

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA CIRÚRGICA**

DANIEL D'OLIVEIRA SILVA

**"EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO FATOR TECIDUAL COMO
PREDITIVO DE MORTALIDADE NO CARCINOMA DE CÉLULAS CLARAS DE
RIM"**

**Porto Alegre
2013**

DANIEL D'OLIVEIRA SILVA

**"EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO FATOR TECIDUAL COMO
PREDITIVO DE MORTALIDADE NO CARCINOMA DE CÉLULAS CLARAS DE
RIM"**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do
Sul, como requisito para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina e Ciências da Saúde - Área de
Concentração: Clínica Cirúrgica.**

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal

Co-orientador: Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva

**Porto Alegre
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA

S586e Silva, Daniel D'Oliveira

Expressão imunoistoquímica do fator tecidual como preditivo de mortalidade no carcinoma de células claras de rim / Daniel D'Oliveira Silva. Porto Alegre: PUCRS, 2013.

56 f.: il. tab. Inclui artigo científico encaminhado para publicação.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal.

Co-orientador: Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

1. NEOPLASIA RENAL. 2. TROMBOPLASTINA. 3. PROGNÓSTICO. 4. MORTALIDADE. 5. ESTUDO DE COORTE RETROSPECTIVO. I. Carvalhal, Gustavo Franco. II. Silva, Vinicius Duval da. III. Título.

CDD 616.99461

DANIEL D'OLIVEIRA SILVA

**" EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO FATOR TECIDUAL COMO
PREDITIVO DE MORTALIDADE NO CARCINOMA DE CÉLULAS CLARAS DE
RIM**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do
Sul, como requisito para a obtenção do título de
Mestre em Medicina e Ciências da Saúde - Área de
Concentração: Clínica Cirúrgica**

Aprovada em 08 de março de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jefferson Luis Braga da Silva-PUCRS

Prof.Dr. Marcelo Garcia Toneto-PUCRS

Prof Dr Dante Sica Filho- UFCSPA

Suplente: Prof. Dr. Antônio Atalibio Hartmann-PUCRS

Porto Alegre
2013

DEDICATÓRIA

***A todos estudantes e cientistas que, buscam através da dedicação em suas pesquisas,
produzir conhecimento que possa aliviar o sofrimento do próximo.***

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por mais uma vivência em busca da evolução e aprimoramento intelectual, interpessoal e espiritual.

Ao Dr. Gustavo Franco Carvalhal, meu orientador, pelo exemplo profissional, dedicação pela ciência e competência em tudo que faz. Acreditou no meu potencial desde o período da graduação até o momento atual durante a realização deste trabalho. Devo a ele grande parte das minhas conquistas na carreira médica.

Aos meus pais, que me proporcionaram todas as condições e incentivaram a seguir o sonho de ser médico, principalmente minha mãe Maria Luiza, que soube conduzir sozinha e de maneira exemplar a educação de seus filhos.

À minha esposa Maíra pelo companheirismo, incentivo e ternura, proporcionou todas as condições necessárias para a elaboração deste trabalho.

À minha filha Sofia, que, com seu amor incondicional, compreendeu minhas ausências durante este período.

Ao meu irmão Tiago, pelo estímulo ao crescimento pessoal e intelectual.

A minha vó, Ottalyra pela ajuda em meus primeiros passos e a todos outros familiares, agradeço por fazerem parte da minha vida e, por extensão, desta conquista.

Ao Dr. Vinicius Duval da Silva, pela orientação, incentivo e aprendizado proporcionado.

À PUCRS e Hospital São Lucas onde fiz toda minha formação profissional desde a graduação, especialização e agora a pós-graduação.

A CAPES, que proporcionou as condições financeiras, sem as quais não seria possível a realização deste projeto

Ao Dr. Pedro Shaeffer, colega de caserna e exemplo de dedicação e companheirismo, que auxiliou na revisão das lâminas.

Ao Tiago Giuliani Lopes pela ajuda e ensinamentos na realização da imunoistoquímica.

Ao Dr. Jorge Antonio Pastro Noronha, chefe do serviço de Urologia, que permitiu a realização deste trabalho e desde a residência foi incentivador pessoal.

A todos colegas do Departamento de Patologia da PUCRS que sempre me auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos colegas do serviço de Urologia da PUCRS, da Aeronáutica e residentes da Urologia da PUCRS pela parceria e ajuda nas conversas do dia a dia.

RESUMO

O câncer renal é uma das neoplasias malignas mais letais. As taxas de mortalidade têm crescido mundialmente a despeito da evolução do diagnóstico precoce e do surgimento de novos fármacos ativos na terapia da doença sistêmica. Atualmente, para se estabelecer riscos de morbimortalidade em câncer renal, os pacientes são classificados de acordo com escalas e nomogramas que ainda não conseguem prever com acurácia a evolução clínica dos mesmos. De longa data, já sabemos da associação entre fenômenos tromboembólicos e neoplasia. Há alguns anos, pesquisadores identificaram o fator tecidual como uma das proteínas responsáveis por estes fenômenos e desde então vários estudos têm sido conduzidos tentando identificar em diferentes tipos tumorais a associação entre fator tecidual, tromboembolismo e neoplasia. Em 2009, nosso grupo analisou a correlação da expressão imunoistoquímica do fator tecidual com sobrevida em pacientes com tumores de Wilms. Neste estudo, houve importante associação entre expressão elevada do fator tecidual e pior prognóstico. O objetivo do presente trabalho foi correlacionar a expressão imunoistoquímica deste mesmo fator tecidual com fatores prognósticos e mortalidade em 58 pacientes portadores de tumores de células claras de rim submetidos a cirurgia no Hospital São Lucas da PUCRS nos anos de 2004 à 2007 e que tiveram acompanhamento por pelo menos 5 anos.

PALAVRAS-CHAVE: neoplasia renal, tromboplastina, prognóstico, mortalidade

ABSTRACT

Renal cell carcinomas (RCCs) are among most the most lethal malignant neoplasms. Despite the evolution in the development of new drugs and imaging studies, mortality rates have increased around the world. Currently, to establish risks of mortality in RCC patients are classified according to scales and nomograms that can't accurately predict clinical outcomes. The association between cancer and thromboembolic events is well known for a long time. A few years ago, researchers identified tissue factor as one of the proteins responsible for these phenomena and several studies have been conducted trying to correlate the expression of tissue factor with cancer. In 2009, a study conducted by our group described the important association between the immunohistochemical expression of tissue factor and mortality in patients with Wilms' tumours. The aim of the present study was to correlate the immunohistochemical expression tissue factor with prognostic factors and mortality in 58 patients surgically treated at Hospital São Lucas in the years 2004 to 2007, who had been followed for at least five years.

Key Words: Kidney neoplasms, thromboplastin, prognosis, mortality

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

Figura 1 Estadiamento TNM 2010.....	15
Figura 2- Papel do FT na coagulação sanguínea.....	16
Figura 3- Sinalização intracelular FT-FVIIa-PAR2	19
Figura 4 -Função do FT na produção de metástases.....	20

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AsTF- do Inglês, *Alternative-splice Tissue Factor*

CTGF- Fator de Crescimento derivado do tecido conjuntivo (do Inglês, *connective tissue growth factor*)

CXCL-1- do Inglês, *chemokine (C-X-C motif) ligand 1*

Cyr61- Indutor angiogênico da cisteína (do Inglês, *cysteine-rich, angiogenic inducer*, 61)

c-MET- Proto-oncogene (do Inglês, MET ou MNNG HOS *Transforming gene- proto-oncogene*)

CCR- Carcinoma de Células Renais

ENCARE- Estudo Nacional do Câncer Renal

ELISA- do Inglês, *Enzyme linked immuno sorbent assay*

FT ou TF- Fator Tecidual ou *Tissue Factor*

HIF- Fator Indutor de Hipóxia

IL-1- β - interleucina 1, beta

IL-6/IL-8- Interleucina 6 e 8

IMP3- do Inglês, U3 *small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (yeast)*

Ki-67- Antígeno nuclear

K-ras- Oncogene (do Inglês, *Ki-ras2 Kirsten rats sarcoma oncogene*)

MAPK- Proteína-quinase ativada por mitógeno (do Inglês, *mitogen-activated protein kinase*)

PAR- do Inglês, *Protease- Activated Receptor*

PCR- Reação em cadeia da polimerase

PI3- do Inglês, *Kinase- peptidase inhibitor 3*

p-53- gene supressor tumoral (do Inglês, *tumor protein p53*)

SEER- do Inglês , *Surveillance Epidemiology and End Results*

SSIGN- do Inglês, *Stage, Sign, Grade and Necrosis*

TFPI- Inibidor da via do fator tecidual (do Inglês, *Tissue Factor Pathway Inhibitor*)

TNM- do Inglês, *Tumor, Node, Metastases*

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α

TSK- do Inglês, *tight skin mutation*

TF-A Fator Tecidual-A

UCLA- *University of California*

VEGF- *Vascular Endothelial Growth Factor*

VHL- Von Hippel- Lindau

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. OBJETIVO GERAL.....	22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3. JUSTIFICATIVA.....	23
4. REFERÊNCIAS.....	24
5. ARTIGO CIENTÍFICO.....	30
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
7. ANEXOS.....	49
7.1. CARTA DE APROVAÇÃO COMISSÃO CIENTÍFICA.....	49
7.2. CARTA DE APROVAÇÃO CEP.....	50
7.3. TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE DADOS.....	52
7.4. PROTOCOLO DE PESQUISA.....	53
7.5. BANCO DE DADOS.....	54

1 INTRODUÇÃO

Os tumores de rim são responsáveis por cerca de 2-3% de todas as neoplasias malignas¹. Apesar de representarem um percentual pequeno em comparação a outras neoplasias, possuem uma elevada taxa de letalidade. Estima-se que nos EUA 64.000 novos casos serão diagnosticados e que 13.000 pacientes irão morrer em decorrência de neoplasias renais no ano de 2012.¹ Dados da União Européia não são muito diferentes: 63.000 casos diagnosticados com 26.400 mortes relacionados ao câncer de rim por ano.² No Brasil, a incidência desta neoplasia é de 7-10 casos a cada 100.000 habitantes/ano nas áreas industrializadas, com uma taxa menor nas áreas rurais³.

Segundo o Serviço de estatística e epidemiologia dos EUA (SEER) cerca de 1,6% dos americanos nascidos em 2012 irão desenvolver câncer renal em algum momento de sua vida. Este valor também pode ser expresso como um para cada 63 norte-americanos¹. A prevalência atual de carcinoma renal nos EUA chega a 325.182 casos¹. No Brasil, um estudo epidemiológico realizado nos últimos anos mostrou um pouco da realidade deste tumor. O ENCARE, estudo realizado pela Sociedade Brasileira de Urologia, coletou dados durante o período de maio de 2007 a maio de 2008 chegando ao número de 508 casos, com predomínio do sexo masculino (58.9%), brancos (78%) e com a média de idade em 59.9 anos. A grande maioria era de casos localizados (90.5%) com apenas 9.5% de casos já com metástases⁴. Os dados globais indicam que os homens são mais afetados em cerca de duas vezes e a faixa etária mais prevalente é a dos 50 aos 70 anos. Vários fatores etiológicos têm sido estudados. O tabagismo aumenta em mais de duas vezes o risco de desenvolver câncer renal. Outros fatores importantes e de grande prevalência na população geral são a obesidade e a hipertensão arterial sistêmica. Alguns fatores ainda em estudo, como doença renal crônica e doença renal cística também foram descritos⁵.

