

André Octavio Nicolau Sanches

**IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA PREDITIVO DE RESPOSTA AO
SUNITINIBE, EM CARCINOMAS RENAIIS DE CÉLULAS CLARAS METASTÁTICOS**

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

Orientador: Prof. Dr Rui Manuel Vieira Reis

Barretos, SP
2020

S211i Sanches, André Octavio Nicolau.

Identificação do perfil de expressão gênica preditivo de resposta ao sunitinibe, em carcinomas renais de células claras metastáticos. / André Octavio Nicolau Sanches. - Barretos, SP - 2020.

116 f. : il.

Orientador: Rui Manuel Vieira Reis.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2020.

1. Carcinoma de células renais. 2. Sunitinibe. 3. Biomarcadores tumorais. 4. Expressão gênica. 5. Prognóstico. 6. Terapia de alvo molecular.
I. Autor. II. Reis, Rui Manuel Vieira. III. Título.

CDD 616.994

FICHA CATALOGRÁFICA

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

André Octavio Nicolau Sanches

Identificação do perfil de expressão gênica preditivo de resposta ao sunitinibe, em carcinomas renais de células claras metastáticos.

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: 18/12/2020

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Kátia Ramos Moreira Leite

Instituição: Faculdade de Medicina da USP

Prof. Dr. Rui Manuel Ferreira Henrique

Instituição: Universidade do Porto

Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Orientador

Prof. Dr. Flávio Mavignier Cárcano

Presidente da Banca Examinadora

Este trabalho recebeu apoio do Ministério Público do Trabalho (MPT).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão do MPT.

No presente trabalho o nome dos genes identificados foram anonimizados para possibilitar a futura proteção intelectual dos achados, seguindo o protocolo instituído pela Comissão de Proteção Intelectual do Hospital de Câncer de Barretos Fundação Pio XII.

"Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da 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. Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo".

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

Dedico esta dissertação a Deus, à minha esposa e minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à **Deus**, o centro e o fundamento de tudo em minha vida, pelo Seu amor infinito e fidelidade. Sem Ele nada sou.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis, pela oportunidade única de realizar este trabalho, pela confiança em mim depositada, dando-me a liberdade necessária e dividindo comigo as expectativas, conduziu-me a grandes reflexões, e desta forma, enriquecendo-me como pesquisador. Minha especial admiração e profunda gratidão.

Aos assessores das bancas, Prof. Dr. Rui Manuel Ferreira Henrique e Prof. Dr. Flávio Mavignier Cárcano, pela disposição e tempo, pelas oportunas contribuições, pelo direcionamento na caminhada ao longo destes 2 anos, e pelos brilhantes apontamentos, meus sinceros agradecimentos. O caminho foi mais equalizado com a condução de vocês.

Ao oncologista Luís Eduardo Rosa Zucca, pela ideia de prosseguir respondendo perguntas no campo das neoplasias renais, pela considerável ajuda na formação amostral, pela contribuição com a pesquisa inicial que deu origem a este estudo, e pela amizade, meu mais sincero apreço e gratidão.

Aos médicos patologistas Sandra Regina Morini da Silva e Frederico Adão de Oliveira Santana, por terem realizado toda a preparação e revisão das lâminas histopatológicas de forma tão eficaz.

Ao médico radiologista Fabiano Rubião Lucchesi, pela disponibilidade, boa vontade, presteza em realizar a análise técnica das imagens dos pacientes do estudo.

À bióloga Ana Carolina Laus, pela parceria, pelo tempo e dedicação empenhados em todas as etapas da avaliação molecular do presente trabalho. Sua atenção e cuidado nos processos de bancada foram inspiradores.

Minha gratidão a **bioinformata Luciane Sussuchi da Silva e ao bioestatístico Marcos Alves de Lima** pela parceria e apoio irrestrito das análises estatísticas e de bioinformática. Agradeço a disponibilidade, esmero e rigor técnico nas análises.

Ao Hospital do Amor, instituição que me formou como oncologista clínico, e que é um instrumento de comprometimento com a pesquisa, atendimento humanizado e excelência na assistência, meu genuíno agradecimento. Agradeço também o **Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM)** por abrir as portas para o desenvolvimento deste estudo, por ceder a infraestrutura e equipamentos em todas as etapas deste projeto.

À toda equipe da pós-graduação, que forneceram todos os subsídios didáticos e apoio para o progresso deste trabalho, bem como na organização das bancas, meu agradecimento.

A minha esposa Ana Paula Sanches, pelo incessante apoio e estímulo para avançar na pesquisa, e por me fazer acreditar que é possível, independente dos desafios do tempo. Obrigado.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia	1
1.2	Classificação	2
1.3	Fatores prognósticos	5
1.4	Tratamento	8
1.4.1	Sunitinibe	10
1.5	Biomarcadores	12
2	JUSTIFICATIVA	17
3	OBJETIVOS	18
3.1	Objetivo geral	18
3.2	Objetivos específicos	18
4	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1	Desenho e população do estudo	19
4.2	Critérios de elegibilidade	19
4.3	Critérios de exclusão	19
4.4	Coleta de dados	19
4.5	Variáveis	20
4.6	Definição dos grupos de resposta	21
4.7	Análise molecular	21
4.7.1	Extração de RNA	21

4.7.2	Análise da expressão gênica pela plataforma <i>Nanostring</i> .	23
4.8	Análise bioinformática	26
4.9	Análise estatística	27
4.9.1	Cálculo amostral	27
4.9.2	Método estatístico	28
5	RESULTADOS	29
5.1	Formação amostral	29
5.2	Características epidemiológicas e clínico-patológicas	30
5.3	Taxa de Resposta Global (TRG) e Objetiva (TRO)	32
5.4	Sobrevida Livre de Progressão (SLP)	32
5.5	Sobrevida Global (SG)	36
5.6	Perfil de expressão gênica	39
5.6.1	Controle de qualidade dos dados de <i>nanostring</i> e sua normalização	39
5.6.2	Perfil de expressão gênica diferencial entre os grupos de resposta	42
5.6.3	Curva ROC individual e combinada dos genes associados a resposta	45
5.6.4	Desfechos de sobrevida e perfil de expressão gênica diferencial	48
5.6.5	Escore de expressão gênica e desfechos de sobrevida.	50
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXOS	68

Anexo A – Sistema de Classificação TNM para câncer de rim 8ª edição (2017)	68
Anexo B – Eficácia de drogas alvo moleculares em CCR metastáticos	70
Anexo C – Ficha de coleta	71
Anexo D – Lista de genes do Painel " <i>nCounter progression panel</i> " e suas vias.	78
Anexo E – Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.	88
Anexo F – Documento comprobatório da situação do artigo científico.	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Taxa de incidência global para câncer renal, em ambos os sexos e todas as idades.	1
Figura 2 -	Classificação histológica do câncer de células renais.	3
Figura 3 -	Classificação histopatológica do grau nuclear de Furhman para o CCR.	6
Figura 4 -	Classificação de Risco IMDC (<i>International Metastatic Database Consortium</i>).	7
Figura 5 -	Principais alvos de inibição pelo sunitinibe.	10
Figura 6 -	Vias relacionadas aos genes que compõem o painel de progressão.	23
Figura 7 -	Cartucho (<i>nCounter Cartridge</i>).	24
Figura 8 -	<i>Workflow</i> para <i>nCounter® XT gene expression assays</i> .	26
Figura 9 -	Fluxo das amostras finais incluídas no estudo.	29
Figura 10 -	Frequência dos sítios de metástases.	31
Figura 11 -	Estimativa da sobrevida livre de progressão (Kaplan-Meier).	33
Figura 12 -	Kaplan-Meier da SLP e taxa de resposta ao tratamento.	34

Figura 13 -	Estimativa da sobrevida global (Kaplan-Meier).	36
Figura 14 -	Kaplan-Meier da sobrevida global relacionada a taxa de resposta ao tratamento.	38
Figura 15 -	Kaplan-Meier da sobrevida global relacionada ao IMDC.	38
Figura 16 -	Representação dos cartuchos com 12 amostras cada, diferenciados por cores.	39
Figura 17 -	Controles positivos lineares, e negativos agrupados.	40
Figura 18 -	Genes endógenos antes da Normalização.	41
Figura 19 -	Genes endógenos após da Normalização.	41
Figura 20 -	<i>Heatmap</i> com agrupamento de genes diferencialmente expressos de acordo ao grupo de resposta global.	43
Figura 21 -	<i>Heatmap</i> com agrupamento de genes diferencialmente expressos de acordo ao grupo de resposta objetiva.	44
Figura 22 -	Diagrama de Venn com os genes de resposta global e resposta objetiva ao tratamento.	44
Figura 23 -	Curvas ROC individuais.	46
Figura 24 -	Curva ROC combinada dos genes C3, N14 e R18 no grupo dos respondedores.	47

Figura 25 -	Kaplan-Meier com dados de sobrevida livre de progressão (SLP) associado a expressão dos genes R18 e I9.	48
Figura 26 -	Kaplan-Meier com dados de sobrevida global (SG) associado a expressão do gene R18.	49
Figura 27 -	Kaplan-Meier com a diferença em sobrevida livre de progressão (SLP) associada ao <i>score</i> obtido da expressão combinada dos genes C3, N14 e R18	51
Figura 28 -	Kaplan-Meier com a diferença em sobrevida global (SG) associada ao <i>score</i> obtido da expressão combinada dos genes C3, N14 e R18.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Grupos de resposta definidos pelo RECIST 1.1.	21
Tabela 2 -	Características da população.	30
Tabela 3 -	Dados de taxa de resposta global e resposta objetiva.	32
Tabela 4 -	Análise Univariada da sobrevida livre de progressão.	35
Tabela 5 -	Análise Univariada da sobrevida global.	37
Tabela 6 -	Controles positivos e negativos.	40
Tabela 7 -	Lista dos 31 Genes diferencialmente expressos (TRG).	42
Tabela 8 -	Lista dos 30 Genes diferencialmente expressos (TRO).	42
Tabela 9 -	Lista de genes das curvas <i>ROC</i> individuais (grupo dos respondedores).	45
Tabela 10 -	Lista de genes das curvas <i>ROC</i> individuais (grupo não-respondedores).	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ccA	<i>Clear cell type A</i>
ccB	<i>Clear cell type B</i>
CCR	Carcinoma de células renais
CCRcc	Carcinoma de células renais do subtipo células claras
CTLA4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
DHL	Lactato desidrogenase
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HIF	Fator indutor de hipóxia
HR	<i>Hazard ratio</i>
ICI	Inibidores de <i>checkpoints</i> imunológicos
IMDC	<i>International Metastatic Database Consortium</i>
KPS	<i>Karnofsky Performance Status</i>
LAD	Análise lógica de dados
m-TOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
mCCR	Carcinoma de células renais metastáticos
CCRcc	Carcinoma de células renais do subtipo células claras
MDR	Resistência á múltiplas drogas
MET	<i>Mesenchymal epithelial transition</i>
MSKCC	<i>Memorial Sloan Kettering Cancer Center</i>
mSLP	Mediana de sobrevida livre de progressão
NEJM	<i>New England journal of medicine</i>
NR	<i>Not reached</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
PDL1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
RECIST	<i>Response Evaluation Criteria In Solid Tumours</i>
RNA	Acido ribonucleico

SG	Sobrevida global
SLP	Sobrevida livre de progressão
TRG	Taxa de resposta global
TRO	Taxa de resposta objetiva
TKI	Inibidor de tirosina-quinase
TNM	Tumor, linfonodo, metástase
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
VHL	<i>Von Hippel-Lindau</i>

RESUMO

Sanches AON. *Identificação do perfil de expressão gênica preditivo de resposta ao sunitinibe, em carcinomas renais de células claras metastáticos*. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2020.

