</b>	____/____/____
<b>44</b>	<b>Evento Adverso Grau 5 (CTCAE)</b> 0- Não; 1- Sim; 888- N/A; 999- Ignorado	<b>44</b>	
<b>TRATAMENTO DE SEGUNDA LINHA</b>			
<b>45</b>	<b>Data do 2o Tratamento Sistêmico</b> (DD/MM/AAAA)	<b>45</b>	____/____/____
<b>46</b>	<b>Tipo do 2o Tratamento Sistêmico</b> 0- Imunoterapia; 1- TKi; 2- Anti-mTOR; 3- Quimioterapia; 888- N/A; 999- Ignorado	<b>46</b>	
<b>47</b>	<b>Resposta ao Tratamento</b> 1- Completa; 2- Parcial; 3- Estável; 4- Progressão; 888- N/A; 999- Ignorado	<b>47</b>	
<b>48</b>	<b>Data da Progressão da Doença</b> (DD/MM/AAAA)	<b>48</b>	____/____/____
<b>49</b>	<b>Evento Adverso Grau 5 (CTCAE)</b> 0- Não; 1- Sim; 888- N/A; 999- Ignorado	<b>49</b>	
<b>TRATAMENTO DE TERCEIRA LINHA</b>			
<b>50</b>	<b>Data do 3o Tratamento Sistêmico</b> (DD/MM/AAAA)	<b>50</b>	____/____/____
<b>51</b>	<b>Tipo do 3o Tratamento Sistêmico</b> 0- Imunoterapia; 1- TKi; 2- Anti-mTOR; 3- Quimioterapia; 888- N/A; 999- Ignorado	<b>51</b>	
<b>52</b>	<b>Resposta ao Tratamento</b> 1- Completa; 2- Parcial; 3- Estável; 4- Progressão; 888- N/A; 999- Ignorado	<b>52</b>	
<b>53</b>	<b>Data da Progressão da Doença</b> (DD/MM/AAAA)	<b>53</b>	____/____/____
<b>54</b>	<b>Evento Adverso Grau 5 (CTCAE)</b> 0- Não; 1- Sim; 888- N/A; 999- Ignorado	<b>54</b>	
<b>TRATAMENTO COM SUNITINIB</b>			
<b>55</b>	<b>Linha de Tratamento</b> 1- 1ª; 2- 2ª; 3- 3ª; 4- 4ª	<b>55</b>	
<b>56</b>	<b>Dose inicial (Descrever)</b>	<b>56</b>	

	<b>Em miligramas; 999- Ignorado</b>		
<b>57</b>	<b>Redução de Dose durante o tratamento</b> 0- Não; 1- Sim; 888- N/A; 999- Ignorado	<b>57</b>	
<b>58</b>	<b>Interrupção de Dose por Toxicidade</b> 0- Não; 1- Sim; 888- N/A; 999- Ignorado	<b>58</b>	
<b>59</b>	<b>Motivo da Interrupção por Toxicidade</b> 0- Diarréia; 1- Sd. Mão-Pé; 2- Hipotireoidismo; 3- Náusea; 4- Hematológico; 5 – Fadiga; 888- N/A; 999- Ignorado	<b>59</b>	
<b>60</b>	<b>Se outro motivo da Interrupção por Toxicidade, detalhar:</b> Descrever; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	<b>60</b>	
<b>61</b>	<b>Data do FIM do Tratamento com Sunitinib</b> (DD/MM/AAAA)	<b>61</b>	____/____/____
<b>DESFECHO</b>			
<b>62</b>	<b>Data do óbito ou da última informação</b> DD/MM/AAAA	<b>62</b>	____/____/____
<b>63</b>	<b>Status Clínico no último Follow-up</b> 0- Vivo SEM Doença; 1- Vivo COM Doença; 2-Óbito PELA Doença; 3-Óbito OUTRAS causas; 4- Perda de seguimento; 999- Ignorado	<b>63</b>	

## Anexo D – Carta de aprovação do CEP



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Expressão do receptor tirosina-quinase AXL em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos tratados com sunitinibe e sua associação com desfechos clínico-patológicos

**Pesquisador:** Luis Eduardo Rosa Zucca

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 34091114.1.0000.5437

**Instituição Proponente:** Fundação Pio XII

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 833.830

**Data da Relatoria:** 29/09/2014

**Apresentação do Projeto:**

O projeto é apresentado de forma clara e visa o estudo em carcinoma de células renais na busca de biomarcadores prognósticos e preditivos mais sensíveis para melhor caracterizar este tipo de cancer. Para isto, avaliará a expressão do receptor tirosino quinase AXL, que é um proto-oncogene que se expressa em vários tecidos celulares através da técnica de imunohistoquímica em 92 pacientes com carcinoma de células renais metastático tratados com sunitinibe no Hospital de Câncer de Barretos, e correlacionará o perfil de expressão com as características clínico-patológicas e resposta terapêutica ao uso desta medicação. Sendo assim, será realizado um tissue-microarray (TMA) dos pacientes selecionados.