O carcinoma de células renais tem origem no epitélio do túbulo contorcido proximal. A grande maioria dos casos são esporádicos, apenas 2-3% de casos ditos familiares⁶. Estudos genéticos mostram que os principais genes envolvidos são o VHL (Von- Hippel-Lindau), o TSK e o c-MET. Existem pelo menos quatro síndromes

hereditárias genéticas: a doença de Von-Hippel-Lindau, o carcinoma papilar hereditário de rim, o oncocitoma renal familiar e o carcinoma renal hereditário.⁷ Dos tipos histológicos existentes, cerca de 85% são carcinomas de células claras. Outros tipos histológicos como papilar e cromóforo são mais raros.⁸ Estudos realizados em grandes centros como a *Mayo Clinic* e o *Memorial Sloan Kettering Cancer Centre* em séries com grande número de pacientes mostram que o subtipo de células claras apresenta pior prognóstico quando comparado a outros tipos histológicos de neoplasias renais^{9,10}. Algumas características das células tumorais podem ajudar a definir o prognóstico. Fuhrman et al¹¹ propuseram um sistema de classificação de tumores renais baseado na morfologia nuclear. A escala varia de 1 a 4 sendo o grau de melhor prognóstico aquele com núcleos menores com morfologia regular e sem nucléolos (Grau 1) e o de pior prognóstico aquele com núcleos acima de 20mm, formas bizarras e vários nucléolos (Grau 4). Estudos ulteriores confirmaram o escore de Fuhrman como marcador independente de prognóstico no carcinoma renal, em especial no de células claras.^{12,13}

Quando a doença está localizada, o melhor tratamento é a remoção cirúrgica, a qual apresenta uma sobrevida câncer específica superior a 90%. O problema é que tumores muitas vezes são diagnosticados tardiamente quando a doença já está localmente avançada. Aproximadamente 20% a 30% dos pacientes com CCR apresentam-se metastáticos quando do momento do diagnóstico. Além disso, mesmo em pacientes submetidos a tratamento cirúrgico com ressecção completa, cerca de 30% apresentarão recidivas, sendo os locais mais freqüentes de metástases os pulmões, os ossos, o fígado e o cérebro¹⁴.

Vários fatores clínicos e laboratoriais bem como fatores relacionados ao tumor em si já foram estudados como preditivos de sobrevida. Dentre estes, podemos citar o estadiamento clínico, principalmente a presença ou ausência de metástases linfonodais ou à distância, o tamanho tumoral, a presença de invasão linfática ou vascular intratumoral, a localização do tumor, a presença de necrose tumoral, a proximidade do seio renal, entre outros.¹⁵ Geralmente, os fatores relacionados aos tumores como grau de Fuhrman, tamanho do tumor, subtipo histológico e classificação TNM são considerados os mais importantes por serem independentes para predizer sobrevida¹⁶.

Um estudo realizado pelo Instituto Nacional do Câncer no Brasil analisou fatores prognósticos ratificando os dados já presentes na literatura mundial. As variáveis neste estudo que se mostraram como independentes na predição de sobrevida livre de doença foram o subtipo histológico, a presença de necrose tumoral, o envolvimento linfonodal e a presença de metástases¹⁷. A associação de fatores clínicos, laboratoriais e os relacionados aos tumores em si, utilizando modelos múltiplos e nomogramas têm mostrado melhor acurácia preditiva do que quando observamos os fatores de risco isoladamente.¹⁸ Para estabelecer a chance de recidiva local e sistêmica em carcinoma de células claras inicial têm sido utilizados o modelo proposto pela UCLA que combina a classificação TNM, o grau de Fuhrman e o escore de Karnofsky¹⁹ e o SSIGN que analisa através da classificação TNM -1997 o tamanho do tumor, o grau nuclear (Fuhrman) e a presença de necrose tumoral.²⁰ Outras escalas e nomogramas utilizados são o de Karakiewsky²¹ e o de Leibovich²². Alguns marcadores moleculares já foram estudados em CCR. Destes, os mais relevantes são a anidrase carbônica IX, o Ki67,²³ o HIF²⁴ e o IMP3²⁵. Nenhum deles isolado ou em associação consegue prever hoje, com acurácia, qual paciente com câncer renal irá evoluir desfavoravelmente.

Fig.1 Estadiamento TNM 2010

Primary Tumor (T)

- TX Primary tumor cannot be assessed.
 T0 No evidence of primary tumor.
 T1 Tumor ≤ 7 cm in greatest dimension, limited to the kidney.
 T1a Tumor ≤ 4 cm in greatest dimension, limited to the kidney.
 T1b Tumor >4 cm but not >7 cm in greatest dimension, limited to the kidney.
 T2 Tumor >7 cm in greatest dimension, limited to the kidney.
 T2a Tumor >7 cm but ≤ 10 cm in greatest dimension, limited to the kidney.
 T2b Tumor >10 cm, limited to the kidney.
 T3 Tumor extends into major veins or perinephric tissues but not into the ipsilateral adrenal gland and not beyond Gerota fascia.
 T3a Tumor grossly extends into the renal vein or its segmental (muscle containing) branches, or tumor invades perirenal and/or renal sinus fat but not beyond Gerota fascia.
 T3b Tumor grossly extends into the vena cava below the diaphragm.
 T3c Tumor grossly extends into the vena cava above the diaphragm or invades the wall of the vena cava.
 T4 Tumor invades beyond Gerota fascia (including contiguous extension into the ipsilateral adrenal gland).

Regional Lymph Nodes (N)

- NX Regional lymph nodes cannot be assessed.
 N0 No regional lymph node metastasis.
 N1 Metastases in regional lymph node(s).

Distant Metastasis (M)

- M0 No distant metastasis.
 M1 Distant metastasis.

Anatomic Stage/Prognostic Groups

Stage	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1 or T2	N1	M0
	T3	N0 or N1	M0
IV	T4	Any N	M0
	Any T	Any N	M1

Fonte: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010,

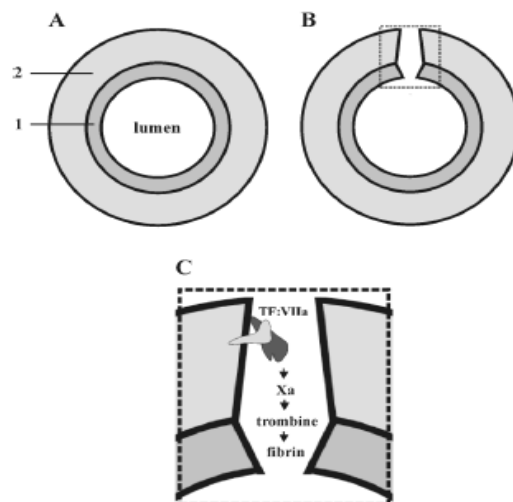
A associação entre fenômenos tromboembólicos e neoplasias remonta ao século XIX com os relatos de tromboflebite em tumores gastrintestinais descritos inicialmente por Armand Trousseau em 1865, dando nome à Síndrome de Trousseau (neoplasia associada a fenômeno tromboembólico)²⁶. Atualmente, sabemos que o câncer por si só aumenta em quatro vezes o risco de trombose, enquanto que a realização de tratamentos quimioterápicos aumenta em seis vezes estes riscos, com relação à população geral.²⁷ Desde o início, diversas moléculas foram estudadas e sugeridas como prováveis causas dos fenômenos tromboembólicos: IL1- β , TNF- α e IL6 e o fator tecidual²⁸. O fator tecidual (FT) é uma glicoproteína transmembrana inicialmente conhecida como tromboplastina, composta de 219 aminoácidos no domínio

extracelular, 24 resíduos de aminoácidos na região da membrana e 28 aminoácidos no domínio citoplasmático. Em circunstâncias normais o FT somente é expresso em células extravasculares, como os fibroblastos subendoteliais dos órgãos internos, principalmente cérebro, coração, rim e placenta.²⁹ Estudos conduzidos em camundongos mostraram que a inibição do FT ou níveis circulantes de FT baixos correlacionam-se com sangramentos em alguns tecidos, notadamente cérebro e coração.³⁰ Quando ocorre uma lesão endotelial o FT é liberado na corrente sanguínea e entra em contato inicialmente com o fator VII circulante formando um complexo FT-FVII-a que por sua vez é co-fator para ativação do fator X em X-a. O fator X-a irá converter a protrombina em trombina. A trombina ativa as plaquetas e converte fibrinogênio em fibrina, essencial para a estabilização do coágulo. Este é o início da cascata de coagulação.³¹

Fig2 Papel do FT na coagulação sanguínea

A- Vaso sanguíneo com camada íntima (1) que não expressa FT e camada subendotelial contendo FT.(2)

B- Quando ocorre lesão endotelial o FT entra em contato com os fatores de coagulação na corrente sanguínea especificamente o fator VII dando início a cascata de coagulação.



Fonte: Versteeg et al em Molecular Medicine 2004; 10: 7.

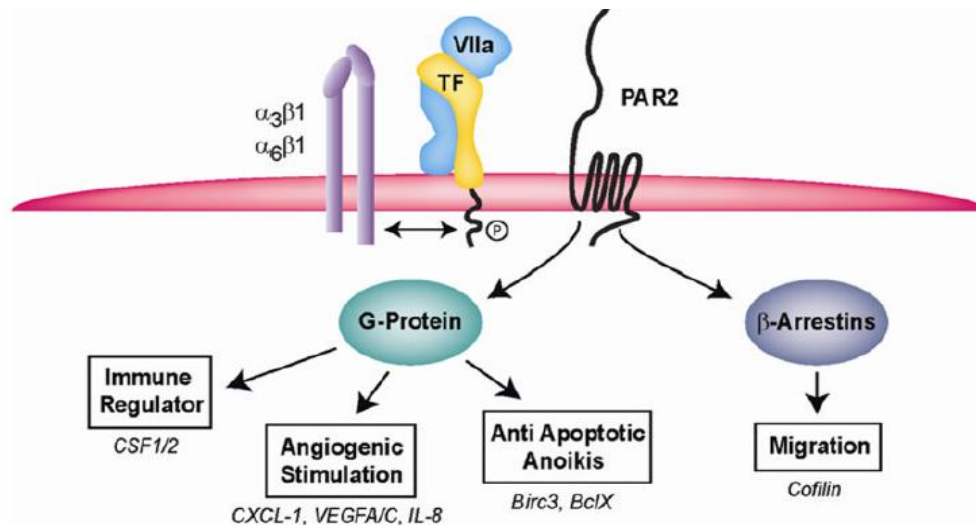
Estudos genéticos conseguiram mostrar que as células neoplásicas expressam alta quantidade de FT devido a alterações em genes responsáveis pela regulação do ciclo celular como o k- RAS e o p-53. Neste estudo realizado com células de carcinoma colorretal os autores demonstraram que as células inicialmente perdem a função reguladora do gene p-53, com subsequente ativação das vias sinalizadoras MAPK e PI3-Kinase levando, em última forma, a um aumento na expressão de FT pelas células

neoplásicas.³² Experimentos realizados *in vivo* confirmam modificações no p53 com conseqüente aumento na expressão do FT. A grande maioria do FT não está na circulação sanguínea, apenas uma pequena fração denominada micropartículas de FT (MP's).³³ Em indivíduos saudáveis, estas MP's estão em pequena quantidade. Porém Dvorak e cols. mostraram que as células tumorais liberam grande quantidade destas MP nas circulação sanguínea e que estas MP ativariam a cascata de coagulação de maneira mais intensa, aumentando os fenômenos tromboembólicos.³⁴ Estudo realizado em camundongos inoculados com câncer pancreático humano encontrou correlação positiva entre os níveis de FT circulantes e atividade do complexo trombina, um marcador de ativação da cascata de coagulação.³⁵ Em resumo, os resultados sugerem que os tumores são parcela fundamental para produção do FT circulante que por sua vez determina um estado de hipercoagulabilidade, aumentando a incidência de tromboembolismo.³⁶