JUSTIFICATIVA: Carcinoma de células renais representa 2-3% de todos os cânceres de países ocidentais. Dados brasileiros sobre o câncer de rim mostram uma incidência de 6.270 novos casos para 2018, sendo que pouco menos da metade destes pacientes morreram da doença. Novas terapias alvo-moleculares emergiram nos últimos anos para pacientes com câncer de rim metastático, apresentando taxas de respostas em torno de 30% e aumento de sobrevida global. O sunitinibe é uma terapia alvo-molecular de uso oral direcionada principalmente aos fatores de crescimento do endotélio vascular, sendo um dos principais medicamentos utilizados no tratamento do carcinoma renal de células claras metastáticos, proporcionando ganhos em taxa de resposta e sobrevida. Devido a heterogeneidade intrínseca das neoplasias renais e da falta de marcadores específicos, a escolha do tratamento sistêmico baseia-se em nomogramas compostos por variáveis clínicas e laboratoriais. A busca por biomarcadores prognósticos e preditivos pode melhor individualizar o tratamento do paciente com câncer de rim e proporcionar um guia mais sensível para o manejo terapêutico. **OBJETIVOS:** O objetivo geral é identificar um perfil de expressão gênica preditivo de resposta ao sunitinibe em pacientes com carcinoma renal de células claras metastáticos. Os objetivos específicos são determinar a expressão gênica da população do estudo, descrever seu perfil epidemiológico e clínico-patológicos, bem como comparar o perfil de expressão gênica encontrado com dados de sobrevida livre de progressão e sobrevida global, buscando encontrar associação gênica prognóstica com estes desfechos. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Descrever através de coleta de dados sistemática, o perfil epidemiológico, características clínico-patológicas, dados de taxa de resposta, sobrevida livre de progressão e sobrevida global de 60 pacientes adultos com carcinoma renal de células claras metastático que fizeram uso de sunitinibe em primeira linha, entre 2009 a 2018 no Hospital de Câncer de Barretos. A expressão gênica foi avaliada pela técnica de *nanosttring* utilizando um painel com 770 genes relacionados a progressão de doença. As amostras de RNA do tumor primário foram obtidas unicamente através de nefrectomia ou *core* biópsia. A taxa de resposta foi definida pelos critérios estabelecidos no RECIST 1.1, e os desfechos de sobrevida elaborados pelo método de Kaplan-Meier.

RESULTADOS: Com a ocorrência de 95% dos eventos, observamos uma sobrevida livre de progressão (SLP) mediana de 13 meses, e com 80% de óbitos, uma sobrevida global (SG) mediana de 34 meses. A taxa de resposta ao tratamento foi de 56,7%. A SLP foi maior no grupo dos respondedores (27,4 meses; IC95% 18 - 36,7 meses) comparado ao grupo dos não-respondedores (7,5 meses; IC95% 5,1 - 9,8 meses; $p \leq 0,0001$). Resultado favorável também foi observado em termos de SG. O grupo dos respondedores mostrou uma SG mediana de 54,5 meses (IC95% 37,7 - 71,4 meses) *versus* 12,7 meses (IC95% 8,5 - 16,9 meses) no grupo dos não respondedores ($p \leq 0,0001$). Na avaliação de expressão gênica das amostras, encontramos 31 genes diferencialmente expressos entre os grupos de resposta, capazes de identificar os pacientes que responderam ao tratamento com sunitinibe. A curva ROC mostrou que a combinação de 3 genes diferencialmente expressos, foi capaz de identificar os pacientes que responderam ao tratamento com uma sensibilidade e especificidade de 88,2% e 84,6%, respectivamente. Houve associação entre os desfechos de sobrevida e o perfil de expressão gênica encontrado. O gene R18 com baixa expressão e o gene I9 com alta expressão foram associados a melhor SLP ($p = 0,024$ e $p = 0,014$, respectivamente). A baixa expressão do gene R18 foi também associada a maior SG comparado ao grupo com alta expressão do gene ($p = 0,012$). Avaliamos um escore obtido da expressão combinada de 3 genes (C3, N14 e R18), e observamos que os pacientes com escore alto obtiveram um ganho na mSLP de 16,2 meses (24,4 meses; IC95% 18,6 - 42,1) comparado aqueles com escore baixo (8,2 meses; IC95% 6,2 - 14,2 meses; $p < 0,0001$). Os pacientes com escore alto apresentaram uma SG mediana de 48,3 meses (IC95% 35 - NR) *versus* 16,6 meses nos pacientes com escore baixo (IC95% 10,6 - 42,9 meses), o que se traduziu em um ganho de mSG de 31,7 meses em favor dos pacientes com escore alto ($p = 0,0015$). **CONCLUSÃO:** Encontramos um perfil de expressão gênica que se associou a taxa de resposta em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos tratados com sunitinibe na primeira linha. O nível de expressão combinada dos genes C3, N14 e R18 genes indica associação com prognóstico em termos de sobrevida global e sobrevida livre de progressão nos pacientes do estudo. Estudos posteriores são fundamentais para validar a presente assinatura gênica, que poderá constituir uma ferramenta importante na decisão terapêutica em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos.

PALAVRAS-CHAVE: Carcinoma de Células Renais; Sunitinibe; Biomarcadores tumorais; Expressão gênica; Prognóstico; Terapia de Alvo Molecular.

ABSTRACT

Sanches AON. *Identification of the gene expression profile predictive of response to sunitinib in renal metastatic clear cell carcinomas*. **Dissertation (Master's degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2020.

BACKGROUND: Renal cell carcinoma represents 2-3% of all cancers in western countries. Brazilian kidney cancer data show an incidence of 6,270 new cases for 2018, with just under half of these patients dying from the disease. New target-molecular therapies have emerged in recent years for patients with metastatic kidney cancer, with response rates of around 30% and increased overall survival. Sunitinib is a target-molecular therapy for oral use mainly directed to inhibit growth factors of the vascular endothelium, being one of the main drugs used in the treatment of renal metastatic clear cell carcinoma, providing advantage in response rate and survival. Due to the intrinsic heterogeneity of renal neoplasms and the lack of specific markers, the choice of systemic treatment is based on nomograms composed of clinical and laboratory variables. The search for prognostic and predictive biomarkers can better individualize the treatment of patients with kidney cancer and provide a more sensitive guide for therapeutic management. **AIM:** The general aim is to identify a gene expression profile predictive of the response to sunitinib in patients with metastatic clear cell renal carcinoma. The specific aims are to determine the gene expression of the study population, describe its epidemiological and clinical-pathological profile, as well as to compare the gene expression profile found with progression-free and global survival data, seeking to find a prognostic gene association with these outcomes. **MATERIALS AND METHODS:** Describe through patient medical records, the epidemiological profile, clinical-pathological characteristics, response rate data, progression-free survival and overall survival of 60 adult patients with metastatic clear cell renal carcinoma who used sunitinib in first line, between 2009 and 2018 at the Barretos Cancer Hospital. Gene expression was evaluated using the Pan-Cancer progression panel of Nanostring which contain 770 genes panel related to disease progression. The RNA was isolated from FFPE samples of nephrectomy or core biopsy of primary tumor. The response rate was defined by the criteria established in RECIST 1.1, and the survival outcomes elaborated by the Kaplan-Meier method. **RESULTS:** With the occurrence of 95% of the events, we observed a median progression-free survival (PFS) of 13 months, and with 80% of deaths, a median overall survival (OS) of 34 months. The response

rate to treatment was 56.7%. The PFS was higher in the group of responders (27.4 months; 95% CI 18 - 36.7 months) compared to the group of non-responders (7.5 months; 95% CI 5.1 - 9.8 months; $p \leq 0, 0001$). A favorable result was also observed in terms of OS. The responders group showed a median OS of 54.5 months (95% CI 37.7 - 71.4 months) versus 12.7 months (95% CI 8.5 - 16.9 months) in the group of non-responders ($p \leq 0.0001$). The evaluation of gene expression showed 31 genes differentially expressed between the response groups, capable of identifying the patients who responded to treatment with sunitinib. The ROC curve showed that the combination of 3 differentially expressed genes was able to identify patients who responded to treatment with a sensitivity and specificity of 88.2% and 84.6%, respectively. There was an association between survival outcomes and the gene expression profile found. The R18 gene with low expression and the I9 gene with high expression were associated with better PFS ($p = 0.024$ and $p = 0.014$, respectively). The low expression of the R18 gene was also associated with higher OS compared to the group with high expression of the gene ($p = 0.012$). We evaluated a score obtained from the combined expression of 3 genes (C3, N14 and R18), and observed that patients with a high score obtained a gain in the mPFS of 16.2 months (24.4 months; 95% CI 18.6 - 42, 1) compared to those with low scores (8.2 months; 95% CI 6.2 - 14.2 months; $p < 0.0001$). Patients with a high score had a median OS of 48.3 months (95% CI 35 - NR) versus 16.6 months in patients with a low score (95% CI 10.6 - 42.9 months), which translated into a mOS gain of 31.7 months in favor of patients with a high score ($p = 0.0015$).

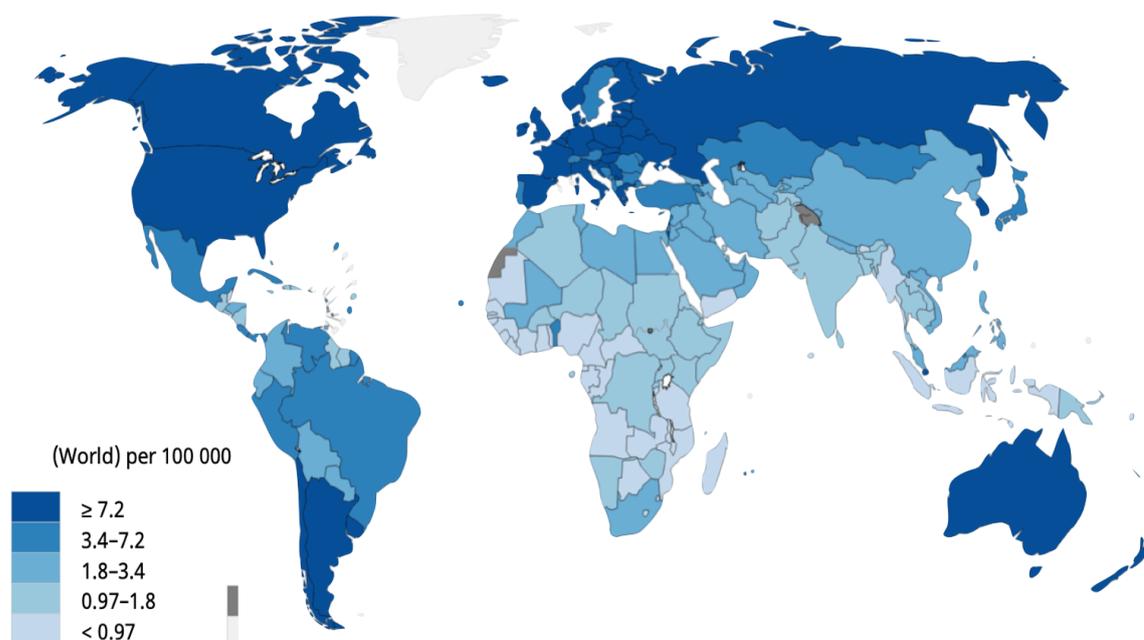
CONCLUSIONS: We found a gene expression signature that was associated with the response rate in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib in the first line. The level of combined expression of the C3, N14 and R18 genes indicates an association with prognosis in terms of overall survival and progression-free survival in the study patients. Further studies are essential to validate the present gene signature, which can be an important tool in the management of metastatic renal cell carcinoma patients.

KEYWORDS: Renal Cell Carcinoma; Sunitinib; Tumor biomarkers; Gene expression; Prognosis; Molecular Target Therapy.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

A maioria dos tumores primários de rim são originários no córtex do parênquima renal¹. Destes tumores, o carcinoma de células renais derivado do epitélio dos túbulos renais é o subtipo tumoral de maior prevalência, representando quase 90% de todas as neoplasias primárias do rim^{2, 3}. O carcinoma de células renais (CCR) representa 2-3% de todas as neoplasias em países desenvolvidos⁴. Dados globais para o ano 2018, mostram que pouco mais de 400.000 pessoas foram diagnosticadas com câncer renal, sendo que a mortalidade foi estimada em 175.000 casos⁴, com uma distribuição global conforme mostrada na figura 1. Dados americanos para 2020, estimam uma incidência de 73.750 casos novos e uma mortalidade de 14.830 casos para ambos sexos, com um aumento de 12,8% na incidência quando comparado a dados de 2018, sendo que a mortalidade se manteve estável⁵. Dados brasileiros de 2018 sobre o câncer de rim, calculados a partir das informações do Registro de Câncer de Base Populacional (RCBP), mostram uma incidência de 6.270 novos casos/ano (sendo 3.760 em homens e 2.510 em mulheres), fazendo desta neoplasia a 15^o em incidência no Brasil, sendo responsável por uma mortalidade estimada de 2.000 mortes/ano⁶.



Fonte: Bray et al. ⁴

Figura 1 - Taxa de incidência global estimada para câncer renal, em ambos os sexos e em todas as idades.

Estimativas do INCA para 2020 não contemplam dados epidemiológicos para as neoplasias renais até o momento⁷.

O CCR é mais comum em homens que em mulheres em uma proporção aproximada de 2:1⁸, e ocorre predominantemente entre a sexta e a oitava década de vida, com mediana de idade ao diagnóstico aos 64 anos, sendo incomum em pacientes com menos de 40 anos e raro em crianças^{9, 10}.