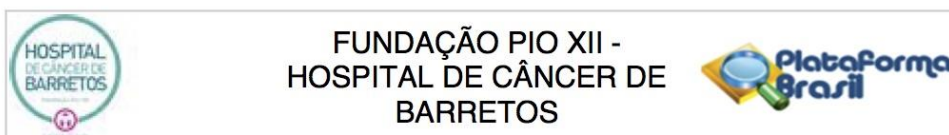
**Objetivo da Pesquisa:**

Determinar o perfil epidemiológico e características clínicas-patológicas dos pacientes com carcinoma de células renais metastático que fizeram uso de sunitinibe. Revisão histopatológica dos casos e realização de um tissue-microarray (TMA) dos pacientes selecionados

- Avaliar a expressão do receptor tirosino quinase AXL, forma total e fosforilada dos casos

-Correlacionar o perfil de expressão de AXL com as características epidemiológicas e clínicas-patológicas dos pacientes, em particular o seu impacto no prognóstico e resposta terapêutica ao uso desta medicação.

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 833.830

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Trata-se de um estudo observacional retrospectivo e os riscos estão associados a confidencialidade dos dados. Outro potencial risco é a utilização total do material biológico, impossibilitando a utilização para futuros testes, para evitar esta situação, eu, Luís Eduardo, asseguro que não será utilizado todo material disponível, deixando sempre material residual para futuras análises (declaração em anexo)

**Benefícios:**

Não há benefício direto ao participante da pesquisa por tratar-se de um população com sobrevida restrita, entretanto os dados extraídos deste estudo contribuíram para um melhor entendimento da fisiopatologia da doença e melhor estratificação de risco dos pacientes. Além disso é possível que um novo alvo terapêutico esta sinalizado nestes resultados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Este estudo representa a possível intensificação de biomarcadores prognósticos e preditivos mais sensíveis pode caracterizar melhor o paciente com câncer de rim e proporcionar um guia mais sensível para o manejo médico.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos estão apresentados corretamente.

**Recomendações:**

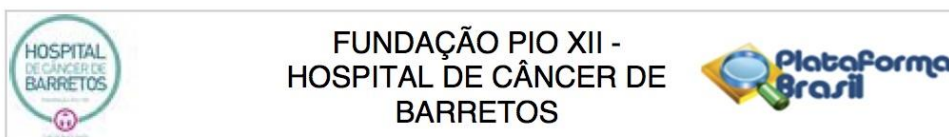
Não há recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

1) Embora o pesquisador tenha descrito que o risco da pesquisa envolve apenas questões de confidencialidade, deve-se lembrar que o uso de material biológico também pode apresentar riscos e determinar danos ao participante, mesmo que de forma retrospectiva. O pesquisador deve assegurar que não utilizará todo o material disponível nos blocos de parafina, deixando material residual para futuros re-testes. Solicita-se que o pesquisador apresente declaração assegurando a manutenção de material residual. RESPOSTA: Declaro que assegurarei a manutenção do material residual e que não utilizarei todo o material disponível nos blocos de parafina. Faço a carta de declaração e anexo a mesma na plataforma Brasil, além de readequar sobre os risco na plataforma Brasil.

ANÁLISE: Pendência atendida

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 833.830

2) O estudo apresenta metodologia detalhada dos TMAs, não havendo dúvidas do procedimento a ser executado no projeto. Contudo, o orçamento não foi detalhado na plataforma Brasil e no projeto completo. Solicita-se adequação, incluindo também os kits ou anticorpos que serão adquiridos para construção dos TMAs.

RESPOSTA: Faça a readequação do orçamento, tanto na plataforma Brasil, quanto no projeto completo página 23 item 3.5. Sobre os anticorpos e kits, os mesmos se encontram no projeto completo na página 21 item 3.3. Anexo meu projeto na plataforma Brasil. Faça orçamento dos kits de anticorpos a serem utilizados para nosso projeto.

ANÁLISE: Pendência atendida

3) O pesquisador relata que o projeto será custeado através do PAIP no valor de R\$ 10.000,00 reais. Contudo, o PAIP do proponente não é compatível para a execução do projeto de pesquisa proposto. Solicita-se esclarecimento acerca do financiamento. Se for incluído neste valor o PAIP do orientador, o pesquisador deverá apresentar declaração assinada pelo mesmo no PB.

RESPOSTA: O PAIP usado será o PAIP de Dr Rui Manuel Reis, meu orientador. O mesmo faz uma declaração e eu anexo junto a plataforma Brasil.

ANÁLISE: Pendência atendida.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

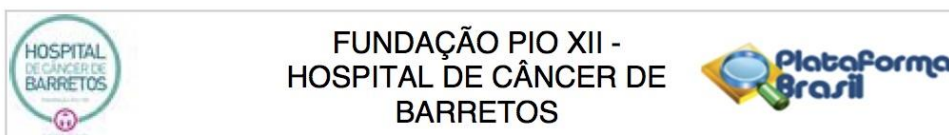
**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital do Câncer de Barretos de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional N° 001/2013 do CNS, e após a análise das respostas as pendências emitidas, manifesta-se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios semestrais, sendo o primeiro previsto para 15/04/2015.
2. Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de participantes deve ser temporariamente interrompida até a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 833.830

3. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
4. Para projetos que utilizam amostras criopreservadas, procurar o BIOBANCO para início do processamento.
5. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.
6. Este projeto está cadastrado no CEP-HCB sob o número 837/2014.

BARRETOS, 16 de Outubro de 2014

---

**Assinado por:**  
**Sergio Vicente Serrano**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br