Mais recentemente, um estudo mostrou que o FT não somente estimula fenômenos tromboembólicos, mas parece apresentar propriedades não hemostáticas essenciais para a progressão do câncer. A ligação do FT ao FVIIa formando o complexo inicial da cascata de coagulação também determina algumas alterações intracelulares, como transcrição gênica, sobrevivência celular e mudanças citoesqueléticas, necessárias para uma resposta adequada ao ambiente local. Neste sentido, uma família de receptores recebe maior destaque, os chamados PAR (*protease-activated receptors*) numerados de 1 a 4.³⁷ Estes receptores são ativados quando há quebra da terminação amino extracelular. Os receptores 1,3,4 são ativados principalmente pela trombina e o PAR1 também pela plasmina. Recebe maior destaque o PAR2 por apresentar ativação principalmente com o complexo FT-FVIIa. Quando o FT se liga ao FVIIa e este ao PAR2, ocorre ativação intracelular de quinases responsáveis por fazerem um rearranjo citoesquelético e por aumentarem a sobrevivência celular. A ativação destas quinases dá início a um programa intracelular que aumenta a síntese de proteínas pro-angiogênicas como o VEGF, Cyr61, CTGF, CXCL1 e IL8, corroborando a idéia de que o FT tem papel fundamental também na disseminação dos tumores ao aumentar a síntese destas proteínas.³⁸ Diferentemente da estimulação do PAR2, as isoformas do FT chamam atenção para as propriedades não hemostáticas do FT. Duas isoformas têm chamado a atenção neste aspecto recentemente. O TF-A

resulta de um processamento alternativo no exon 1, e em células sadias não transformadas constitui menos de 1%, ao passo que em células neoplásicas o número de TF-A chega a 10%.³⁹ Outra isoforma foi identificada por Bogdanov e cols. em 2003, sendo nomeada *alternative-splice TF* ou *asTF*.⁴⁰ Normalmente o FT é processado e codificado por seis exons ao passo que o *asTF* é codificado por cinco exons. Esta alteração determina que excepcionalmente esta variante do FT seja solúvel e possa ser detectada no plasma. As isoformas do FT parecem ter papel chave principalmente em neoplasias. O fato de ser recente esta descoberta e de não dispormos de reagentes específicos subestima sua real importância.⁴¹ Uma dificuldade que encontramos atualmente é não podermos distinguir a expressão do FT da expressão do *asTF*. O único estudo realizado que mostrou que o aumento da expressão de *asTF* associou-se a pior sobrevida foi o estudo de Rollin et al., conduzido em carcinoma de pulmão não pequenas células.⁴² Resumidamente, o complexo FT-FVIIa-PAR2 sinaliza para o citoplasma e para o núcleo da célula uma série de mecanismos que vão influenciar na sobrevida celular, motilidade celular e produção de fatores angiogênicos.⁴³

Fig3. Sinalização intracelular FT-FVIIa-PAR2 para promover modificações celulares através do aumento de síntese de fatores pro-angiogênicos.



Fonte: Ruf et al. em *Arterioscler Vasc Thromb Biol* 2010; 5:1546

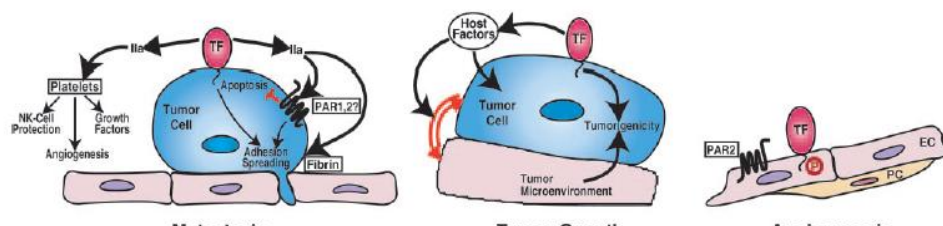
A expressão do fator tecidual está aumentada em mais de 1000x principalmente em neoplasias de origem epitelial como pâncreas, pulmão não-pequenas células, colorretal e mama.⁴⁴ Na maioria destes, houve correlação positiva entre o aumento da expressão de FT e parâmetros clínicos e patológicos como número de vasos tumorais⁴⁵, índice de metástases⁴⁶, grau de diferenciação do tumor e sobrevida.⁴⁷ Em estudo realizado para análise da expressão do FT em neoplasia de ovário, Han et al compararam os níveis séricos do FT em neoplasia benigna de ovário, lesões ovarianas com baixo potencial de malignidade e neoplasia maligna de ovário. Os resultados mostraram que os pacientes com neoplasia maligna de ovário expressaram níveis mais elevados de FT e que esta dosagem sérica mais elevada é fator prognóstico independente de mortalidade relacionada a doença.⁴⁸

Em relação a neoplasias urológicas, Forster et al, publicaram em 2003 a primeira análise da expressão de FT em neoplasia renal. Foram 18 pacientes com carcinoma de células claras de rim dos quais analisou-se a expressão do FT em tumor a fresco pela técnica de ELISA e a quantificação do RNA mensageiro do FT por PCR. Houve elevada expressão do FT no tecido sem tumor em comparação a quantidade de FT no tecido neoplásico. Também neste mesmo estudo, os autores realizaram coleta de

sangue em 75 pacientes com CCR e 92 voluntários sadios pareados por idade. Não houve aumento de FT no soro dos pacientes com câncer na comparação com indivíduos saudáveis. Não foi feito neste estudo correlação destes parâmetros de expressão com qualquer desfecho clínico ou sobrevida.⁴⁹

Como o FT pode estar relacionado a prognóstico? Sabemos que os tumores se disseminam através do espaço intravascular dando origem às metástases hematogênicas. Células neoplásicas expressam alta taxa de fator tecidual e, por mecanismo de ativação da cascata da coagulação estimulam em última forma o VEGF (*vascular endothelial growth factor*) responsável pela angiogênese tumoral.^{50,51} Zhang e cols. em estudo realizado em sarcomas mostraram que células transfectadas com FT induziram tumores mais vascularizados quando injetadas em camundongos devido a um aumento na regulação do VEGF.⁵² Outros estudos conduzidos em camundongos mostraram que a inibição da via FT reduziu significativamente a quantidade de metástases pulmonares quando comparados a camundongos controles.⁵³

Fig.4 Esquematização da função do FT na produção de metástases, crescimento tumoral e angiogênese.



Fonte: Ruf et al. em *Arterioscler Vasc Thromb Biol* 2005; 25:1546

Outro ponto importante é a influência do FT no crescimento tumoral. Trabalhos iniciais não conseguiram comprovar que o aumento da expressão do FT corresponderia a um aumento do tumor. Porém, estudo recente em camundongos mostrou que a inibição da via de ativação do FT em tumores colorretais conseguiu

reduzir o tamanho do tumor. A conclusão é de que neste último estudo a resposta ocorreu *in vivo* enquanto *in vitro* não houve redução tumoral.⁵⁴

Em função destes dados, pesquisadores tem tentado bloquear de alguma forma a via do FT, tanto para diminuir a incidência de trombooses, como também para evitar a progressão tumoral. Drogas menos específicas como a varfarina (antagonista da vitamina K) e a heparina em estudos experimentais mostraram alguma redução na incidência de metástases, mas provavelmente sem ligação com o FT.^{55,56} Através de um mecanismo de *feedback* negativo, o aumento na quantidade de fator Xa leva à produção de um inibidor de protease plasmático conhecido como inibidor da via do FT (TFPI). Além da inibição da via do FT, esta protease forma um composto quaternário que inativa o FT, FVIIa e FXa. A inibição da via específica do FT-VIIa-PAR2 através do anticorpo monoclonal 10H10 já mostrou redução no crescimento tumores de mama em camundongos e pode ter potencial terapêutico sem afetar as propriedades de coagulação necessárias do FT.⁵⁷

Atualmente, duas novas drogas estão sob investigação em estudos clínicos. O ALT-386 é um anticorpo inibidor do FT e o PCI-27483, uma pequena molécula inibidora da via FT-FVIIa-PAR2. Ambos são estudos que ainda estão em fase de recrutamento de pacientes em tumores sólidos epiteliais e pancreáticos respectivamente.^{58,59} Os resultados destes dois estudos podem introduzir novas modalidades de tratamento de neoplasias e trombooses relacionadas, definitivamente colocando o FT como marcador de prognóstico e alvo terapêutico de primeira linha.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa publicou que a expressão imunoistoquímica do fator tecidual (FT) foi o principal fator prognóstico de recorrência e de óbito em nefroblastomas.⁶⁰ A angiogênese tumoral parece ser fundamental para a progressão local e para o processo de metastatização em diversas neoplasias, sendo previamente estudada por nosso grupo em tumores de próstata⁶¹, bexiga⁶² cabeça e pescoço⁶³, estômago⁶⁴ e colorretais⁶⁵.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Determinar o padrão de expressão imunoistoquímica do FT em carcinomas de células claras de rim submetidos a tratamento cirúrgico no Hospital São Lucas da PUCRS, com seguimento mínimo de 5 anos.

2.2 Objetivos Específicos

- Correlacionar a intensidade da expressão imunoistoquímica do FT com fatores prognósticos em neoplasias renais;
- Correlacionar a intensidade da expressão imunoistoquímica do FT com a sobrevida global.

3 Justificativa

A justificativa para a realização deste trabalho está fundamentada principalmente na necessidade de novos fatores prognósticos relevantes em neoplasias renais e na importância do FT como fator prognóstico independente em diversas neoplasias. Nossa hipótese é de que a expressão elevada do FT em amostras de tecido de pacientes com carcinoma de células claras de rim tenha correlação com fatores de pior prognóstico em carcinomas renais e com maior mortalidade. Até o presente momento, não há descrição na literatura da expressão imunohistoquímica do FT em CCR, nem da associação entre a expressão imunohistoquímica do FT e a evolução clínica destes pacientes.