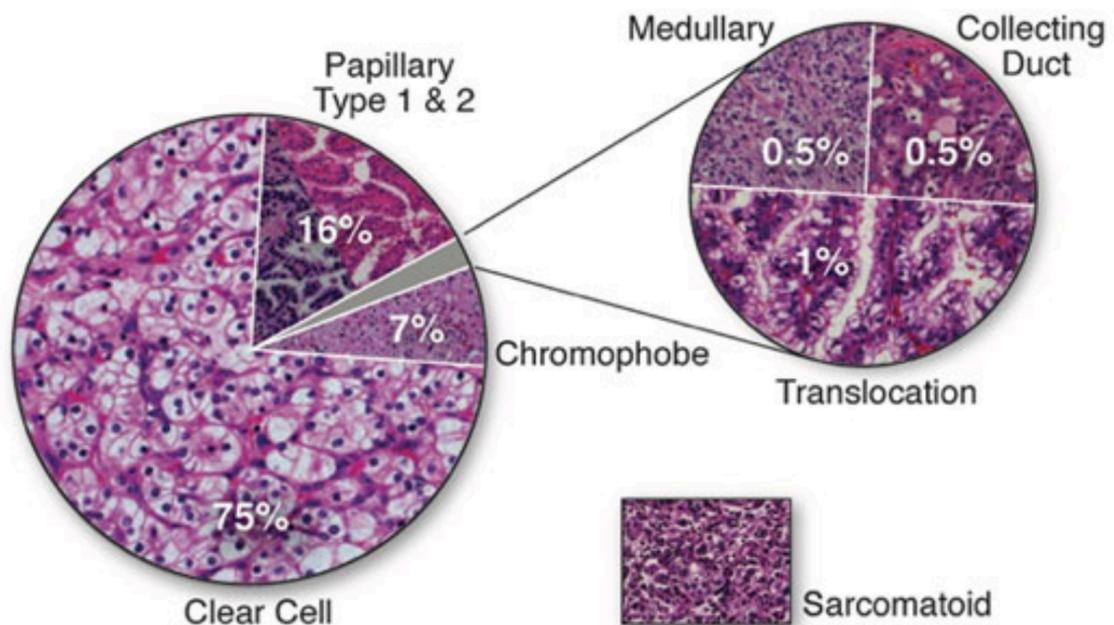
Os principais fatores de risco para desenvolvimento de CCR são o tabagismo, obesidade e a hipertensão¹¹. Além dos fatores ambientais, fatores genéticos influenciam o risco de desenvolvimento desta doença, sendo que indivíduos com parentes de primeiro grau diagnosticados com CCR podem apresentar um risco até 4 vezes maior de desenvolver neoplasias renais¹².

Com relação a apresentação da doença ao diagnóstico, dados do registro do SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results Cancer Statistics Review*), mostram a seguinte distribuição¹³: Doença localizada (isto é, confinada ao órgão) corresponde a 65% dos casos ao diagnóstico; Doença regional (quando a doença se dissemina para linfonodos regionais) corresponde a 16% dos casos ao diagnóstico; Doença metastática (quando a neoplasia alcança estruturas à distância) acontece em aproximadamente 16% dos casos ao diagnóstico; Pacientes não estadiados são 3% dos casos. A principal via de metástase do carcinoma de células renais é hematogênica, principalmente para os pulmões, ossos, adrenais e linfonodos à distância¹⁴.

1.2 Classificação

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), revista e modificada pela ISUP (*The International Society of Urological Pathology*)¹⁵, o CCR pode ser classificado histologicamente em três principais grupos: carcinoma de células claras, carcinoma papilar e carcinoma cromóforo (Figura 2). Estes três subgrupos apresentam distintas características epidemiológicas e alterações genéticas^{13, 16}. O carcinoma de células claras é a histologia mais prevalente, correspondendo de 75 a 85% dos carcinomas de células renais^{14, 16}. Apresenta-se geralmente como uma massa solitária, distribuída aleatoriamente com igual frequência em ambos os rins. O citoplasma é 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 (por isso o nome de células claras)¹⁶ (Figura 2).

Em 94% dos CCR de células claras ocorre a deleção na região 3p25-26 do braço curto do cromossomo 3p^{17, 18} onde está localizado o gene *VHL* (*von Hippel-Lindau*). A alteração neste gene desempenha um papel precípua no desenvolvimento do carcinoma de células renais tipo células claras em pacientes com doença de *von Hippel-Lindau*, e está também relacionado com patogênese do carcinoma renal de células claras esporádico¹⁹. O gene *VHL* é expresso em uma variedade de tecidos humanos, particularmente em células epiteliais da pele, no trato gastrointestinal, respiratório e gênito-urinário²⁰.



Fonte: Shuch et al.²¹

Figura 2 - Classificação histológica do câncer de células renais.

Os mecanismos pelos quais o produto do gene supressor tumoral, a proteína *VHL* (*pVHL*), causa transformação neoplásica nas células, pode envolver vários caminhos de sinalização, como por exemplo, o seu papel na degradação proteica e na angiogênese²². Em relação a este último, 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 hipóxia²³. Em caso de ausência de funcionalidade do gene *VHL* ocorre acúmulo de HIF, que por sua vez promove um ambiente hipoxêmico, ativando a transcrição de genes induzidos pela hipóxia, dentre eles o fator de crescimento endotelial (VEGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)²⁴. A superexpressão de VEGF e PDGF explica o extraordinário componente capilar das neoplasias associadas a doença de *von Hippel-Lindau*²⁴.

O segundo subtipo histológico mais frequente, o carcinoma papilar, corresponde a aproximadamente 10-15% dos CCR^{15, 25} (Figura 2). A sua apresentação é com tumores geralmente multifocais e bilaterais, característica mais comuns nesta que em outras histologias¹⁶. Da mesma forma que o subtipo de células claras, o carcinoma papilar pode ocorrer esporadicamente ou da forma familiar. A variante hereditária do CCR papilar é uma síndrome autossômica dominante de alta penetrância, sendo o rim o único órgão acometido pela síndrome. Esta variante hereditária está associada a mutação do proto-oncogene MET no cromossomo 7q31²⁶. Outros achados genéticos associados ao subtipo papilar são a trissomia do cromossomo 7 e 17, bem como a perda do cromossomo Y²⁷. Destaca-se na variante papilar, a ocorrência de dois subtipos baseados no aspecto histológico e no comportamento biológico da lesão, sendo eles, o de Tipo 1 (basofílico) que representa 5% dos casos, e o Tipo 2 (eosinofílico) que representa cerca de 10% dos casos²⁸. O subtipo basofílico geralmente é detectado em estágios mais iniciais e é de melhor grau histológico que o subtipo eosinofílico, conferindo a ele um melhor prognóstico. Habitualmente, o subtipo eosinofílico é detectado em estágios mais avançados, exibindo características de um tumor de alto grau, sendo frequente a ocorrência de invasão venosa locorregional e metástases ganglionares. Os carcinomas papilares de uma maneira geral, estão associados a doença renal crônica^{27, 28}.

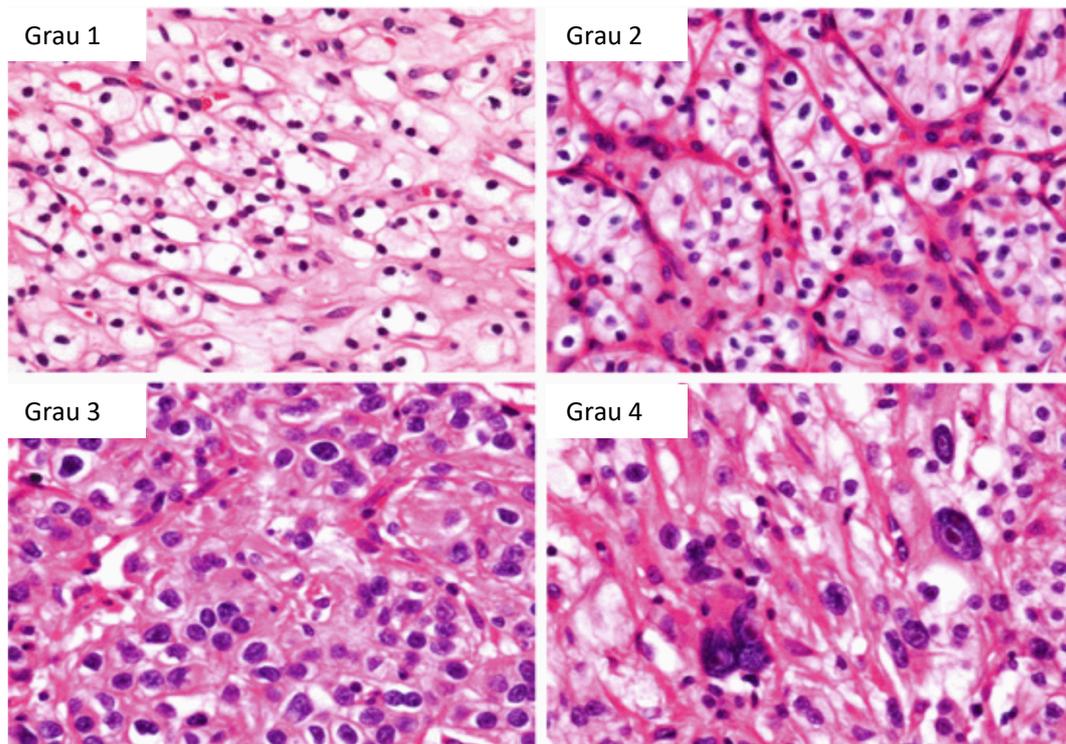
O terceiro subtipo histológico mais frequente é o carcinoma cromóforo. Este acomete 5-7% dos tumores epiteliais removidos cirurgicamente (Figura 2). Alguns casos de doença metastática foram descritos, porém a apresentação na maioria dos casos é como doença localizada^{15, 16}. Esse subtipo é menos agressivo do que subtipo de células claras, sendo desta forma o subtipo de melhor prognóstico entre os CCR. A ocorrência de metástase é de apenas 7% dos casos²⁸. Este tipo histológico é caracterizado por perda cromossômica extensa, e a nível molecular pela presença de mutação no gene supressor tumoral *TP53* em 25% dos casos²⁹.

Entre os demais subtipos menos frequentes, estão o subtipo de carcinoma dos ductos coletores (0,5%), o carcinoma de células medulares (0,5%), e o carcinoma associado a translocação cromossômica (1%). O carcinoma dos ductos coletores é um subtipo infrequente, que geralmente se apresenta ao diagnóstico em estágios avançados, acometendo com frequência o hilo renal e infiltrando o tecido adiposo perirrenal. Por razões ainda não explicadas, são mais prevalentes no rim direito^{26, 30}. O carcinoma de células medulares é um tumor agressivo, que se origina nas células dos néfrons mais distais e que afeta geralmente

pacientes mais jovens (20-30 anos), sendo uma característica diferencial, sua forte associação com a doença falciforme e traço falciforme²⁸. O pobre prognóstico deste raro subtipo, está associado a sua capacidade de metastatizar rapidamente para o fígado e pulmão²⁶. O carcinoma associado a translocação cromossômica é aqueles cuja ocorrência está relacionada alterações genéticas envolvendo a transcrição do fator E3 do gene TFE3, localizado no braço curto do cromossomo 11 (Xp11.2). Geralmente acometem pacientes mais jovens e crianças³¹, com mediana de idade de aproximadamente 20 anos, sendo este subtipo curiosamente mais prevalente em mulheres (2.5:1). São tumores geralmente grandes (alguns chegando a 20cm), que na maioria dos casos dão sintomas já em fases iniciais (hematúria e dor abdominal) e apresentam uma tendência de extensão extra-renal e envolvimento linfonodal ao diagnóstico³¹.

1.3 Fatores prognósticos

Para o estadiamento das neoplasias renais a classificação anatômica TNM (AJCC 8ª ed)³² é a recomendada, sendo considerada também como um dos fatores que auxiliam na avaliação prognóstica dos pacientes (Anexo A). Tais fatores anatômicos como tamanho do tumor, invasão venosa, invasão de cápsula renal, envolvimento da adrenal, acometimento linfonodal e metástases à distância estão agrupadas neste sistema³³. Enquanto o estágio do tumor na apresentação permanece como um preditor confiável do curso clínico da doença após a cirurgia, os resultados de sobrevida são heterogêneos dentro de cada subgrupo de estadiamento³⁴. Com relação aos aspectos histológicos, alguns fatores prognósticos são elementos independentes, como por exemplo o grau nuclear de *Fuhrman*, que consiste na avaliação microscópica da heterogeneidade nuclear, e assim, classifica o padrão nuclear da neoplasia em quatro graus, de um a quatro, sendo o grau quatro o de pior prognóstico³⁵ (Figura 3). Os subtipos histológicos de carcinoma de células renais descritos no subitem anterior, também são considerados na avaliação prognóstica, sendo os tumores cromóforos considerados os de melhor prognóstico, seguido pelos papilares, e por último, o subtipo de células claras, apontado como o de pior prognóstico entre os três³⁶. Pacientes com tumores que apresentam diferenciação sarcomatóide independente do subtipo histológico, também apresentam prognóstico desfavorável, sendo que muitos desses pacientes morrem antes de 12 meses do diagnóstico^{15, 16}.



Fonte: modificado de Mikami et al.³⁷

Figura 3 - Classificação histopatológica do grau nuclear de Furhman para o CCR.

Além dos elementos patológicos, os dados clínicos como *performance status*, caquexia e presença de sintomas, bem como dados laboratoriais como anemia, plaquetose, DHL (lactato desidrogenase) e cálcio sérico, são importantes parâmetros para avaliação prognóstica em pacientes com carcinoma de células renais metastático³⁸. Para melhorar a classificação prognóstica desses pacientes, algumas ferramentas chamadas de "nomogramas" estimam a sobrevida e a recorrência do carcinoma renal baseados em parâmetros clínico-patológicos e laboratoriais^{33, 39}.

Um dos nomogramas utilizados para avaliação prognóstica na doença metastática é o nomograma desenvolvido pelo *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (MSKCC), também conhecido como diagrama ou nomograma de Motzer³³. As variáveis prognósticas que o compõem são cinco: intervalo entre o diagnóstico e o tratamento menor que um ano, *performance status Karnofsky* menor que 80%, 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 avaliação prognóstica foi validado quando a terapia de escolha nos pacientes com CCR metastáticos era realizada com citoquinas imunológicas, principalmente interleucina-2 e interferon- α ³³.

Escore de desempenho de Karnofsky < 80%.
Tempo entre o início do tratamento e o diagnóstico < 1 ano.
Hemoglobina abaixo do limite inferior da normalidade.
Cálcio sérico acima do limite superior da normalidade.
Contagem de neutrófilos acima do limite superior da normalidade.
Contagem de plaquetas acima do limite superior da normalidade.
<ul style="list-style-type: none"> • Risco favorável: nenhum dos fatores de risco acima presentes. • Risco intermediário: 1 ou 2 dos fatores de risco acima presentes. • Risco pobre: 3 ou mais dos fatores de risco acima presentes.

Figura 4 - Classificação de risco IMDC (*International Metastatic Database Consortium*)

Atualmente, um dos modelos prognósticos mais utilizados e que foi aplicado em populações com carcinoma de células renais tratados já na era das terapias alvo-molecular, foi desenvolvido e validado em uma base de dados independente³⁹. Este, é o modelo do IMDC (*International Metastatic Database Consortium*), também conhecido como nomograma de Heng (Figura 4). Este nomograma é derivado de um estudo retrospectivo de 645 pacientes com carcinoma de células renais tratados com sunitinibe, sorafenibe ou bevacizumabe mais interferon⁴⁰. A análise dos dados deste estudo identificou variáveis clínicas e laboratoriais que estratificam os pacientes em 3 grupos prognósticos: favorável, intermediário ou pobre. Quatro, das seis variáveis utilizadas migraram do nomograma prognóstico do MSKCC como preditores independentes de curta sobrevida, sendo eles, o intervalo entre o diagnóstico e o tratamento menor que um ano, *performance status Karnofsky* menor que 80%, cálcio sérico corrigido maior que o limite da normalidade e hemoglobina sérica menor que o limite superior da normalidade⁴⁰. Os outros dois fatores prognóstico independentes validados para o

nomograma de Heng são a contagem de neutrófilos absolutos maior que o limite superior da normalidade e plaquetas maior que o limite superior da normalidade (Figura 4).

Pacientes com nenhum fator adverso foram classificados como sendo de prognóstico favorável, com sobrevida mediana de 43 meses. Pacientes com um ou dois fatores adversos foram classificados como prognóstico intermediário, com sobrevida mediana desses pacientes de 27 meses, sendo que 53% desses pacientes estavam vivos em 2 anos. Já os pacientes com três ou mais fatores adversos apresentavam prognóstico pobre, com apenas 7% desses pacientes estavam vivos em 2 anos⁴⁰.

Os modelos prognósticos discutidos acima, principalmente o IMDC, são utilizados na prática clínica não só como modelos prognósticos, mas também para guiar a indicação do tratamento sistêmico, tornando-se outrossim, em verdadeiras ferramentas preditivas.

Embora terapias alvo-dirigidas (ex. contra receptores do *VEGF*, *m-TOR*) tenham sido desenvolvidas com base na compreensão biológica e molecular dos pacientes com tumores CCR avançados, ainda não são utilizados biomarcadores que relacionem estes aspectos moleculares do tumor com dados de resposta à terapia específica⁴¹.

Sem esses biomarcadores disponíveis, a histologia e a estratificação de risco pelos nomogramas de Motzer e mais recentemente pelo nomograma de Heng, são utilizados na individualização do tratamento sistêmico de pacientes com doença neoplásica renal avançada⁴⁰. Cabe destacar que a heterogeneidade molecular dentro dos subtipos tumorais provavelmente desempenha um papel importante na diversidade de respostas e resistência a terapias direcionadas⁴². Além desta consideração, os dois nomogramas, o do IMDC e o do MSKCC foram comparados para avaliar a sua concordância como ferramenta prognóstica e preditiva⁴³, sendo constatada uma discordância significativa em termos de sobrevida global, sobrevida livre de progressão e sobrevida câncer específica entre eles. Os autores concluíram que esta discordância pode ter um impacto negativo na avaliação prognóstica de pacientes com CCR metastáticos⁴³. Uma metanálise publicada recentemente apontou que o modelo IMDC, devido a heterogeneidade tumoral, poderia ter prejudicada sua precisão preditiva e prognóstica com respeito a dados de sobrevida⁴⁴.

1.4 Tratamento

O tipo de tratamento difere de acordo com o estadiamento do paciente⁴⁵. A ressecção cirúrgica é a terapia mais efetiva em pacientes com carcinoma de células renais na doença

localizada, sendo que as opções cirúrgicas são a nefrectomia parcial ou radical, ambas apresentando suas próprias indicações, assim como riscos e benefícios^{45, 46}. Já os pacientes com CCR metastático são um grupo heterogêneo onde não se aplica a mesma terapia inicial para todos os casos⁴⁷. Por exemplo, em casos selecionados tem-se a indicação de ressecção cirúrgica do tumor primário mesmo em pacientes metastáticos, como forma de aumentar a sobrevida global, chamado cirurgia de citorredução⁴⁸. Porém de forma geral, para aqueles pacientes com doença disseminada a terapia sistêmica se fará necessária^{45, 49}.

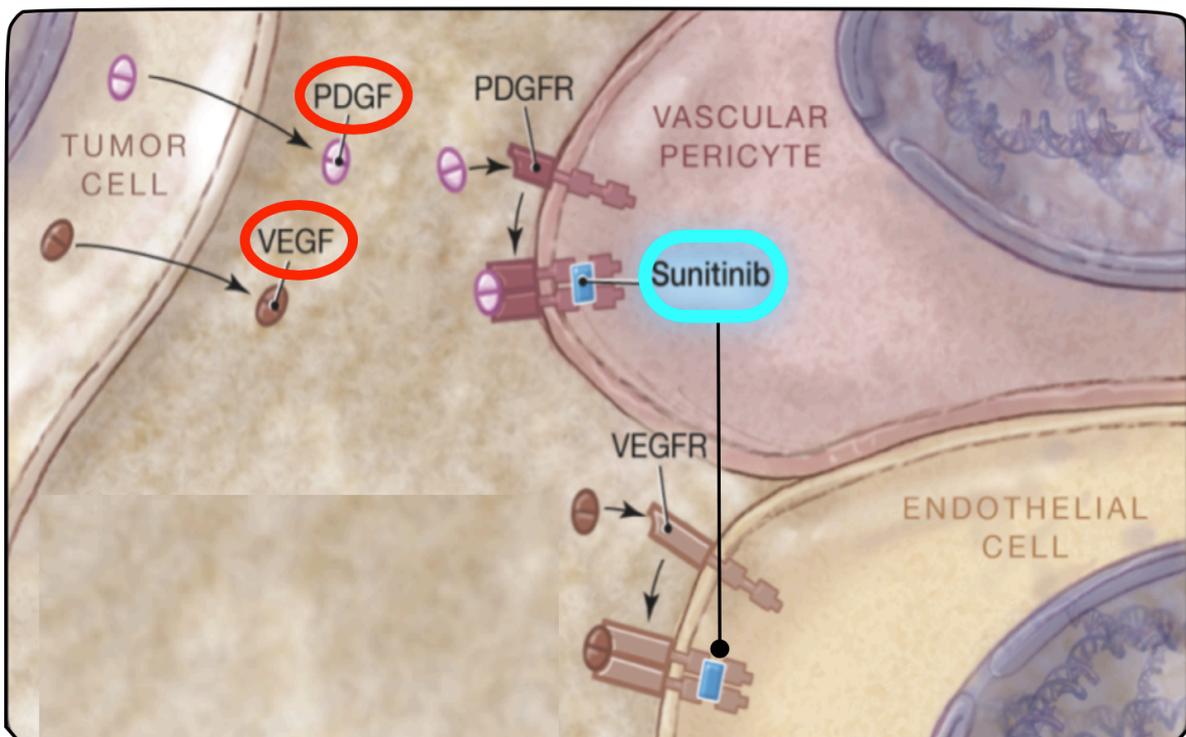
O uso de quimioterapia no tratamento do carcinoma renal historicamente se mostrou uma opção ruim, provavelmente pelo fato destes tumores se desenvolverem nos túbulos proximais renais, que apresentam altos níveis de proteínas resistentes a múltiplas drogas (*MDR proteins*)⁴⁶. Como o carcinoma de células renais é resistente a quimioterapia, tanto a interleucina-2 em altas doses, como o interferon alfa foram amplamente utilizados no tratamento de primeira linha da doença metastática^{33, 50}. As taxas de resposta com essas opções terapêuticas eram baixas, variando de 5 a 20%, e a sobrevida global média de aproximadamente 12 meses⁵⁰. Além disso, estes regimes, principalmente interleucina-2, foram associados com alta toxicidade e custo significativos, limitando seu uso a pacientes altamente selecionados e com acesso a centros especializados⁵⁰.

Como citado, nos carcinomas de células renais, especialmente naqueles tipo células claras, ocorre o acúmulo do HIF devido a inativação do gene de *von Hippel-Lindau*, resultando na superexpressão do fator de crescimento do endotélio vascular (*VEGF*) e fator de crescimento derivado das plaquetas (*PDGF*), ambos promotores da angiogênese, um dos pilares para o desenvolvimento e progressão do câncer renal⁵¹. Com esse conhecimento, avanços biológicos e farmacológicos levaram ao desenvolvimento de agentes que têm como alvo, moléculas que bloqueiam a sinalização dos receptores *VEGF* e *PDGF*, inibindo assim a angiogênese e conseqüentemente a progressão tumoral^{47, 52}. Essas medicações foram de extrema importância para o aumento da sobrevida livre de progressão e sobrevida global em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos^{34, 53}. Três classes de fármacos alvo-moleculares se destacaram (Anexo B): os anticorpo monoclonais que inibem a circulação de *VEGF-A*, como o bevacizumabe; os inibidores da proteína *mTOR* (*mammalian Target of Rapamycin*), proteína responsável pela regulação de micronutrientes, crescimento celular, apoptose e angiogênese, sendo o tivozolimumabe e o everolimo as duas drogas mais importantes; e por fim, os inibidores de multi-receptores tirosina-quinase, incluindo os receptores de

crescimento endotelial vascular (*VEGFR*) e os receptores de fator de crescimento derivado de plaquetas (*PDGFR*)⁵³. Exemplos deste inibidores de tirosina-quinase usados como opção terapêutica no câncer de rim metastático são o sunitinibe, sorafenibe, pazopanibe⁵⁴ e mais recentemente o axitinibe⁵⁵. Para o CCRcc avançado, a resposta ao tratamento e o tempo de sobrevida alcançado são variáveis mesmo na era da terapia alvo, já apontando para uma possível heterogeneidade molecular intrínseca neste tipo de tumor, conforme já mencionado e também pela ausência de marcadores preditivos de resposta⁵⁶.

1.4.1 Sunitinibe

O sunitinibe, um dos primeiros inibidores de tirosina-quinase disponíveis, é um dos agentes mais utilizados na prática clínica no tratamento da doença renal avançada, apresentando uma ação inibidora em múltiplos receptores tirosina-quinase, exibindo assim ampla atividade antitumoral e antiangiogênica⁵⁷.



Fonte: Modificado de Motzer et al.⁵⁸

Figura 5 - Principais alvos de inibição pelo sunitinibe.