4 Referências

1. Siegel R, Naishadham D, and Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2012;62(1): 10-29.
2. 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 Sep;58(3):398-406.
3. Wunsch-Filho V. Insights on diagnosis, prognosis and screening of Renal Cell Carcinoma. *Sao Paulo Med J*.2002; 120(6): 163-4.
4. Nardi AC, Zequi S de C, Clark OA, Almeida JC, Glina S. Epidemiologic characteristics of Renal Cell Carcinoma in Brazil. *Int Braz J Urol*.2010; 36:151-7
5. Mc Laughlin, Lipworth L, Torone RE. Epidemiologic aspects of Renal Cell Carcinoma. *J.Urol*. 2006;176:2353-8.
6. Gonzalgo ML, Yegnasubramanian S, Yan G, Rogers CG, Nicol TL, Nelson WG, et al. Molecular profiling and classification of sporadic renal cell carcinoma by quantitative methylation analysis. *Clin Cancer Res*. 2004 Nov 1;10(21):7276-83.
7. Kovacs G, Störkel S, et al. The Heidelberg Classification of Renal Cell Tumors. *J Pathol*. 1997 Oct ;183(2):131-3.
8. Roma AA, Zhou M. Pathological classification and molecular genetics of Renal Cell Carcinoma. *AUA updates series* 2007:26
9. Mekhail TM, Abou-Jawde RM, Boumerhi G, Malhi S, Wood L, Elson P, et al. Validation and extension of the Memorial Sloan-Kettering prognostic factors model for survival in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2005 Feb 1;23(4):832-41.
10. Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N, Cindolo L, Ficarra V, Zisman A, et al. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience. *J Clin Oncol*. 2005 Apr 20;23(12):2763-71.
11. Fuhrman, SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 1982 Oct ;6(7):655-664.
12. Novara G, Martignoni G, Artibani W, Ficarra V. Grading systems in renal cell carcinoma. *J Urol*. 2007 Feb;177(2):430-6.

13. Teloken PE, Thompson RH, Tickoo SK, Cronin A, Savage C, Reuter VE, et al. Prognostic impact of histological subtype on surgically treated localized renal cell carcinoma. *J Urol*. 2009 Nov;182(5):2132-6.
14. Marshall FF, Stewart AK, Mench HR. The National Cancer Data base: report on kidney cancer. The American College of Surgeons Commissions on Cancer and The American Cancer Society. *Cancer*. 1997;80(11): 2167-74.
15. Tsui KH, Shvarts O, Smith RB, Figlin RA, deKernion JB, Beldegrun A. Prognostic indicators for renal cell carcinoma: a multivariate analysis of 643 patients using the revised 1997 TNM staging criteria. *J Urol*. 2000 Apr;163(4):1090-5; quiz 295.
16. Sorbellini M, Kattan MW, Snyder ME, Reuter V, Motzer R, Goetzl M, et al. A postoperative prognostic nomogram predicting recurrence for patients with conventional clear cell renal cell carcinoma. *J Urol*. 2005 Jan;173(1):48-51.
17. Ornellas AA, Andrade DM, Ornellas P, Wisnescky A, Schwindt ABS. Prognostic factors in Renal cell carcinoma: analysis of 227 patients treated at the Brazilian National Cancer Institute. *Int Braz J Urol*. 2012; 38(2):185-194
18. Sun M, Shariat SF, Cheng C, Ficarra V, Murai M, Oudard S, et al. Prognostic factors and predictive models in renal cell carcinoma: a contemporary review. *Eur Urol*. Oct;60(4):644-61.
19. Zisman A, Pantuck AJ, Figlin RA, Beldegrun AS. Validation of the ucla integrated staging system for patients with renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2001 Sep 1;19(17):3792-3.
20. Frank I, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. An Outcome Prediction Model for Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma Treated with Radical Nephrectomy Based on Tumor Stage, Size, Grade and Necrosis: The Ssign Score. *J Urol*. 2002;168(6):2395-400.
21. Karakiewicz PI, Suardi N, Capitanio U, Isbarn H, Jeldres C, Perrotte P, et al. Conditional Survival Predictions After Nephrectomy for Renal Cell Carcinoma. *J Urol*. 2009;182(6):2607-12.
22. Leibovich BC, Cheville JC, Lohse CM, et al. A score algorithm to predict survival for patients with metastatic clear cell renal carcinoma: a stratification tool for prospective clinical trials. *J Urol* 2005;174:1759-63
23. Bui MH, Visapaa H, Seligson D, Kim H, Han KR, Huang Y, et al. Prognostic value of carbonic anhydrase IX and KI67 as predictors of survival for renal clear cell carcinoma. *J Urol*. 2004 Jun;171(6 Pt 1):2461-6.
24. Gordan JD, Lal P, Dondeti VR, Letrero R, Parekh KN, Oquendo CE, et al. HIF-alpha effects on c-Myc distinguish two subtypes of sporadic VHL-deficient clear cell renal carcinoma. *Cancer Cell*. 2008 Dec 9;14(6):435-46.

25. Jiang Z, Chu P, Woda B, et al. Analysis of RNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma: a retrospective study. *Lancet Oncology*. 2006;7:556-64.
26. Anand M, Brat DJ. Oncogenic regulation of tissue factor and thrombosis in cancer. *Thromb Res*. 2012 Apr;129 Suppl 1:S46-9.
27. Heit JA. Cancer and venous thromboembolism: scope of the problem. *Cancer Control*. 2005 Sep;12 Suppl 1:5-10.
28. Bick RL. Cancer-associated thrombosis. *N Engl J Med*. 2003;349:109-11.
29. Spicer EK, Horton R, Bloem L, Bach R, Williams KR, Guha A, et al. Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Aug;84(15):5148-52.
30. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1687-93.
31. Versteeg HH, Peppelenbosch MP, Spek CA. The pleiotropic effects of tissue factor: a possible role for factor VIIa-induced intracellular signalling? *Thromb Haemost*. 2001 Dec;86(6):1353-9.
32. Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz JI, et al. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1734-41.
33. Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Dec;26(12):2594-604
34. Dvorak HF, Van DeWater L, Bitzer AM, Dvorak AM, Anderson D, Harvey VS, et al. Procoagulant activity associated with plasma membrane vesicles shed by cultured tumor cells. *Cancer Res*. 1983 Sep;43(9):4434-42.
35. Wang JO, Geddings JE., Mackman N. Tumor-derived tissue factor activates coagulation and enhances thrombosis in a mouse xenograft model of human pancreatic cancer. *Blood*. 2012; 119(23):5543-52.
36. Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost*. 2007 Mar;5(3):520-7.
37. Liu Y, Mueller BM. Protease-activated receptor-2 regulates vascular endothelial growth factor expression in MDA-MB 231 cells via MAPK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;344(4):1263-70.

38. Ruf W. Tissue factor and PAR signaling in tumor progression. *Thromb Res.* 2007;120 Suppl 2:S7-12.
39. Kocaturk B, Versteeg HH. Tissue factor isoforms in cancer and coagulation: may the best isoform win. *Thromb Res.* Apr;129 Suppl 1:S69-75.
40. Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med.* 2003 Apr;9(4):458-62.
41. Chand HS, Ness SA, Kisiel W. Identification of a novel human tissue factor splice variant that is upregulated in tumor cells. *Int J Cancer.* 2006 Apr 1;118(7):1713-20.
42. Rollin J, Regina S, Gruel Y. Tumor expression of alternatively spliced tissue factor is a prognosis marker in non-small cell lung cancer. *J Thromb Haemost.* 2010;8:607-10.
43. Camerer E, Huang W, Coughlin SR. Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 May 9;97(10):5255-60.
44. van den Berg, Y.W., S. Osanto, P.H. Reitsma, and H.H. Versteeg, The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench and bedside. *Blood,* 2011. 119(4): p. 924-32.
45. Khorana AA, Ahrendt SA, Ryan CK, Francis CW, Hruban RH, Hu YC, et al. Tissue factor expression, angiogenesis, and thrombosis in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 May 15;13(10):2870-5.
46. Sawada M, Miyake S, Ohdama S, Matsubara O, Masuda S, Yakumaru K, et al. Expression of tissue factor in non-small-cell lung cancers and its relationship to metastasis. *Br J Cancer.* 1999 Feb;79(3-4):472-7.
47. Nitori N, Ino Y, Nakanishi Y, Yamada T, Honda K, Yanagihara K, et al. Prognostic significance of tissue factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005 Apr 1;11(7):2531-9.
48. Han LY, Landen CN, Jr., Kamat AA, Lopez A, Bender DP, Mueller P, et al. Preoperative serum tissue factor levels are an independent prognostic factor in patients with ovarian carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006 Feb 10;24(5):755-61.
49. Forster Y, Meye A, Albrecht S, Kotzsch M, Fussel S, Wirth MP, et al. Tissue specific expression and serum levels of human tissue factor in patients with urological cancer. *Cancer Lett.* 2003 Apr 10;193(1):65-73.
50. Versteeg HH, Spek CA, Peppelenbosch MP, Richel DJ. Tissue factor and cancer metastasis: the role of intracellular and extracellular signaling pathways. *Mol Med.* 2004 Jan-Jun;10(1-6):6-11.

51. Kasthuri, R.S., M.B. Taubman, and N. Mackman, Role of tissue factor in cancer. *J Clin Oncol*, 2009 Oct 10;27(29): 4834-8.
52. Zhang Y, Deng Y, Luther T, Muller M, Ziegler R, Waldherr R, et al. Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest*. 1994 Sep;94(3):1320-7.
53. Amirkhosravi A, Meyer T, Chang JY, Amaya M, Siddiqui F, Desai H, et al. Tissue factor pathway inhibitor reduces experimental lung metastasis of B16 melanoma. *Thromb Haemost*. 2002 Jun;87(6):930-6.
54. Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz JI, et al. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1734-41.
55. Pengo V, Noventa F, Denas G, Pengo MF, Gallo U, Grion AM, et al. Long-term use of vitamin K antagonists and incidence of cancer: a population-based study. *Blood*. Feb 3;117(5):1707-9.
56. Schulman S, Lindmarker P. Incidence of cancer after prophylaxis with warfarin against recurrent venous thromboembolism. Duration of Anticoagulation Trial. *N Engl J Med*. 2000 Jun 29;342(26):1953-8.
57. Versteeg HH, Schaffner F, Kerver M, Petersen HH, Ahamed J, Felding-Habermann B, et al. Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth. *Blood*. 2008 Jan 1;111(1):190-9
58. Wong HC. A study of ALT-386 in combination with gemcitabine for locally advanced or metastatic solid tumors(www.clinicaltrials.gov; Bethesda,MD:National Library of Medicine). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01325558>. Acessado em 02 de Janeiro de 2013.
59. Hedrick E. Study of safety and tolerability of PCI-27483 in patients with pancreatic cancer patients receiving treatment with gemcitabine (www.clinicaltrials.gov;Bethesda,MD:National Library of Medicine). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01020006>. Acessado em 02 de Janeiro de 2013.
60. Maciel EO, Carvalhal GF, da Silva VD, Batista EL, Jr., and Garicochea B. Increased tissue factor expression and poor nephroblastoma prognosis. *J Urol*. 2009 Oct; 182(4): 1594-9.
61. Abdulkadir SA, Carvalhal GF, Kaleem Z, Kisiel W, Humphrey PA, Catalona WJ, et al. Tissue factor expression and angiogenesis in human prostate carcinoma. *Hum Pathol*. 2000;31(4):443-7.