A primeira descrição do sunitinibe em carcinoma de células renais metastático foi feita por Faivre *et al.* em 2006 em estudo fase I. Neste estudo, 3 pacientes com carcinoma de células renais metastáticos apresentaram resposta objetiva sustentada com duração de

aproximadamente 54 semanas⁵⁹. A partir destes resultados, estudos fase II conduzidos por Motzer *et al.* confirmaram sua eficácia⁵⁸, até que em 2007 resultados do estudo fase III conduzido também por Motzer *et al.*, consolidou o sunitinibe como primeira linha de tratamento para pacientes com carcinoma de células renais metastático⁵². Neste último estudo, pacientes eram randomizados para dois braços: o braço experimental com sunitinibe ou para o braço controle com interferon- α , considerado como o tratamento padrão à época. Os resultados foram animadores em termos de taxa de resposta objetiva, que alcançou 31% no braço sunitinibe *versus* 6% no braço do interferon- α , bem como em relação ao tempo para progressão da doença, sendo 11 meses para o braço do sunitinibe e 5 meses para o braço do interferon- α , além de melhor perfil de toxicidade a favor do sunitinibe⁵². Na atualização deste estudo em 2009, a mediana de sobrevida livre de progressão foi mantida a favor do sunitinibe, com ganho médio de 6 meses ($p < 0,001$). Foi verificada uma maior taxa de resposta objetiva da observada no primeiro estudo, com 47% *versus* 12% a favor do sunitinibe ($p = < 0,001$). A sobrevida global mediana foi de 26,4 meses no braço sunitinibe *versus* 21,8 meses no braço interferon- α , ganho de 4,6 meses a favor do sunitinibe, através da estratificação do teste *log-rank* (HR 0,81; IC95% 0,669 – 0,999; $p = 0,049$)⁶⁰. Após publicação destes estudos, o sunitinibe foi incorporado na prática da nossa instituição desde 2009, para uso na primeira linha de tratamento em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos.

O sunitinibe é tal como já descrito, um potente inibidor dos receptores tirosina-quinase, tendo como seus principais alvos os receptores VEGFR-1, VEGFR-2, KIT, família PDGFR⁵⁷. Os receptores de tirosina-quinase são proteínas que interagem com fatores de crescimento, e fazem parte de uma grande família de proteínas de membrana (transmembrânicas) com uma diversidade de estruturas de ligantes extracelulares, mas que possuem em comum um domínio de atividade tirosina-quinase intracelular⁶¹ (Figura 5). A partir dessa interação receptor/fator de crescimento, sinais de transdução são enviados para o interior da própria célula, e que culminarão em distintas atividades, podendo variar desde sua sobrevivência até sua morte programada^{61, 62}.

O sunitinibe é uma das opções como regime preferencial na primeira linha em pacientes considerados de prognóstico favorável pelo IMDC, também, figura como outros regimes recomendados naqueles pacientes de prognóstico intermediário e pobre, conforme última atualização em 2020 do NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*).⁴⁷ No Brasil, a versão 2020 da Diretriz sobre câncer renal da Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica (SBOC) trás o

sunitinibe em seu fluxograma, como uma opção na primeira linha para pacientes de risco baixo, intermediário e alto risco pelo IMDC ou MSKCC, caso não haja acesso a imunoterapia⁶³.

Com estudos publicados recentemente, a imunoterapia contemporânea com os Inibidores de *checkpoints* imunológicos (ICI) – do inglês *Immune checkpoint inhibitors* vem ganhando espaço no tratamento do CCR avançado⁴⁹. Com foco na 1ª linha de tratamento, o estudo *CheckMate* 214 avaliou a combinação de dois Inibidores de *checkpoint* imunológico no CCR avançado⁶⁴, o nivolumabe, um ICI anti-PDL1 (*Programmed death-ligand 1*) associado ao ipilimumabe, um ICI anti-CTLA4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*), que mostrou uma melhora na sobrevida global (SG) de 15% em relação ao sunitinibe no subgrupo de pacientes classificados como risco intermediário e pobre pelo nomograma do IMDC⁶⁴. Outra combinação avaliada foi a do avelumabe, um ICI anti-PDL1, associado ao axitinibe (um inibidor de tirosina-quinase) *versus* sunitinibe em primeira linha de CCR avançados do subtipo células claras no estudo JAVELIN Renal 101, mostrando um ganho de sobrevida livre de progressão em favor da combinação⁶⁵. Nesta mesma linha, o estudo *Keynote* 426 comparou pembrolizumabe (um ICI, anti-PDL1) mais axitinibe *versus* sunitinibe em primeira linha de CCR avançados do subtipo células claras⁶⁶, mostrando ganho em sobrevida global em favor da combinação no subgrupo de pacientes classificados como risco intermediário e pobre, porém, os pacientes classificados como risco favorável pelo nomograma IMDC não derivaram o mesmo ganho⁶⁶.

1.5 Biomarcadores

A definição de biomarcadores tem evoluído na última década⁶⁷. Com uma definição ampla tomada da OMS podemos aludir que biomarcador é qualquer substância, estrutura ou processo, que possa ser aferido no corpo e assim influenciar ou prever a incidência de desfechos ou doenças^{67, 68}. Especialmente no câncer, um biomarcador pode medir o risco de desenvolver uma neoplasia em um tecido específico, medir o seu risco de progressão e até mesmo avaliar uma potencial resposta ao tratamento, podendo assim fornecer informações úteis na tomada de decisão clínica e terapêutica^{69,70,71}.

Vários marcadores tumorais moleculares foram investigados no cenário do câncer renal, como anidrase carbônica IX, *VEGF*, *HIF*, *Ki67m p53*, *PTEN*, entre outros, mas até o momento nenhum destes prosperou como biomarcador molecular para uso corrente na prática clínica⁷².

Visando melhorar o poder prognóstico dos nomogramas clínicos utilizados atualmente, foi estudada a incorporação do uso de determinadas moléculas (citoquinas), associadas ao risco clínico já estabelecido pelos nomogramas em pacientes com CCR metastáticos⁴¹. Foi evidenciado que algumas moléculas como osteopontina, interleucina-6, TIMP-1, e também a carga tumoral, quando integrados aos critérios clínicos de risco (IMDC/ MSKCC), aumentaram a acurácia prognóstica em termos de sobrevida global em pacientes com CCR metastáticos⁴¹. Nesta mesma linha, Takagi *et al.* identificaram parâmetros clínicos prognósticos independentes entre 71 pacientes do grupo de risco intermediário do IMDC que receberam TKI na primeira linha de tratamento⁷³. Os autores concluíram que tais parâmetros: proteína C reativa, razão de neutrófilos-linfócitos e o número de sítios metastáticos, poderiam estratificar melhor a SG no grupo de risco intermediário pelo IMDC⁷³.

No campo da genômica e da transcriptômica, avanços tecnológicos tem viabilizado a busca de biomarcadores moleculares e de expressão gênica relacionadas aos tumores⁷⁴. Esta personalização possibilita retratar de maneira direta a biologia do tumor, e assim, pode levar ao desenvolvimento de ferramentas prognósticas e preditivas mais eficazes⁷⁴.

Nesta linha, analisando a expressão gênica no CCRcc, Takahashi *et al.* em 2001, avaliou a expressão gênica em 29 amostras de CCRcc de pacientes submetidos a nefrectomia usando um *microarray* personalizado de 21.632 cDNAs (*complementary deoxyribonucleic acid*)⁷⁵. Os resultados sugeriram a existência de pelo menos duas formas molecularmente distintas de CCRcc que possuem comportamentos e mecanismos de progressão distintos. A pesquisa também apontou que a integração de dados de perfil de expressão com parâmetros clínicos, poderia servir para melhorar o diagnóstico e o prognóstico destes pacientes⁷⁵. Posteriormente, outros estudos avançaram neste campo para melhor definir estes subgrupos de expressão gênica no CCR na doença localizada (não metastática), com objetivo de prever prognóstico e determinar o risco de metástase em pacientes tratados⁷⁴.

Avançando nesta ênfase, em 2010, Brannon *et al.*, analisaram e identificaram dois subgrupos de painel gênico de 48 pacientes com CCRcc submetidos a nefrectomia e designaram como *clear cell type A* (ccA) e *clear cell type B* (ccB) baseado em análise lógica de dados (LAD)⁷⁶. Estes subgrupos foram corroborados por um conjunto de dados de 177 tumores e validados quanto ao desfecho clínico. Baseado na avaliação individual dos tumores, aqueles designados por ccA mostraram melhor sobrevida livre de doença específica, quando comparada com o subgrupo designado como ccB (mediana de sobrevida de 8,6 vs 2,0 anos,

$p= 0,002$)⁷⁶. Metanálise publicada em 2012 confirma a robustez da classificação destes dois subgrupos, ccA e ccB, no carcinoma renal de células claras com doença localizada, indicando sua possível implicação nos tratamentos atuais e desenvolvimento de futuras drogas⁷⁷.

Com bases nestes dados, e com objetivo de gerar um biomarcador prognóstico de assinatura gênica para CCRcc, Brooks *et al.*, desenvolveram um painel de 34 genes (o *ClearCode 34*) a partir de 72 amostras baseados nos subgrupos concordantes previamente identificados no CCRcc como: ccA (de bom risco) e ccB (de baixo risco)⁷⁸. O objetivo era que o painel de 34 genes pudesse ser aplicado a amostras clínicas para desenvolver um modelo integrado de estratificação de risco definida biologicamente, para ser utilizado em pacientes com doença localizada. O modelo baseado no painel *ClearCode34* mostrou-se eficaz na estratificação prognóstica para avaliar o risco de recidiva e morte dos pacientes com CCRcc, no cenário de doença não metastática^{78, 79}.

Já no cenário metastático, o *ClearCode34* foi avaliado em associação com o modelo de risco clínico IMDC, com objetivo de melhorar o poder prognóstico do modelo, em 54 pacientes com CCRcc metastáticos tratados com terapia alvo. Os autores concluíram que o painel *ClearCode34* tem validado poder prognóstico em termos de sobrevida nos pacientes tratados com terapia alvo molecular, porém, ele não foi associado a poder preditivo de resposta que ajude a definir a melhor estratégia de tratamento sistêmico para esta população de CCRcc metastáticos⁸⁰.

Ainda falando em modelos moleculares prognósticos, Apanovich *et al.* publicaram no corrente ano, estudo avaliando a expressão de 10 genes em 56 amostras de pacientes com CCR do tipo células claras que tinham ou não metástase, com objetivo de determinar genes prognósticos marcadores de metástase utilizando PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real. Eles encontraram 4 genes (*CAD9*, *NDUFA4L2*, *BHLHE4* e *EGLN3*) fortes candidatos como marcadores de metástase⁸¹. Nesta ênfase, outros estudos vêm sendo publicados recentemente mostrando um crescente interesse na avaliação de fatores prognósticos moleculares como ferramentas no apoio de decisões no CCR.

Além disso, conforme apontado por Henrique R, *et al*, existem também fatores epigenéticos (ex. metilação do DNA) com um papel fundamental na carcinogênese do câncer renal, fornecendo uma oportunidade de explorar fatores preditivos de resposta ao tratamento⁸². Como exemplo, o estudo de Zhang *et al*, avaliando a metilação e expressão de 13 genes para formar um escore prognóstico⁸³, e do mesmo autor, estudo sobre o papel dos

RNA longos não-codificantes (LncRNA) como possíveis biomarcadores prognósticos⁸⁴; também, Nam *et al*, que estudaram o papel da epigenética no fenômeno de progressão ao CCR metastático⁸⁵, bem como outras publicações na mesma linha⁸⁶⁻⁸⁸.

Ilustrando agora possíveis fatores moleculares preditivos de respostas aos TKIs (inibidor de tirosina-quinase), o nosso grupo de pesquisa, avaliou o papel do receptor de tirosina quinase AXL como fator preditivo de resposta ao sunitinibe⁸⁹. Os resultados mostraram que a superexpressão do AXL estava associada com pior desfecho clínico, no entanto, não se correlacionava com resposta ao tratamento com o sunitinibe⁸⁹. Como destacado anteriormente, um possível complicador na descoberta de biomarcadores preditivos no CCR é a heterogeneidade molecular dentro dos subtipos tumorais, podendo explicar em parte, a diversidade de resposta e resistência a terapias direcionadas⁴². Na mesma linha, Carlos Dzik *et al* avaliaram o perfil de expressão gênica de 5 amostras congeladas extraídas de pacientes com CCR e doença localizada, submetidos a nefrectomia depois de serem tratados com dois ciclos de sunitinibe neoadjuvante⁹⁰. O objetivo foi explorar outros possíveis mecanismos de ação do sunitinibe no tecido tumoral. Foram observados níveis de expressão diminuída dos genes *IGFBP1*, *CCL20*, *CRP*, *FGB*, *TGFPI*, *SCN9A*, *CXCL6* e *MMP9* nos pacientes expostos ao sunitinibe, quando comparado ao grupo controle. Na busca da causa desta baixa expressão, os autores estudaram a metilação de dois genes (*IGFBP1* e *CXCL6*), encontrando que o gene *IGFBP1*, gene que apresentou menor nível de expressão (*downregulation*) estava metilado, levando a hipótese de que a metilação da região promotora do gene (fenômeno epigenético), pode ser parte do mecanismo de ação do sunitinibe, o que pode explicar a regulação negativa da expressão gênica nestes pacientes⁹⁰. Mais recentemente, Carrigós *et al*. publicaram no início do ano corrente, estudo avaliando o papel da expressão de micro-RNAs (miRNA) comparando dois grupos de taxa de resposta aos inibidores de tirosina-quinase em 51 pacientes com CCR metastáticos⁹¹. Os autores concluíram que existe um potencial papel dos miRNA como ferramenta de predição de tratamento nos pacientes do estudo, com necessidade de validação dos achados⁹¹.

Atualmente, conforme apontamento de Adashek *et al*.⁹², o único ensaio clínico fase II guiado por biomarcador, foi um estudo para testar o uso de savolitinibe (TKI seletivo para inibição do *MET*) em grupos de pacientes com CCR metastático do subtipo papilar, onde um grupo apresentava amplificação ou mutação do *MET*, e outro grupo não⁹³. Ainda segundo os

autores, em se tratando de subtipo histológico não-células claras, este estudo marca o início de ensaios clínicos guiados por biomarcadores no cenário CCR metastáticos⁹².

Apesar dos vários esforços, e tal como reportado na metanálise de Heng *et al.*, dos vários biomarcadores que estão sobre investigação ativa, a única ferramenta preditiva de uso corrente é o modelo do IMDC, mesmo levando em conta suas limitações frente ao aumento crescente de medicamentos disponíveis para o tratamento do CCR metastático, bem como da possível heterogeneidade tumoral intrínseca apontada em outro momento⁹⁴.

Com avanço da biologia molecular integrada ao estudo das neoplasias, conforme ilustrado acima, percebemos crescente interesse na busca de biomarcadores personalizados que traduzam de forma mais precisa a heterogeneidade dos tumores renais, avançando assim no sentido de desenvolver ferramentas prognósticas e preditivas para melhor individualizar a abordagem destes pacientes⁹⁴.

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, os modelos estabelecidos como estratificadores dos pacientes com CCR metastático que receberão terapia sistêmica integram somente dados clínicos e laboratoriais^{33, 40} e portanto, refletem consequências dos processos biológicos tumorais, e não a sua causa⁴¹.

No panorama de uma doença com alto grau de heterogeneidade⁴², a descoberta de biomarcadores confiáveis que possam melhor identificar os pacientes que se beneficiarão do tratamento é de importância crítica. Para mais, em um campo de crescimento exponencial de medicamentos para o CCR avançado, faz-se necessária a investigação de ferramentas preditivas objetivas para uma melhor tomada de decisão⁹⁵.

Não existem hoje biomarcadores integrados na prática clínica, que auxiliem na identificação dos pacientes que irão responder ao tratamento com sunitinibe^{49, 96, 97}. No futuro, uma vez identificados e validados, estes marcadores podem auxiliar na escolha entre as múltiplas opções de tratamento no cenário atual^{47, 94, 96}.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar um perfil de expressão gênica preditivo resposta ao sunitinibe em carcinomas renais de células claras metastáticos.

3.2 Objetivos específicos

Determinar o perfil de expressão gênica das amostras da população do estudo.

Descrever as características epidemiológicas e clínico-patológicas dos pacientes e correlacioná-los com dados de resposta e sobrevida.

Estimar a sobrevida livre de progressão (SLP) e a sobrevida global (SG), com objetivo de identificar possíveis fatores prognósticos associados a expressão gênica encontrada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho e população do estudo

Trata-se de um estudo de coorte retrospectiva no qual avaliamos a expressão gênica de amostras de tumor primário obtidas por nefrectomia ou *core* biópsia, de uma população por conveniência de 60 pacientes adultos com diagnóstico de carcinoma renal de células claras metastáticos, tratados com sunitinibe em primeira linha no serviço de Oncologia Clínica do Hospital de Câncer de Barretos entre 2009 e 2018. O presente estudo foi aprovado pelo CEP do Hospital de Câncer de Barretos conforme parecer substanciado nº 2.787.173 em 22/06/18. O desenho do estudo foi submetido e aceito no *Clinical Trials* sob o registro NCT04415697.

4.2 Critérios de elegibilidade

Pacientes adultos (≥ 18 anos) do Hospital de Câncer de Barretos com diagnóstico de carcinoma renal de células claras metastático, no período entre 2009 e 2018, prescritos com sunitinibe no cenário de primeira linha de tratamento, e que dispõem unicamente de amostra de tumor primário obtidas por nefrectomia ou *core* biópsia. Todas as amostras tumorais foram revistas por um patologista experiente em oncologia urológica (Dr Frederico Santana).

4.3 Critérios de exclusão

Material insuficiente do tumor primário para análise molecular;
Pacientes com ausência de registro de dados de resposta ao tratamento;
Pacientes com histórico de tratamento sistêmico prévio para CCRcc metastáticos;
Pacientes com segundo tumor primário sincrônico ou metacrônico em tratamento;
Ter recebido menos de um ciclo de sunitinibe em primeira linha;
Ter recebido tratamento prévio adjuvante e/ou neoadjuvante, com intervalo $<$ de 1 ano entre o término do tratamento e o diagnóstico de metástase.

4.4 Coleta de dados

As informações epidemiológicas, demográficas e clínico-patológicas dos 60 pacientes foram coletadas por meio do Sistema Online do Hospital de Câncer de Barretos (SisOnco),

juntamente com a revisão dos dados nos respectivos prontuários físicos, na ficha de coleta de dados (Anexo C).

O registro, a organização e a guarda dos dados levantados, se deu na plataforma eletrônica de captura de dados para pesquisa científica conhecida como REDCap® (*Research Electronic Data Capture*).

4.5 Variáveis

Incluímos no levantamento de dados dos pacientes do estudo, variáveis demográficas, clínico-patológicas, e de resposta ao tratamento com sunitinibe.

Entre as características demográficas e clínico-patológicas incluímos as variáveis de sexo, cor, idade, peso e altura, o tipo de amostra do tumor primário, o subtipo histológico, grau de Furhman, tamanho do tumor primário, estadiamento TNM, grupos de risco prognósticos pelo IMDC, e de taxa de resposta ao tratamento (Anexo C).

O grau de Furhman diz respeito a avaliação microscópica da heterogeneidade nuclear, e desta forma pode classificar o padrão nuclear em 4 graus, sendo o grau quatro aquele de pior prognóstico³⁵.

A classificação prognóstica pelo IMDC, consiste na avaliação da presença de seis características clínico-laboratoriais que são consideradas como fator de risco: KPS (*Karnofsky Performance Status*) < 80%; intervalo entre o diagnóstico e tratamento < 1 ano; hemoglobina < 11g/dL, cálcio acima do limite superior de normalidade; neutrófilos acima do limite superior de normalidade; plaquetas acima do limite superior de normalidade. O paciente é considerado de risco favorável quando não apresenta nenhum dos fatores de risco acima; é considerado de risco intermediário se apresentar 1 ou 2 dos fatores de risco, e é considerado de risco pobre se apresentar 3 ou mais fatores de risco elencados acima.

Com relação a taxa resposta ao tratamento com sunitinibe, as variáveis avaliadas seguiram os critérios estabelecidos pelo RECIST 1.1⁹⁸, e foram definidas após avaliação realizada em conjunto com radiologista da instituição onde ocorreu o estudo. Das variáveis de taxa de resposta, foram formados dois grupos comparadores de resposta ao tratamento, conforme detalhado no tópico seguinte.

4.6 Definição dos grupos de resposta

Após coleta dos dados, separamos os pacientes em dois grupos conforme os dados de taxa de resposta ao tratamento na primeira avaliação radiológica que ocorre entre o 3º e 4º mês do início do tratamento, e após pelo menos um ciclo de tratamento com sunitinibe.

Esta avaliação radiológica foi efetuada conjuntamente com um radiologista experiente (Dr Fabiano Lucchesi), utilizando os critérios definidos pelo RECIST 1.1⁹⁸. Conforme tal análise, os pacientes foram alocados em 2 grupos comparativos (Tabela 1) de acordo a taxa de resposta radiológica em:

- 1) Grupo dos respondedores, quando apresentarem resposta completa (RC), resposta parcial (RP) ou doença estável (DE) utilizando os critérios do RECIST 1.1.
- 2) Grupo dos não-respondedores, quando apresentarem progressão de doença (PD) utilizando os critérios do RECIST 1.1, ou morte.

Tabela 1 - Grupos de resposta definidos pelo RECIST 1.1.

RESPONDEDORES	NÃO - RESPONDEDORES
Resposta Completa	Progressão de Doença
Resposta Parcial	Morte
Doença Estável	

4.7 Análise molecular

4.7.1 Extração de RNA

Dos blocos parafinados contendo material tumoral dos casos incluídos, foram cortadas 5 lâminas de 10 micras para posterior extração de RNA. Em uma lâmina de hematoxilina-eosina de cada caso, a área tumoral foi identificada e demarcada pelo médico patologista.

A próxima etapa foi realizar a macrodissecção do material, utilizando um bisturi, para um tubo *ependorf*, seguida da extração do RNA total utilizando o *RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion-Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA)*, seguindo as recomendações do fabricante e conforme descrito abaixo.

Após a macrodissecção, foi realizada a extração do RNA. Esta, consta da etapa de desparafinização, onde é adicionado às amostras 1 ml de xilol 100% (*Invitrogen, UK*), incubando por 5 minutos a 50°C para derreter a parafina, seguido de centrifugação por 5 minutos em velocidade máxima para sedimentar o tecido. Logo, despreza-se o sobrenadante lavando duas vezes com 1 ml de etanol absoluto. Após a lavagem com etanol 100%, centrifugamos á vácuo por 10 min á 45°C para secagem do *pallet*.

Na sequência, vem a etapa de digestão com protease, onde as proteínas ligadas ao material genético da amostra são degradadas, adicionando 200 µl de tampão de digestão e 4 µl de protease, seguido de incubação por 3 horas a 50°C e 15 minutos a 80°C á 500rpm, em seguida, o *mix* é brevemente centrifugado (*spin*) para evitar quaisquer gotas de condensação.

Após a digestão com protease e com o tampão, segue-se a etapa de isolamento e purificação de ácidos nucleicos. Para isso é adicionado à amostra, 240 µL de Aditivo de Isolamento e 550µL de etanol 100%. Essa mistura é adicionada ao tubo *Filter Cartridge* (fornecido pelo fabricante) e centrifugados a 10.000x por 30 segundos, de forma que o ácido nucleico fique ligado a coluna de sílica. Segue-se então a lavagem da coluna de sílica com solução *Wash 1* (fornecido pelo fabricante) e solução *Wash 2* (tampão de lavagem fornecido pelo fabricante).

Terminado o isolamento dos ácidos nucleicos, a etapa seguinte consiste em degradação do DNA. Esta ocorre pela adição de 6µl de DNase buffer, 4µl de DNase e 50µl de água à amostra, para então esse *mix* ser incubado por 30 minutos em temperatura ambiente. Segue-se então a lavagem da coluna de sílica novamente com 700µl de *Wash 1* (fornecido pelo fabricante), deixando incubar por 1 minuto em temperatura ambiente, seguida de nova centrifugação por 1 minuto á 10.000 rpm. Segue-se então, nova lavagem da coluna de sílica com 500µl de *Wash 2* (tampão de lavagem fornecido pelo fabricante), seguido de centrifugação por 1 minuto á 10.000 rpm. É realizada centrifugação adicional por 1 minuto á 10.000 rpm para remoção de qualquer fluído residual.

Ao final, o RNA isolado é eluído com 30µl de água ultra pura, incubado em temperatura ambiente por 1 minuto, e logo, centrifugado por 1 minuto á 14.000 rpm.

A qualidade do RNA obtido foi avaliada por *NanoDrop® Spectrophotometer v3.7* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA*), pelas razões A260/A280 de 1.7–2.3 e A260/A230 de 1.8–2.3. A quantificação do RNA, foi realizada no Qubit (*Invitrogen*).