62. Dornelles, E.J. Estudo imunoistoquímico da expressão do Fator tecidual e da densidade microvascular em espécimes de ressecção endoscópica de carcinoma urotelial de bexiga [tese]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2008
63. Maahs, G.S. Fator tecidual e densidade microvascular como fatores preditivos de metástases ganglionares no carcinomamepidermóide de boca. [tese]. Porto Alegre, (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2008.
64. Toneto MG. Análise imunoistoquímica da expressão do fator tecidual e da densidade microvascular no câncer gástrico: correlação com fatores prognósticos e sobrevida [tese]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2006.
65. Fillmann LS. A expressão do fator tecidual no adenocarcinoma colo-retal: relação com angiogênese e aspectos clínico-patológicos [tese]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2006.

5 Artigo Científico

O presente artigo foi submetido para análise no periódico *Journal of Urology*- fator de impacto 4,02 (ISI Web of knowledge, *apud* Research Gate, 2013).

The Journal of Urology
Increased Tissue Factor Expression is an Independent Predictor of Mortality in Clear Cell Carcinoma of the Kidney
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Increased Tissue Factor Expression is an Independent Predictor of Mortality in Clear Cell Carcinoma of the Kidney
Article Type:	Investigative Urology Article
Keywords:	Key Words: Kidney neoplasms, thromboplastin, prognosis, mortality
Corresponding Author:	Gustavo Franco Carvalho, M.D., Ph.D. Pontifícia Universidade Católica Porto Alegre, RS BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Pontifícia Universidade Católica
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Daniel D'Oliveira Silva, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Daniel D'Oliveira Silva, M.D. Vinicius Duval da Silva, M.D., Ph. D. Gustavo Franco Carvalho, M.D., Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	<p>Purpose: increased expression of tissue factor (TF), a primary initiator of the extrinsic coagulation pathway, has been associated with a worse prognosis in a variety of solid tumours. We report for the first time the correlation of the immunohistochemical expression of tissue factor with clinical and pathological outcomes in clear cell carcinomas of the kidney.</p> <p>Material and Methods: immunohistochemical expression of tissue factor was evaluated in 58 paraffin-embedded samples of clear cell carcinomas of the kidney treated at the same university hospital, and was correlated with clinical and pathological variables and with overall survival.</p> <p>Results: high intensity tissue factor expression (TF area > 40 µm²) was observed in 22.4% of the tumours (13 patients), and was the most important predictor of overall mortality, both in univariate and multivariate analysis ($p < 0.001$). Median overall survival for both groups was 65 months; 78.2 months for patients in the group of lower TF expression and 24.0 months for the patients in the group of higher TF expression (log rank $p < 0.001$). The hazard ratio for mortality was 7.2 (CI 3.0-17.6) for tumours with increased TF expression.</p> <p>Conclusions: Increased TF expression by immunohistochemistry was the most important independent prognostic factor of mortality in a contemporary cohort of patients with renal cell carcinoma. Further studies are necessary to define the role of TF in clinical practice.</p>
Suggested Reviewers:	William J Catalona, M.D., Ph.D. Northwestern University wcatalona@nmff.org Acknowledges the research line and previous researches in the field, has published on TF and prostate cancer
Opposed Reviewers:	

----- Mensagem original -----

Assunto: JU Article
Data: 9 Jan 2013 12:17:19 -0500
De: Journal of Urology <publications@auanet.org>
Para: Gustavo Franco Carvalhal
<gcarvalhal@terra.com.br>

Jan 09, 2013

Dear Dr. Carvalhal:

Your manuscript entitled Increased Tissue Factor Expression is an Independent Predictor of Mortality in Clear Cell Carcinoma of the Kidney has been received by *The Journal of Urology* and assigned manuscript number: JU-13-55.

You will be able to check on the status of your paper by logging into Editorial Manager as an Author at <http://ju.edmgr.com/>. Your login information is:

Your username is: gcarvalhal
Your password is: carvalhal547

Thank you for submitting your manuscript to *The Journal of Urology* .

Sincerely yours,

Mrs. Deborah F. Polly
Executive Editor
Director of Publications
American Urological Association

Increased Tissue Factor Expression is an Independent Predictor of Mortality in Clear Cell Carcinoma of the Kidney

Daniel D'O. Silva, Vinicius D. da Silva and Gustavo F. Carvalhal

From the Departments of Urology (DDS, GFC) and Pathology (VDS), Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre, Brazil

Address for correspondence: Barão de Mauá, 300, casa 53, Canoas, RS, Brazil, 92200-560. (Phone: 55 51 33391211; Fax: 55 51 33361043; email:danieldosilva@yahoo.com.br)

Runninghead: tissue factor predicts mortality in kidney cancer

Abbreviations and Acronyms

TF = tissue factor

RCC = renal cell carcinoma

RBG = red, blue and green

ELISA = enzyme linked immunosorbent assay

PCR = polymerase chain reaction

TFPI = tissue factor protein inhibitor

PAR2 = protease-activated receptor 2

VEGF = vascular endothelial growth factor

Key Words: Kidney neoplasms, thromboplastin, prognosis, mortality

Purpose: increased expression of tissue factor (TF), a primary initiator of the extrinsic coagulation pathway, has been associated with a worse prognosis in a variety of solid tumours. We report for the first time the correlation of the immunohistochemical expression of tissue factor with clinical and pathological outcomes in clear cell carcinomas of the kidney.

Material and Methods: immunohistochemical expression of tissue factor was evaluated in 58 paraffin-embedded samples of clear cell carcinomas of the kidney treated at the same university hospital, and was correlated with clinical and pathological variables and with overall survival.

Results: high intensity tissue factor expression (TF area $\geq 40 \mu\text{m}^2$) was observed in 22.4% of the tumours (13 patients), and was the most important predictor of overall mortality, both in univariate and multivariate analysis ($p < 0.001$). Median overall survival for both groups was 65 months; 78.2 months for patients in the group of lower TF expression and 24.0 months for the patients in the group of higher TF expression (log rank $p < 0.001$). The hazard ratio for mortality was 7.2 (CI 3.0-17.6) for tumours with increased TF expression.

Conclusions: Increased TF expression by immunohistochemistry was the most important independent prognostic factor of mortality in a contemporary cohort of patients with renal cell carcinoma. Further studies are necessary to define the role of TF in clinical practice.

INTRODUCTION

Renal cell carcinomas are responsible for 2-3% of all solid malignancies, and its incidence and mortality rates have been increasing over the last decades. It is a highly lethal neoplasm, with estimated 64,000 new cases and 13,000 deaths in the U.S. for 2012.¹ Clear cell carcinomas represent 85-90% of all renal cell cancers, and are usually associated with increased mortality.² Most renal tumours diagnosed nowadays are small solid lesions, incidentally discovered during imaging tests such as abdominal ultrasounds or computerized tomography scans, which when adequately treated may yield up to 95% 5-years cancer specific survival rates.³ However, a substantial proportion of cases (up to 30%) are still diagnosed in the metastatic setting, in which cure is rarely possible and less than 5-10% of 5-year cancer-specific survival is expected.⁴ Many pre and postoperative prognostic factors have been reported in renal cell carcinomas, such as tumour size, clinical and pathological stage, Fuhrman grade, among others. However, none of these factors, isolated or in association can predict with certainty which tumours will eventually recur and affect patients' survival.⁴ Thus, a continuous search for novel prognostic markers in renal cell carcinomas is justified, to better predict prognosis and to plan more efficacious, individualized therapeutic strategies.

The association between cancer, coagulation and thrombosis was first reported in 1865, when Armand Trousseau described an increased rate of thrombotic events in patients with gastrointestinal tumors.⁵ Further studies revealed that one of the pivotal agents involved in this association was tissue factor, or thromboplastin.⁶ A trans-membrane glycoprotein, tissue factor (TF) is responsible for the initiation of the extrinsic coagulation pathway. TF is abundant in the sub-endothelial layer of blood vessels and in tissues surrounding most internal organs, in which it supposedly acts as a natural haemostatic barrier.⁷ When exposed, TF initiates the coagulation cascade, resulting in fibrin formation. Increased expression of TF was

also described in tumour cells of a variety of solid neoplasms, including melanomas,⁸ breast,⁹ prostate,¹⁰ lung,¹¹ ovarian,¹² gastrointestinal,¹³ bladder and renal cancers.¹⁴ In some studies, increased TF expression was correlated to worse clinical outcomes.⁸⁻¹³ We have recently reported on the positive association between increased TF expression and poor prognosis in patients with Wilms tumors.¹⁵ We now describe the expression of TF by immunohistochemistry in clear cell carcinomas of patients with a minimum follow-up of five years after the initial treatment, correlating TF expression with clinical and pathological variables, and with overall survival.

MATERIALS AND METHODS

Our initial cohort was composed of 60 patients with clear cell carcinoma of the kidney diagnosed and treated at a University hospital in southern Brazil (Hospital São Lucas) from 2004 to 2007 with either partial or radical nephrectomy. We excluded from analysis two patients in whom paraffin blocks were unavailable or considered inadequate for analysis due to insufficient tumour tissue; thus, our final study group consisted of fifty-eight patients (N=58). We considered as variables age at the time of diagnosis, gender, Fuhrman grade, TNM stage (2010) and TF expression. Overall survival was considered the main outcome measure.

Patients' age at the time of diagnosis was registered in months and years. For statistical analysis, we considered three months as 0.25, six months as 0.50, and nine months as 0.75 years.

Histological grade was ranked in four categories (I-IV) as defined by Fuhrman,¹⁶ and the same pathologist (VDS) reviewed all pathology slides. The 2010 TNM was used for both

clinical and pathological staging. The attending surgeon determined the surgical approach (partial or radical nephrectomy) in each case.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical analysis was performed in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples. Five-micron sections were cut onto coated slides and deparaffinated by routine techniques. Analysis of TF expression was performed in a blinded manner, using a Zeiss Axioskop 40[®] (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) optical microscope at a magnification of 100X and Image Pro Plus 4.5.1[®] image analysis software (Media Cybernetics, Rockville, U.S.A.). Samples of prostate carcinoma were used as positive and negative controls of TF expression.

Immunohistochemical expression of TF was evaluated with a quantitative methodology, selecting and digitizing microscopic fields where there was positive staining at 100X magnification without imaging superposition.¹⁷ The number of images selected for each case varied from one to five. Each image file had a total area of 361,918 μm^2 . In all images captured, analyses were performed with a 24-bit colour selection method, with the creation of RGB colour reference files, which were applied to all images to define the measurement area, as shown in figure 1.¹⁸ Results were expressed in μm^2 . We defined high or low immunohistochemical expression of TF according to the median of the areas measured in all cases. Three independent observers agreed with the selection process of the areas examined in all cases.

Clinical, pathological, and follow up data was obtained through chart reviews and, whenever required, telephone contacts or active residence search.