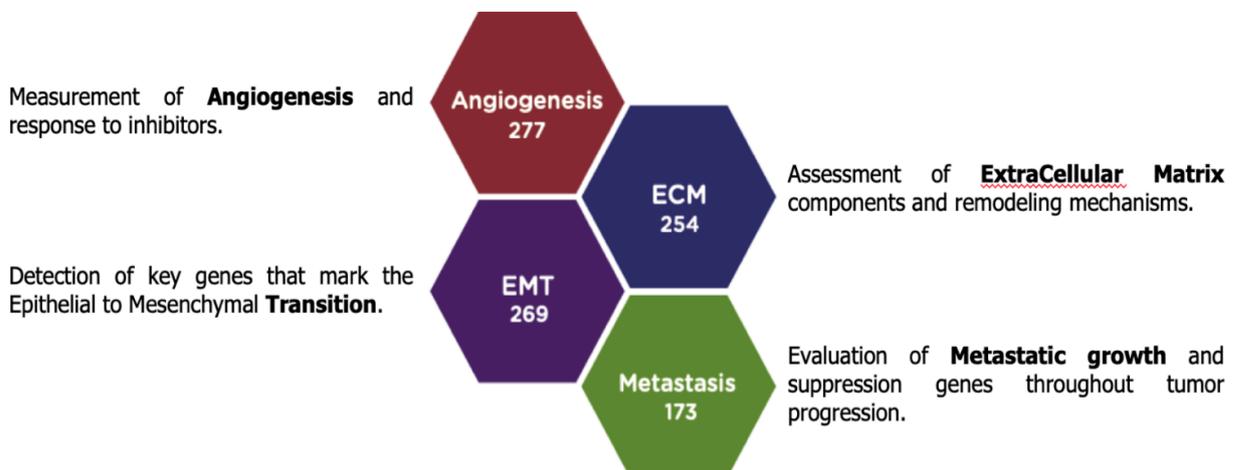
Verificada a qualidade e quantidade do RNA, o material foi armazenado em freezer no CPOM á – 80°C, aguardando a próxima etapa.

4.7.2 Análise da expressão gênica pela plataforma *Nanostring*.

4.7.2.1 Princípios da tecnologia *Nanostring*:

A tecnologia *nanostring* é uma plataforma de contagem digital que permite a detecção de centenas de moléculas em um único ensaio. O princípio da técnica inclui a utilização de *barcodes* moleculares (código baseado em combinações de seis sequências com quatro cores distintas), e posteriormente a geração de uma imagem microscópica digital de alta resolução, que juntos permitem a contagem de diversas moléculas únicas em uma única reação⁹⁹.

No presente estudo, para análise da expressão gênica utilizamos o painel *nCounter PanCancer Progression Panel* (*NanoString Technologies*, Seattle, WA, EUA). Este painel contempla 770 genes alvos sabidamente envolvidos no processo patológico de desenvolvimento e progressão tumoral, tais como alguns genes relacionados a angiogênese, remodelamento da matriz extracelular, ao processo de transição epitélio-mesênquima, e de metástase¹⁰⁰ (Figura 6). Todos os 770 genes que compõem o painel e suas respectivas vias de atuação estão elencados no anexo D.



Fonte: modificado de Warren.¹⁰⁰

Figura 6 - Vias relacionadas aos genes que compõem o painel de progressão.

A técnica *nanostring* é considerada extremamente sensível quando comparada à PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real e não necessita de reações enzimáticas intermediárias, nem amplificação. Além disso, ela é capaz de detectar fragmentos

provenientes de amostras com alto grau de degradação, tais como amostras derivadas de tecido parafinado¹⁰¹.

O processo inicia-se com a adição de *probes* específicas que possuem tanto uma sequência de pares de bases complementar para cada alvo de interesse, como *barcodes* moleculares fluorescentes únicos. No primeiro passo, cada *probe* contendo um *barcode* único irá hibridizar com um alvo de interesse na solução, assim, várias *probes* com seus respectivos *barcodes* diferentes são adicionadas, permitindo que os mesmos sejam identificados. Essas *probes* são de dois tipos: a primeira conhecida como *reporter*, possui os códigos de cores em sua extremidade 5', desta forma, carrega o sinal identificador que possibilita a leitura digital. A segunda *probe* (*probe* de captura) contém a biotina em sua extremidade 3', a qual proporciona que o complexo *probe*/alvo seja imobilizado por meio de *beads* magnéticas contidas em um cartucho específico (*nCounter Cartridge*), que contém estreptavidina em seu interior.

Na segunda etapa, as amostras são levadas para o equipamento *nCounter PrepStation*, onde ocorre um processo automatizado de purificação (para retirada do excesso de sondas que não foram hibridizadas), imobilização e alinhamento dos complexos *probes*/alvos dentro dos cartuchos. Concluída esta etapa, os complexos estarão purificados e imobilizados dentro dos cartuchos, prontos para a leitura dos dados por um processo de contagem digital¹⁰⁰.



Fonte: brochura eletrônica da *NanoString® Technologies*.

Figura 7 - Cartucho (*nCounter cartridge*)

A próxima etapa, é a leitura digital dos complexos hibridizados no interior dos *slots* de cada cartucho (Figura 7). De maneira automatizada, o equipamento *nCounter Digital Analyzer* processa o exame das sondas através da leitura digital de um *barcode* com código de cores

único, identificando assim as amostras hibridizadas presentes em cada *slot* do cartucho. Cada código de cor é correspondente a um RNA alvo específico, e assim é possível realizar a contagem absoluta de cada molécula presente nas amostras. Por fim, o equipamento entrega o resultado desta contagem digital de forma tabulada em arquivos com um formato chamado RCC (*Reporter Code Count*), extraídos através de um *pendrive*.

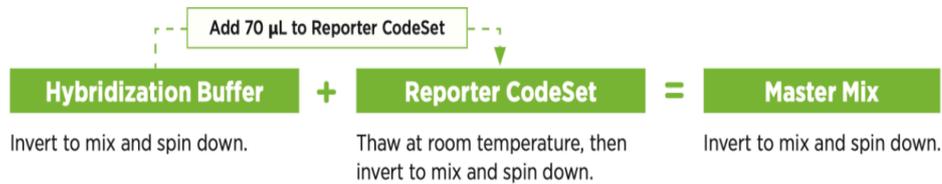
O sistema *nCounter* (*NanoString Technologies*, Seattle, WA, EUA) é um dispositivo automatizado que requer pouco tempo de atividades de bancada e pode processar até 12 amostras distintas simultaneamente.

4.7.2.2 Protocolo técnico da análise gênica:

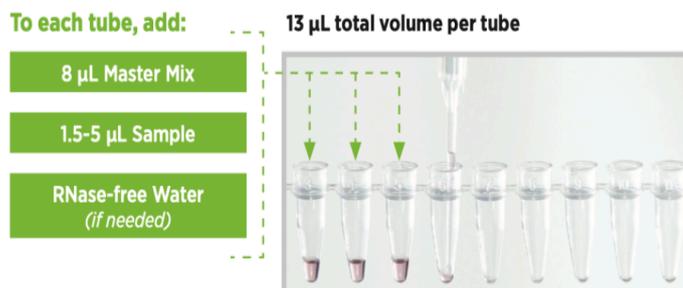
Seguindo o protocolo recomendado pelo kit *nCounter XT CodeSet Gene Expression Assays*, deve ser preparado um *master mix* para 12 amostras por vez: adicionando 70 μL do buffer de hibridização em um microtubo contendo a sonda *reporter* (fornecido pelo kit). Após etiquetar os tubos de hibridização, é adicionado 8 μL do *master mix* em cada um dos 12 tubos. Posteriormente adiciona-se 5 μL da amostra de RNA total a cada um dos microtubos, seguido da adição de 2 μL da sonda *capture* (Figura 8). Imediatamente, os microtubos são levados para a etapa de hibridização a 65°C durante 21 horas no termociclador pré-aquecido.

Após a finalização da etapa de hibridização, as amostras são transferidas para uma estação de preparação automatizada (*PrepStation*) para purificação e preparação das amostras dentro dos cartuchos (*nCounter*[®] *Cartridge*). Este processo tem duração aproximada de 3 horas e 30 minutos. Finalmente, os cartuchos contendo os complexos imobilizados e alinhados são transferidos manualmente para o *nCounter Digital Analyzer* (*NanoString*[®] *Technologies*), que procederá com a leitura digital dos complexos formados pelos genes e amostras, identificados por um barcode único, fornecendo cerca de 600 imagens de alta resolução por amostra. Este processo tem a duração de 1 hora e 30 minutos.

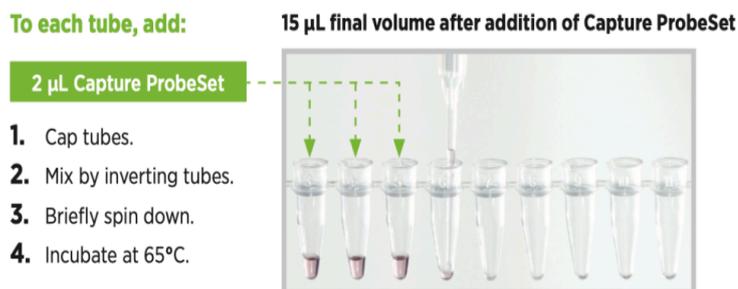
1. Create Master Mix



2. Set up Hybridization Reactions



3. Complete Hybridization Reactions



Fonte: brochura eletrônica da NanoString® Technologies.

Figura 8 - Workflow para *nCounter XT gene expression assays*.

4.8 Análise bioinformática

Os valores brutos obtidos no equipamento *nCounter Digital Analyzer*, foram exportados em formato RCC em uma mídia removível. Os dados em formato RCC foram então importados para análise de bioinformática em ambiente estatístico-matemático R Studio (*R-project v3.6.6; The R Foundation*, Viena, Áustria), utilizando um pacote de pré-processamento, que originalmente foi desenvolvido para normalização e processamento de dados neste ambiente estatístico-matemático chamado *NanoStringNorm*. O *NanoStringNorm* é portanto um conjunto de ferramentas utilizadas para pré-processar, executar diagnósticos e visualizar dados de expressão do *Nanostring nCounter*¹⁰². Este pacote será utilizado no *Galaxy*, que se trata de uma ferramenta de interface *user-friendly*, e visa tornar a biologia computacional

acessível a pesquisadores que não possuem experiência em programação de computadores ou administração de sistemas e que executa os *scripts* na linguagem R. O *Galaxy* é um software que se diferencia pela sua aceitabilidade de diferentes pacotes utilizados para a análise comparativa de dados genômicos, por isso foi escolhido para as análises de controles de qualidade e de normalização dos dados¹⁰³.

A etapa de normalização dos dados tem como objetivo corrigir mínimas flutuações técnicas entre as amostras submetidas a condições experimentais. A normalização é então uma ferramenta utilizada na tentativa de reduzir a variação exagerada de contagem entre amostras ocasionadas por algum fator técnico e/ou biológico¹⁰⁴.

Esta normalização é feita pela multiplicação dos valores de contagem das moléculas por um fator de normalização dividido pela soma de cada amostra. Estes cálculos são obtidos automaticamente pelo software *Galaxy*.

Os dados foram normalizados por *quantil*, nos quais, os valores são multiplicados por um fator de normalização previamente calculado. Este fator de normalização corresponde à razão entre a média aritmética e média geométrica de todos os valores de contagens dos genes. A etapa de normalização será realizada utilizando o software *Galaxy*. Os dados já normalizados foram novamente importados ao ambiente R para análise estatística e geração de gráficos específicos tais como *boxplots*, PCAs e *heatmaps*. Para essa etapa foi realizado o teste T considerando o nível de significância de $p < 0,05$ e *Fold Change* de 1,5 (ou seja, quantas vezes um gene está expresso com relação ao outro grupo amostral que está sendo comparado).

4.9 Análise estatística

4.9.1 Cálculo amostral

Embora sendo uma amostra por conveniência, realizamos o cálculo do tamanho amostral com a finalidade de estimar o poder estatístico do presente estudo. Com base nos dados do trabalho pivotal de Motzer *et al.*⁵², realizamos o cálculo amostral para sobrevida livre de progressão (SLP), e, considerando uma diferença clinicamente relevante (HR 0,42) em SLP com nível de significância de 5%, uma amostra de 60 pacientes proporcionaria um poder estatístico de 90%. Também, realizamos cálculo amostral para taxa de resposta ao sunitinibe com base na atualização do trabalho de Motzer *et al.*⁶⁰ e, levando em conta um nível de significância de 5%, o tamanho amostral de 60 pacientes confere um poder estatístico de 80%.

4.9.2 Método estatístico

Para finalidade deste estudo, o levantamento dos dados de interesse foi realizado por meio de ficha individual padronizada. Para registro e arquivo das informações, bem como o posterior processamento estatístico, foi criado um banco de dados específico em SPSS com os elementos epidemiológicos, clínicos patológicos, e de desfechos de resposta e de sobrevida dos pacientes incluídos no estudo.

Para testar a associação entre a frequência de expressão gênica e os diferentes subgrupos patológicos em estudo, foi utilizado o teste de χ^2 ou teste exato de Fisher. Curvas de sobrevida foram desenvolvidas usando o método de Kaplan-Meier.

Estimamos a sobrevida livre de progressão (SLP) e a sobrevida global (SG). A SLP foi definida como o tempo desde o diagnóstico da metástase até a primeira progressão de doença ou morte por qualquer causa (a que ocorrer primeiro). Caso a progressão de doença ainda não tenha ocorrido, os pacientes foram censurados na data do último seguimento. A SG foi definida como o tempo entre a data do diagnóstico da metástase até a data do óbito por qualquer causa ou censura na data do último seguimento, caso o óbito não tenha ocorrido.