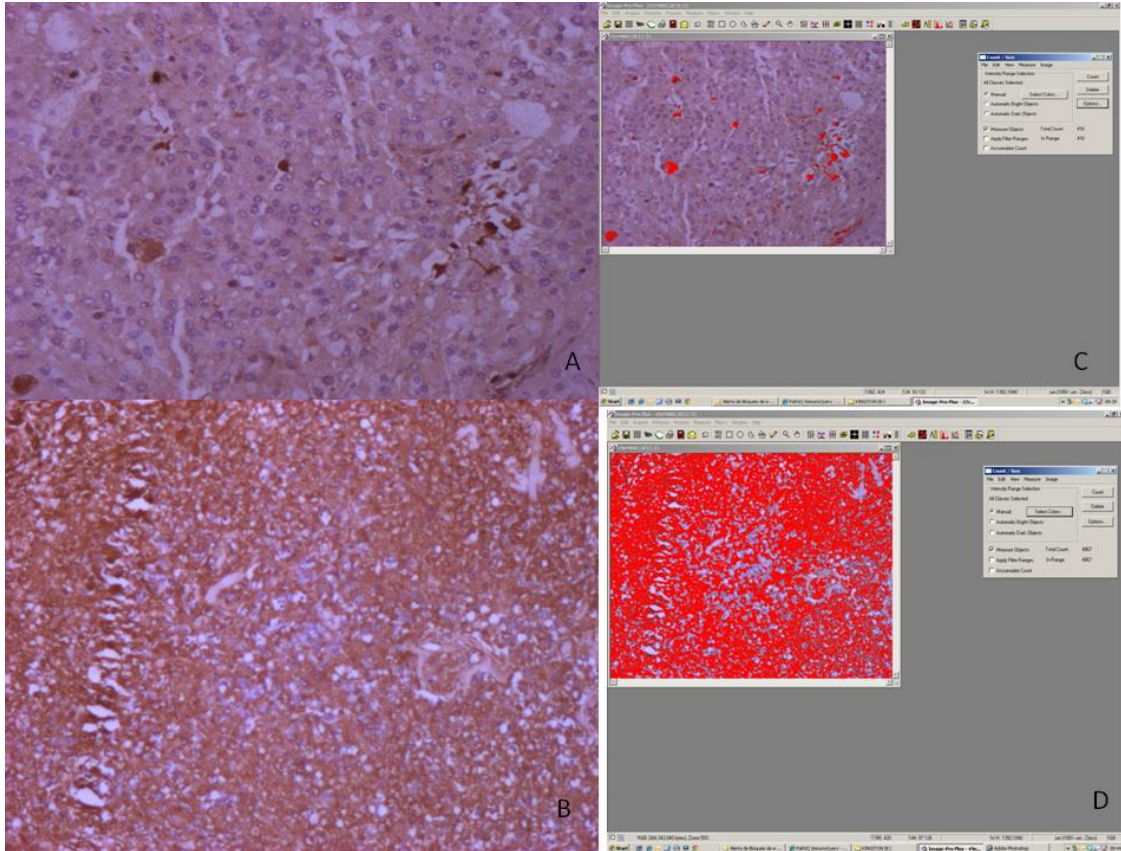


Figure 1. TF staining in renal cell carcinoma. *A* Low staining for TF expression (area < 40 μm^2) in RCC tumour; *B* High intensity of staining for TF (area \geq 40 μm^2) in RCC tumour (reduced from X100). *C* and *D* images captured with 24 bit select colours (RGB) both in low and high intensity of staining for TF. The selected areas are marked in red.

Statistical Analysis and Ethics

Continuous data were described using mean and standard deviation. For asymmetric data we used median and inter-quartile range. Categorical data were expressed using counts and percentages. Baseline features were compared using Student's *t* test for continuous data and chi-square tests for categorical data. A survival analysis was conducted using Kaplan-Meier method followed by log rank test for comparison between groups. A multivariable analysis

based on the Cox regression model was used to adjust for confounding ($p < 0.005$). Data were analysed using SPSS version 18.0[®]. The study protocol was reviewed and approved by the ethics committee at the University Hospital.

RESULTS

Clinical and pathological variables of the patients in our cohort are shown in table 1 (N=58). Most patients were male (n=40; 69.1%), and mean age was 58.8 years (31-91 years). Mean tumour size was 6.1 cm (range 2.1-19.0 cm). Regarding Fuhrman, 13 patients (22.4%) were grade I, 28 (48.0%) were grade 2, 10 (17.2%) were grade 3 and 7 (12.0%) were grade 4. At diagnosis, 28 patients (50.0%) were TNM stage I, six (10.7%) were stage II, 15 (26.7%) were stage III, and seven (12.5%) were stage IV. TNM data was missing for two patients. Stratification of the immunohistochemical expression of TF was done according to the intensity of TF staining, with a cut off point of $40\mu\text{m}^2$.

The groups of patients with low and high intensity of TF staining were homogeneous for age, gender and tumour size (all $p > 0.05$; table 1). Patients with high intensity of TF staining had a greater proportion of less differentiated tumours (Fuhrman grades 3 and 4; $p < 0.05$) and of higher pathological stages (TNM 3 and 4; $p < 0.002$).

Table 1 – Patients characteristics.

Characteristics	Tissue Factor		p
	$\geq 40 \mu\text{m}^2$ n = 13	$< 40 \mu\text{m}^2$ n = 45	
Age, years	58.8 \pm 8.8	58.8 \pm 14.4	0.994 ^[a]
Male sex, n (%)	9 (69.2)	31 (68.9)	0.632 ^[b]
Tumour size, cm	7.2 \pm 2.2	5.8 \pm 3.2	0.149 ^[a]
Fuhrman grade, n (%)			0.019 ^[b]
1	2 (15.4)	11 (24.4)	
2	4 (30.8)	24 (53.3)	
3	2 (15.4)	8 (17.8)	
4	5 (38.5)	2 (4.4)	
TNM stage, n (%)*			0.002
I	1 (8.3)	27 (61.4)	
II	2 (16.7)	4 (9.1)	
III	5 (41.7)	10 (22.7)	
IV or more	4 (33.3)	3 (6.8)	

Legend: Data are presented as mean \pm standard deviation or counts (%).

TNM: TNM staging classification for renal cell carcinoma. * TNM data missing for 2 patients. p: statistical significance, [a]: Student's t test, [b]: Fisher's exact test.

In our cohort, 21 patients died during follow-up (36.2%). Seven patients (12.0%) were metastatic at diagnosis, all of whom have died of the disease, eight developed recurrences during follow-up, and subsequently died (13.7%), four (6.8%) died of unrelated causes during follow-up and two (3.4%) died in the postoperative period of complications associated with the surgical procedure. Forty-five patients had low intensity expression of TF (77.6%), while 13 patients had high intensity expression of TF (22.4%) in the immunohistochemical analyses. Median overall survival was 65 months; 78.2 months for patients in the group of lower TF expression and 24.0 months for the patients in the group of higher TF expression (log rank $p < 0.001$; fig. 2). Increased TF expression was statistically associated to decreased survival, as shown in figure 2.

Figure 2. Overall survival curves for patients with lower and higher TF staining.

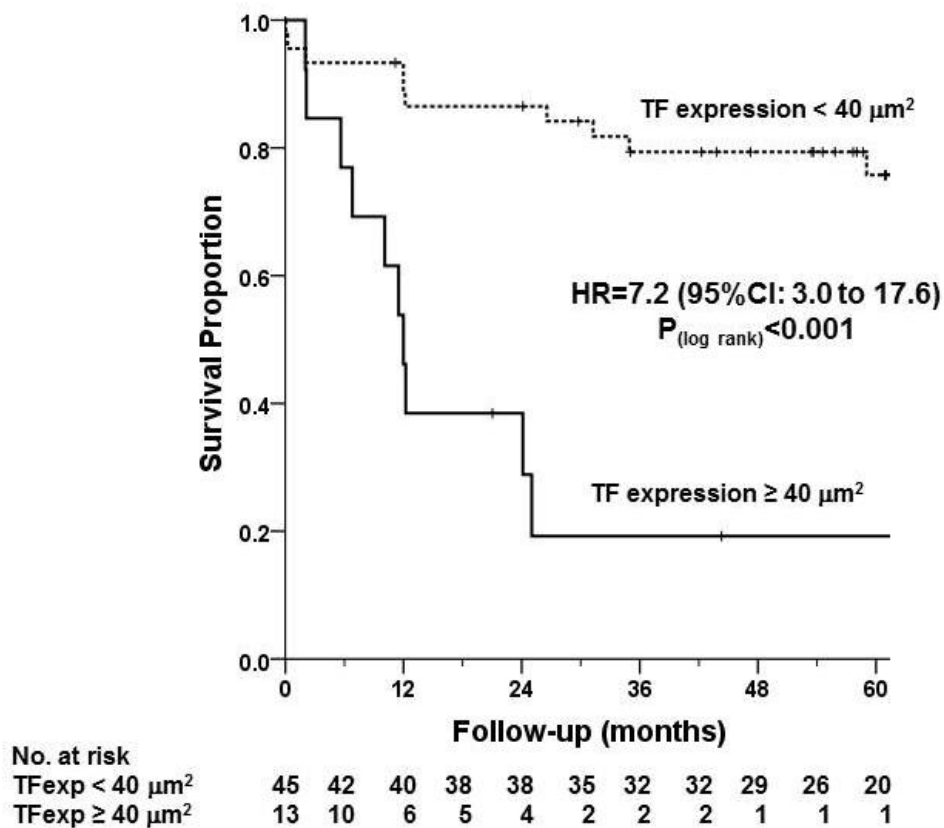


Figure 2 – Kaplan-Meier curves representing survival for renal cancer patients comparing those with high ($\geq 40 \text{ mm}^2$) vs. low ($< 40 \text{ mm}^2$) tissue factor expression.

To further assess the impact of the intensity of TF staining as a significant predictor of mortality, we performed a multivariable regression analysis adjusted for some of the reported prognostic factors in renal cell carcinomas, such as patients' age, tumour size, gender, TNM stage, and Fuhrman grade. In the multivariable model, increased TF expression remained as the most important independent prognostic factor for increased mortality (table 2).

Table 2 – Association of high intensity tissue factor expression and selected variables with death among renal cancer patients (patients=58, events=21).

Variable	Univariate Analysis			Multivariable Analysis		
	HR	95%CI	p	HR ^[a]	95%CI	P
Tissue factor expression $\geq 40 \mu\text{m}^2$	7.21	3.00 to 17.63	<0.001	8.20	2.66 to 25.33	<0.001
Age, years	1.03	0.98 to 1.05	0.351	1.04	1.00 to 1.08	0.074
Female sex	0.45	0.15 to 1.34	0.151	0.42	0.14 to 1.27	0.124
Fuhrman grade ≥ 3	1.88	0.79 to 4.47	0.156	0.95	0.35 to 2.59	0.924
Tumour size, cm	1.09	0.98 to 1.21	0.130	1.04	0.89 to 1.20	0.655
TNM stage III or more	3.77	1.51 to 9.38	0.004	2.37	0.84 to 6.70	0.105

[a]: Hazard ratio obtained in a Cox proportional hazards model including all listed factors; p: statistical significance; 95%CI: 95% confidence interval.

DISCUSSION

In spite of a recent shift towards earlier stage at presentation, mortality rates from clear cell carcinoma of the kidneys are increasing. Such trend may be explained by the fact that a considerable proportion of cases are advanced at diagnosis, and it is known that even small lesions of less than 4 cm in diameter present with metastasis in 4-7% of cases.¹⁹ In our study, 12% of patients had metastatic disease at presentation. This is similar to most international series,^{20,21} but compares favourably with the statistics published by the Brazilian National Institute of Cancer, in which roughly 20% of cases were metastatic at diagnosis.²²

Most our cases were treated by radical nephrectomy (77.5%), whereas partial nephrectomies were performed in 22.5%. The proportion of partial nephrectomies has been increasing over the years globally in face of smaller tumours at diagnosis; however, partial nephrectomies are still outnumbered by radical nephrectomies in most series, and ours is no exception.²³ Our perioperative mortality rate was 3.4% (2/58), higher than that of most recently published surgical series of radical and partial nephrectomies (around 0.9%),²⁴ but we have to consider that one of our patients who died in the first postoperative day was an octogenarian. In one of the largest series of nephrectomies in octogenarians, Berger et al²⁵ reported a 38% morbidity rate and a 3.3% operative mortality rate, and advise caution in indicating renal surgery at this age range.

In spite of many prognostic factors available for renal cell carcinoma, it still not possible to accurately identify which patient will have a favourable or an unfavourable outcome. The best tools to predict mortality from renal cell carcinoma yield c-indexes (concordance indexes) of 88%.²⁰ Clearly, new markers need to be unveiled in order to improve prognostic accuracy in renal cell cancer. Increased immunohistochemical expression of TF was associated with worse outcomes and mortality rates in many solid neoplasms (melanomas, breast, prostate, lung, ovarian, gastrointestinal).⁸⁻¹³ Additionally, we have recently published that in Wilms' tumours, the most common kidney neoplasms in children, an increased immunohistochemical expression of TF was the most important predictor of tumour recurrence and mortality.¹⁵ In renal cell carcinomas, to our knowledge this is the first study reporting TF expression by immunohistochemistry in the indexed literature. In 2003, Forster et al¹⁴ have published a study in which they reported TF expression by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) test and by a LightCycler™ polymerase chain reaction (PCR) assay both in malignant and benign tissues of patients with prostate, bladder and renal cell carcinomas (18 patients with RCC). With these methodologies, they have found a greater expression of TF in the normal tissues in comparison to the neoplastic samples. In the same study, the authors tested for serum TF expression in 75 patients with RCC and 92 normal age-matched controls, and could not detect a significant difference.¹⁴ However, the authors did not correlate their findings with clinical outcomes.

We believe that our findings are important since we present for the first time the correlation of TF expression with clinical outcomes in RCC. Moreover, we have shown that, although expressed in a minority of RCCs (22.4%), TF was the most significant predictor of mortality in our cohort, with a very high hazard ratio (HR 7.2; CI 3.0-17.6). When tested for possible confounding factors in the multivariable analysis, the importance of TF expression in predicting mortality was enhanced even further (HR 8.2; CI 2.6-25.3). The possibility of a new prognostic factor in RCC is by itself a novelty, but we believe that the existing prediction models may further increase their accuracy by including this marker, which should be a subject of future studies.

A potential therapeutic role for anti-TF therapies is currently being investigated in a variety of ways. It is believed that tumour TF may induce the coating of tumour cells with fibrin, trapping the cells in the microvasculature and enhancing the process of hematogenous

metastasis. In this regard, at least two experimental studies in mice have shown that blockage of the TF pathway with anti-TF antibodies or with tissue factor protein-inhibitor (TFPI) has reduced the incidence of pulmonary metastases.^{26,27} Additionally, it is believed that the coupling of TF with coagulation factor VIIa and protease-activated receptor 2 (PAR2) drives angiogenesis through the production of factors such as the vascular endothelial growth factor (VEGF). The blockage of this specific pathway is the target of two new drugs currently being tested in phase II in pancreatic cancer and other solid tumours.^{28,29} Positive results in these trials may enhance the therapeutic arsenal for cancers in which TF plays an important role, such as RCC.

The methodology employed in the quantification of the immunohistochemical expression of TF was new to our group. In previous studies, we used a semi-quantitative method of limited reproducibility, in which the observers determined scores based on the intensity of TF expression through visual analysis of the slides, from grades I (0-25% of cells intensely expressing TF) through IV (>75%).^{10, 15} In the present study we opted to perform a quantitative method internationally validated which measures an area unit (μm^2).³⁰ The availability of ever more sophisticated software for image analysis such as the Image Pro Plus[®] allows for fewer measurement biases and more accurate reproducibility.

Our study has several caveats that may compromise the generalization of its findings. First, it is a retrospective study, with the implied limitations in data collection. Second, the immunohistochemical staining was performed in paraffin-embedded tissue stored at the department of pathology for at least five years. Third, the small number of patients (58) may obviate definitive conclusions. Additional studies with prospective data collection, complementary molecular methodologies and a larger number of patients are needed to validate and further advance on our findings.

CONCLUSION

Increased TF expression by immunohistochemistry was the most important independent prognostic factor of mortality in a contemporary cohort of patients with renal cell carcinoma. Further studies are necessary to define its role in clinical practice.

REFERENCES

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A: Cancer statistics, 2012. *CA: Cancer J Clin* 2012; **62**:10.
2. Novara G, Martignoni G, Ficarra V et al: Grading systems in renal cell carcinoma. *J Urol* 2007; **177**: 430.
3. Sun M, Shariat SF, Cheng C et al: Prognostic factors and predictive models in renal cell carcinoma: a contemporary review. *Eur Urol* 2011; **60**: 644.
4. Tsui KH, Shvarts O, Belldegrun A et al: Prognostic indicators for renal cell carcinoma: a multivariate analysis of 643 patients using the revised 1997 TNM staging criteria. *J Urol* 2000; **163**:1090.
5. Anand M and Brat DJ: Oncogenic regulation of tissue factor and thrombosis in cancer. *Thromb Res* 2012; **129**: S46.
6. Kasthuri RS, Taubman MB and Mackman N: Role of tissue factor in cancer. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 4834.
7. Kocaturk B and Versteeg HH: Tissue factor isoforms in cancer and coagulation: may the best isoform win. *Thromb Res* 2012; **129**: S69.
8. Mueller BM, Reisfeld RA, Edgington TS et al.: Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 11832.
9. Ueno T, Toi M, Tominaga T et al: Tissue factor expression in breast cancer tissues: its correlation with prognosis and plasma concentration. *Br J Cancer* 2000; **83**: 164.
10. Abdulkadir SA, Carvalhal GF, Milbrandt J et al: Tissue factor expression and angiogenesis in human prostate carcinoma. *Hum Pathol* 2000; **31**: 443.
11. Sawada M, Miyake S, Ohdama S et al: Expression of tissue factor in non-small-cell lung cancers and its relationship to metastasis. *Br J Cancer* 1999; **79**: 472.
12. Han LY, Landen CN Jr, Sood AK et al: Preoperative serum tissue factor levels are an independent prognostic factor in patients with ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 755.
13. Yu JL, May L, Rak JW et al: Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* 2005; **105**: 1734.

14. Forster Y, Meye A, Schwenger B et al: Tissue specific expression and serum levels of human tissue factor in patients with urological cancer. *Cancer Lett* 2003; **193**: 65.
15. Maciel EO, Carvalhal GF, Garicochea B et al: Increased tissue factor expression and poor nephroblastoma prognosis. *J Urol* 2009; **182**: 1594.
16. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C: Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982; **6**: 655.
17. Vartanian RK, and Weidner N: Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma. *Am J Pathol* 1994; **144**: 1188.
18. Larsen JO, Gundersen HJ and Nielsen J: Global spatial sampling with isotropic virtual planes: estimators of length density and total length in thick, arbitrarily orientated sections. *J Microsc* 1998; **191**: 238.
19. Lughezzani G, Jeldres C, Isbarn H et al: Tumor Size is a Determinant of the Rate of Stage T1 Renal Cell Cancer Synchronous Metastasis. *J Urol* 2009; **182**: 1287.
20. Karakiewicz PI, Suardi N, Capitanio U et al: Conditional Survival Predictions After Nephrectomy for Renal Cell Carcinoma. *J Urol* 2009; **182**: 2607.
21. Frank I, Blute ML, Chevillat JC et al: An Outcome Prediction Model for Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma Treated with Radical Nephrectomy Based on Tumor Stage, Size, Grade and Necrosis: The Ssign Score. *J Urol* 2002; **168**: 2395.
22. Ornellas AA, Andrade DM, Schwindt ABS et al: Prognostic factors in Renal cell carcinoma: analysis of 227 patients treated at the Brazilian National Cancer Institute. *Int Braz J Urol* 2012; **38**: 185.
23. Kim SP, Shah ND, Leibovich BC et al: Contemporary trends in nephrectomy for renal cell carcinoma in the United States: results from a population based cohort. *J Urol* 2011; **186**: 1779.
24. Abdollah F, Sun M, Karakiewicz PI et al: Mortality and morbidity after cytoreductive nephrectomy for metastatic renal cell carcinoma: a population-based study. *Ann Surg Oncol* 2011; **18**: 2988.
25. Berger J, Fardoun T, Descazeaud A et al: Detailed analysis of morbidity following nephrectomy for renal cell carcinoma in octogenarians. *J Urol* 2012; **188**: 736.
26. Amirkhosravi A, Meyer T, Chang JY et al: Tissue factor pathway inhibitor reduces experimental lung metastasis of B16 melanoma. *Thromb Haemost* 2002; **87**: 930.
27. Mueller BM, Ruf W: Requirement for binding of catalytically active factor VIIa in tissue factor-dependent experimental metastasis. *J Clin Invest* 1998; **101**: 1372.

28. Hedrick E. Study of safety and tolerability of PCI-27483 in patients with pancreatic cancer patients receiving treatment with gemcitabine (www.clinicaltrials.gov; Bethesda, MD: National Library of Medicine). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01020006> Last assessed in 02 January 2012
29. Wong HC. A study of ALT-386 in combination with gemcitabine for locally advanced or metastatic solid tumors (www.clinicaltrials.gov; Bethesda, MD: National Library of Medicine). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01325558> Last assessed in 02 January 2012
30. Irion LC, Prolla JC, Da Silva VD et al: Angiogenesis in non-small cell lung cancer: microvessel area in needle biopsy in vascular tumor density. *Anal Quant Cytol Histol* 2008; **30**:83.

6 Considerações Finais

O presente estudo foi realizado com propósito de descrever a expressão imunoistoquímica do fator tecidual em carcinoma de células claras de rim, o que até o presente momento é um fato inédito. Ao mesmo tempo, buscamos tentar correlacionar a expressão imunoistoquímica de FT com fatores prognósticos já estabelecidos neste tipo de neoplasia e com mortalidade.

Penso que nossos objetivos foram plenamente estabelecidos. Conseguimos descrever a expressão do FT no carcinoma de células claras de rim, nos quais em 22,4% dos casos houve expressão imunoistoquímica elevada e em 77,6% houve baixa expressão. Estes dados podem ser atribuídos a um predomínio de casos iniciais em nossa casuística, sendo onde tivemos apenas 12% dos casos metastáticos quando do diagnóstico. Entretanto, apesar do número reduzido de casos com expressão elevada de TF, esta foi o fator prognóstico de mortalidade mais importante, com um HR (*Hazard Ratio*) de 7.2. na análise estatística. Isto significa que, caso o paciente apresente uma área com expressão de FT acima de $40\mu\text{m}^2$ na lâmina, ele tem 7 vezes mais chances de morrer do que se tiver uma área menor que $40\mu\text{m}^2$. Além disso, quando os fatores já estabelecidos de prognóstico, como TNM e grau de Fuhrmann, foram incluídos na análise multivariada para minimizar potenciais fatores de confusão, estes aumentaram o poder estatístico de prever mortalidade do FT (HR=8.2).

Tivemos algumas dificuldades neste estudo. Em primeiro lugar, o fato de ser um trabalho retrospectivo trouxe problemas na coleta de dados. Prontuários com preenchimento incompleto e perda de pacientes durante o seguimento aconteceram, como já era esperado. Nossa análise utilizou tumores fixados em blocos de parafina com mais de cinco anos de armazenamento, nos quais problemas na realização da imunoistoquímica são potencialmente mais frequentes. Outras dificuldades ocorreram no processo de aquisição dos reagentes. Tivemos que fazer a importação do kit de análise imunoistoquímica para o FT, uma vez que o mesmo não é produzido comercialmente no Brasil. A data de entrega coincidiu com uma paralisação da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e da Polícia Federal que durou aproximadamente três meses. Os reagentes não ficaram armazenados em gelo seco como deveria ocorrer. Nisto, todo o material foi perdido. Em função disto, fizemos novo

pedido e somente pudemos realizar análise das lâminas após seis meses da solicitação inicial dos reagentes.

Acreditamos que novos estudos com FT deverão ser realizados. Nosso grupo tem realizado pesquisas com esta proteína desde 2002 e esperamos com o desenvolvimento de novas técnicas moleculares, progredir, e tentar avaliar a importância do FT como um marcador sorológico em carcinoma de células claras de rim, uma vez que estes tumores não apresentam marcadores séricos úteis na prática clínica.

7 Anexos

7.1 Anexo A-Aprovação Comissão Científica



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

Of. 544/11-PG

Porto Alegre, 08 de setembro de 2011.

Ao Pós-Graduando
Daniel D Oliveira Silva
N/Faculdade

Prezado Pós-Graduando:

Comunicamos que a proposta de dissertação intitulada "AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO FATOR TECIDUAL (FT) NO CARCINOMA DE CÉLULAS CLARAS DE RIM" **foi aprovada** pela Comissão Científica do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde.

A mesma deverá ser encaminhada ao Comitê de Ética em Pesquisa ou Comissão de Ética no Uso de Animais, através do setor de **Pesquisas e Estágios**, 2º andar do Hospital São Lucas/PUCRS. Após aprovação do CEP ou CEUA entregar cópia na secretaria do Programa. Em anexo, cópia da avaliação.

Atenciosamente,


Profa. Dr. Magda Lahorgue Nunes
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Medicina e Ciências da Saúde

C/c: Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalho

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - P. 60 - 3º andar - CEP 90610-000
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3318 - Fax (51) 3320-3316
E-mail: medicina-pg@pucrs.br
www.pucrs.br/famed/pos

7.2 Anexo B -Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF. CEP- 086/12

Porto Alegre, 13 de janeiro de 2012.

Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 11/05730 intitulado **"Análise da expressão imunohistoquímica do fator tecidual no carcinoma de células claras de rim"**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Gustavo Franco Carvalhal
HSL
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000
Sala 314 - Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

7.2 Anexo B -Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)-cont.

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER

Cadastro do Projeto CEP/PUCRS
11/05730

Título:
Análise da expressão imunohistoquímica do fator tecidual no carcinoma de células claras de rim

Pesquisador Responsável:
Gustavo Franco Carvalhal

Aspectos Científicos e Metodológicos
Análise retrospectiva em banco de tecidos.

Aspectos Éticos
É um estudo descritivo, retrospectivo, em banco de tecidos humanos obtidos a partir de nefrectomias radicais realizadas no hospital São Lucas/PUCRS. Documentação correta.

Recomendação
Aprovar

Considerações Gerais
Todos os documentos solicitados foram entregues

Data do Parecer 13/01/2012

7.3 Anexo C-Termo de Compromisso para Utilização de Dados

TERMO PARA COMPROMISSO DE UTILIZAÇÃO DE DADOS

Titulo: “Análise da Expressão Imunoistoquímica do Fator Tecidual em Carcinoma de Células Claras de Rim”.

Os autores do presente projeto de pesquisa se comprometem a manter o sigilo dos dados coletados em prontuário, bases de dados e lâminas histopatológicas referentes a pacientes atendidos no Hospital São Lucas da PUCRS. Concordam igualmente que, estas informações serão utilizadas única e exclusivamente com finalidade científica, preservando-se integralmente o anonimato dos pacientes.

Porto Alegre 26 de setembro de 2011

Autores do Projeto

Gustavo Franco Carvalhal

Daniel D Oliveira Silva

Vinicius Duval da Silva

7.4 Anexo D- Protocolo de Pesquisa

PROTOCOLO DE PESQUISA” ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO FATOR TECIDUAL EM CARCINOMA RENAL”

NOME PACIENTE

DATA NASC:

REGISTRO

SEXO

IDADE

NUMERO PATOLOGIA

HTC-HB PRE:

CREAT:

TAMANHO TUMOR TC OU RNM

LOCAL DA LESÃO:

ESTADIAMENTO PRE OP

METASTASES AO DIAGNOSTICO S() N()

DATA CIRURGIA

CIRURGIA: NEFRECTOMIA PARCIAL() RADICAL () VLP()

RESSECÇÃO COMPLETA S() N()

TRANSFUSÃO S() N()

LAUDO AP---TAMANHO TUMOR

MARGENS COMPROMETIDAS S () N()

INVASÃO MICROVASCULAR S() N()

INVASÃO LINFÁTICA S() N()

INVASÃO SEIO RENAL S() N()

ADRENALECTOMIA S() N() - SIM COM DOENÇA () SEM DOENÇA()

FUHRMANN

NECROSE TUMORAL S() N()

ESTADIAMENTO TNM

CREATININA POS

COMPLICAÇÕES PÓS-OP S() N()

FENÔMENOS TROMBOEMBÓLICOS S() N()

RESCIDIVA—LOCAL S() N()

TEMPO APÓS CX

RESCIDIVA SISTÊMICA S() N()

TEMPO APÓS CX

ACOMPANHAMENTO TOTAL EM MESES

ÓBITO S() N()

PERDA SEGUIMENTO S() N()

7.5 Anexo E-Banco de Dados

npac	Idade	sexo	tamanho	grau	acomp	obito	estadio	tnm	datacirurgia	datarecidiva	dataobito	dataultcons
12	59	1	4,4	2	58	2	3	5	21/2/07			3/8/12
31	40	1	3,2	1	21	2	1	1	19/1/09			12/11/10
34	43	1	2,5	2	71	2	1	1	20/3/06			5/7/11
3	31	1	5,5	1	60	2	1	2	27/9/04			5/7/12
58	77	2	9	2	24	2	2	5	10/8/05			12/8/10
2	76	2	4	2	80	2	1	2	18/7/05			17/8/11
15	72	1	5,8	3	44	2	1	10	13/1/05		3/9/08	
11	46	2	2,8	1	30	2	1		24/1/05			6/7/07
17	50	1	6,8	1	60	2	1	2	26/8/04			2/6/09
60	58	1	9	2	2	2	2	3	12/4/06		15/6/2006	
26	53	1	7,6	3	64	1	2	5	20/3/06	2/1/12	6/6/12	
16	55	1	11	4	48		3	4	18/7/05			5/7/09
24	69	1	10	2	24	1	4	10	27/5/04		2/8/06	
54	55	2	5	1	24	2	1	5	14/9/07			6/6/09
42	64	2	4,5	4	48	1	1	5	30/6/06	1/1/10	6/5/11	
14	61	1	10	3	21	1	2	8	6/10/04		2/5/07	
4	89	1	5	2	60	2	1	2	23/8/04			5/7/12
25	61	1	9,6	3	12	1	3	7	16/8/04	16/8/05	16/8/05	
36	46	2	5	2	95	2	1	2	6/12/04			6/11/2012
6	58	1	7	1	62		2	5	8/11/04			8/11/09
27	76	1	5,2	4	6	1	3	5	27/1/06	15/7/06	15/7/06	
41	55	2	9	4	12	1	2	5	15/8/05	15/8/06	16/8/06	
57	91	1	4,5	2	12		1	2	31/8/04		8/9/05	
13	59	1	5	2	60	2	1	5	3/10/05			3/8/12
40	81	1	3,5	1	1	1	1	1	26/9/05		27/9/05	
56	68	1	3	2	48	2	1	1	23/1/06			10/12/09
19	54	1	19	2	60	2	3	5	13/12/04			5/7/11
29	63	1	4,2	2	60	2	1	2	26/1/06			2/1/11
38	57	2	8	1	72	2	2	3	10/8/04			3/6/10

18	60	1	5	4	2	1	4	10	23/8/06		23/10/06	
10	67	1	4	3	55	2	1	1	8/2/07			10/9/11
49	40	1	2,5	2	59	2	1	1	7/2/07			5/7/11
53	61	2	3,5	2	53	2	1	1	20/7/06			10/12/10
47	67	1	4	2			1	2	15/5/06	30/6/06	30/6/06	
1	58	1	8	3	44	2	2	3	17/7/06			5/1/10
23	71	2	3,2	3	60	2	1	1	30/1/07			3/8/12
20	56	1	4,7	2	48	1	1	2	17/5/06	6/6/08	6/6/08	
5	66	1	2,3	2	66	2	1	1	9/10/06			5/7/11
22	58	2	8	3	60	2	2	2	26/5/06			26/5/11
33	40	1	6,8	2	60	2	2	2	10/1/07			5/7/11
55	50	1	9	2	1	1	2	5	8/1/07		8/2/07	
59	43	1	6	2	4	2	1	1	1/3/05		2/7/2005	
7	54	1	2,1	2	58	2	1	1	16/10/06			11/8/11
8	75	1	5,7	2	60	2	1	5	3/1/07			3/8/12
21	47	2	5,5	1	35	2	1	5	15/1/07			1/12/2009
51	66	1	6,7	2	10	1	3	5	3/2/05	03/12/05	03/12/05	
52	49	2	7,6	4	12	1	4	10	20/10/05		22/10/06	
48	54	1	3	2	24	2	1	1	10/5/05			4/5/07
32	64	2	11	2	7	1	4	10	25/7/05		14/2/06	
30	64	1	6	2	2	1	4	10	9/2/06		16/2/06	
44	45	1	6	1	60	2	4	10	23/3/06		3/3/07	
46	61	1	9,5	1	70	2	3	4	2/5/05			5/7/11
50	41	2	9,6	2	74	2	3	5	24/3/05			5/7/11
45	50	1	9,6	1	84	2	4	4	2/8/04			3/7/05
35	70	2	5,2	1	66	2	1	2	17/3/05			17/9/11
9	73	1	4,5	2	84	2	1	2	12/5/05			24/5/12
43	65	2	3	3	43	2	1	2	1/7/05			4/2/09
37	50	2	2,1	1	72	2	1	1	5/1/06			2/12/11
39	48	1	5,6	4	60	2	1	2	10/6/06			5/7/11
28	59	1	4,7	3	60	2	1	2	22/6/07			3/8/12