As variáveis das características clínicas e patológicas foram comparadas utilizando o teste de *Log-rank*. Posteriormente, através da regressão logística verificamos a relação conjunta entre as características do paciente, taxa de resposta, sobrevida livre de progressão e sobrevida global, utilizando o modelo reduzido (método de *Backward*). Para isso, selecionamos apenas as variáveis que obtiverem *p*-valor menor que 0,2 em teste anterior.

Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Todas estas análises estatísticas foram realizadas no programa IBM-SPSS para Windows/Mac, versão 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Formação amostral

A partir do levantamento retrospectivo do período entre janeiro de 2009 e janeiro de 2018 no Hospital de Câncer de Barretos foram incluídas no estudo uma amostra por conveniência de 84 pacientes. Do levantamento inicial, um total de 24 pacientes foram excluídos: 3 pacientes que não receberam nenhum ciclo sunitinibe; 4 pacientes que apresentavam um segundo primário com indicação de tratamento; 5 pacientes que não apresentaram registro de dados de resposta ao tratamento; 6 pacientes foram excluídos após revisão histopatológica não confirmar a histologia de CCR do tipo células claras; 6 pacientes por material insuficiente para realizar análise molecular (Figura 9).

Após aplicação dos critérios de exclusão, a amostra final contou com 60 pacientes. Dos pacientes incluídos, 34 foram alocados no grupo dos respondedores e 26 no grupo dos não respondedores, após etapa de "Definição dos grupos de resposta" pelos critérios estabelecidos no item 4.6 da metodologia.

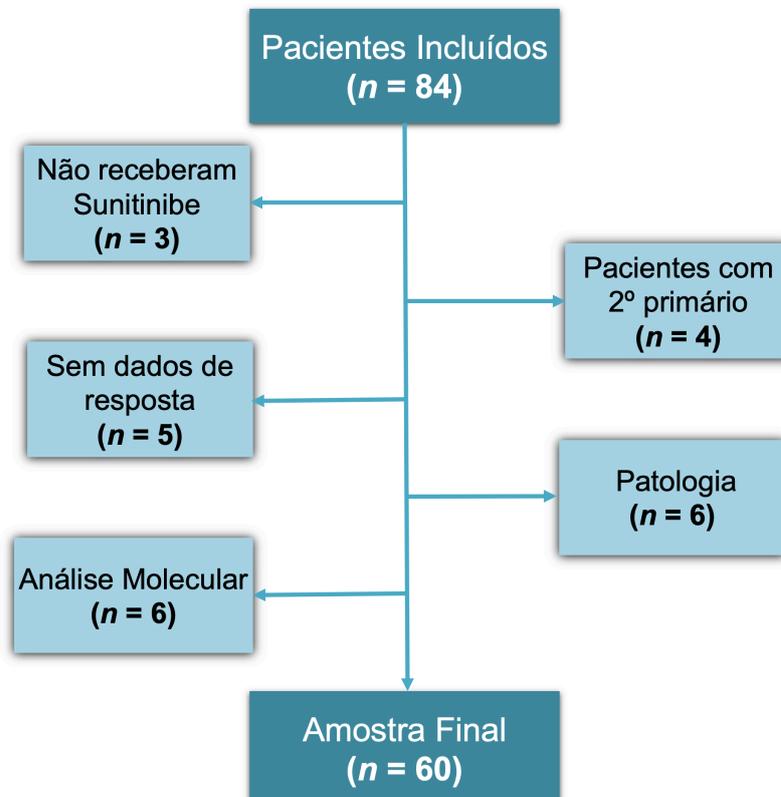


Figura 9 - Fluxo das amostras finais incluídas no estudo.

5.2 Características epidemiológicas e clínico-patológicas

Com base nos levantamentos de dados epidemiológicos e clínico-patológico dos 60 pacientes com carcinoma renal de células claras metastáticos que usaram sunitinibe na primeira linha de tratamento, resumimos as variáveis agrupadas das principais características demográficas e clínico-patológicas da população (Tabela 2).

Da série avaliada encontramos uma maior prevalência de pacientes do sexo masculino (66,7%), correspondendo a uma proporção de aproximadamente 2:1, com relação ao sexo feminino. A idade mediana ao diagnóstico foi de 59 anos, variando de 29 - 76 anos, sendo que os pacientes ≤ 60 anos corresponderam a 58,3%. Os pacientes brancos formaram 66,7% dos casos, os pacientes negros/pardos 31,7% e um paciente não possuía dados de cor (1,7%) (Tabela 2).

A mediana do IMC foi de 26,9. Os pacientes com $\text{IMC} \geq 25$ representaram metade da amostra e aqueles com $\text{IMC} < 25$ foram 33,3%, e os pacientes sem dados disponíveis para o cálculo desta variável somaram 16,7% ($n=10$) (Tabela 2).

No aspecto clínico-patológico, o subtipo histológico de células claras sem outra especificação compreendeu 85% das amostras e 55% das amostras corresponderam ao alto grau de *Furhman*.

Tabela 2 – Características da população.

Variável	Amostra (N=60)
<i>Sexo</i> — % (n)	
Masculino	66,7 (40)
Feminino	33,3 (20)
<i>Idade mediana</i> — anos (min-max ¹)	
	59 (29 - 76)
<i>Cor</i> — % (n)	
Branco	66,7 (40)
Não-branco ^b	31,7 (19)
Missing ^c	1,7 (1)
<i>Amostra do Tumor Primário</i> — % (n)	
Nefrectomia	96,7 (58)
Core biópsia	3,3 (2)
<i>IMC</i> — % (n)	
≥ 25	50 (30)
< 25	33,3 (20)
Missing ^a	16,7 (10)
<i>Subtipo Histológico</i> — % (n)	
Cel. C. sem outra especificação	85 (51)
Cel. C. especificada	15 (9)
<i>Grau de Furhman</i> — % (n)	
Baixo Grau (I - II)	36,7 (22)
Alto Grau (III - IV)	55 (33)
Missing ^a	8,3 (5)
<i>Tamanho do Tumor Primário</i> — % (n)	
≤ 10 cm	63,3 (38)
> 10 cm	36,7 (22)
<i>Estadiamento TNM</i> — % (n)	
Metastático	45 (27)
Não-metastático	55 (33)
<i>Grupo de Risco pelo IMDC</i> — % (n)	
Favorável (0 FR)	20 (12)
Intermediário (1 – 2 FR)	70 (42)
Pobre (≥ 3 FR)	10 (6)

IMC: índice de massa corpórea; Cel. C.: células claras; TNM: tumor; nodal; metastático; IMDC: *International Metastatic Database Consortium*; FR: fator de risco

^a: Pacientes com dados de insuficientes para o cálculo da variável.

¹: min: valor mínimo; max: valor máximo.

^b: Nesta agrupamento estão os negros (5%) e pardos (26,7%).

^c: Pacientes com dados de insuficientes para o cálculo da variável

(Tabela 2). A mediana de tamanho do tumor primário ao diagnóstico foi de 9cm (min. 4 - máx. 20cm), sendo que 63,3% dos pacientes apresentaram tumores primários de ≤ 10 cm. Com relação ao estadiamento TNM, 55% dos pacientes ao diagnóstico tinham doença não-metastática e o restante, 45%, eram metastáticos ao diagnóstico (Tabela 2).

A classificação de risco de acordo o IMDC foi realizado. O grupo de risco intermediário representou a maioria dos casos (70% dos pacientes), seguido do grupo de risco favorável (20%) e por último o grupo de risco pobre (10%) (Tabela 2).

Com relação a frequência dos principais sítios de metástase dos pacientes do estudo, encontramos a maior prevalência de lesões a distância no pulmão, seguido dos linfonodos, adrenais e ossos (Figura 10).

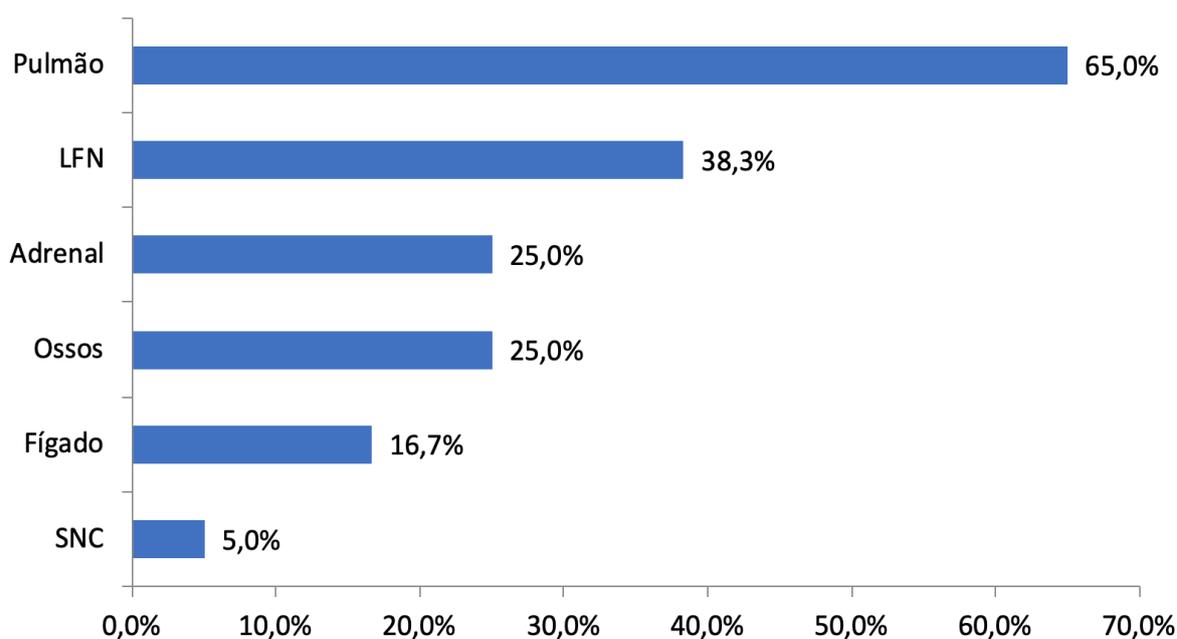


Figura 10 - Frequência dos sítios de metástases.

5.3 Taxa de Resposta Global (TRG) e Objetiva (TRO)

Os grupos de resposta foram classificados como respondedores e não-respondedores, conforme avaliação de taxa de resposta realizada pelo radiologista, utilizando os critérios do RECIST 1.1⁹⁸. O grupo dos respondedores corresponde aos pacientes que apresentaram resposta completa, resposta parcial ou doença estável; o grupo dos não-respondedores são aqueles pacientes que apresentaram progressão de doença ou óbito.

A taxa de resposta ao sunitinibe foi de 56,7%, destes, 1 paciente (1,7%) apresentou resposta completa, 17 pacientes (28,3%) apresentaram resposta parcial e 16 pacientes (26,7%) apresentaram doença estável (Tabela 3).

O grupo dos não-respondedores compreendeu 43,3% dos casos, sendo que 18 pacientes (30%) apresentaram progressão de doença e 8

pacientes (13,3%) foram a óbito antes da avaliação de resposta. Como mostrado também na tabela 3, avaliamos também a taxa de resposta objetiva relacionada ao tratamento com sunitinibe. Esta, representa somente os pacientes que tiveram resposta completa e resposta parcial.

Através do teste exato de Fisher, investigamos a associação entre a os grupos de risco pelo IMDC e os grupos de resposta ao tratamento com sunitinibe com a finalidade de observar a existência de alguma correlação com significância estatística entre os grupos. Não foi encontrada associação significativa entre os grupos de risco do IMDC e os grupos de resposta ao tratamento ($p= 0,138$).

5.4 Sobrevida Livre de Progressão (SLP)

A sobrevida livre de progressão (SLP) foi calculada com a ocorrência de 95% dos eventos na amostra do estudo, o que corresponde a 57 pacientes.

Tabela 3 – Dados de taxa de resposta global e resposta objetiva.

Grupos de Resposta	Tipos de Resposta ^a	
	Resposta Global ^b	Resposta Objetiva ^c
<i>Respondedores – % (n)</i>	56,7 (34)	30 (18)
Resposta Completa	1,7 (1)	1,7 (1)
Resposta Parcial	28,3 (17)	28,3 (17)
Doença Estável	26,7 (16)	—
<i>Não-respondedores – % (n)</i>	43,3 (26)	70 (42)
Doença Estável	—	26,7 (16)
Progressão de Doença	30 (18)	30 (18)
Morte	13,3 (8)	13,3 (8)

^a: Tipos de resposta ao tratamento em que os grupos dos respondedores e não-respondedores foram avaliados.

^b: Resposta global: engloba os pacientes que tiveram resposta completa, parcial e doença estável

^c: Resposta objetiva: engloba somente os pacientes que tiveram resposta completa e parcial. Neste grupo de avaliação, os pacientes com doença estável não entra no grupo de respondedores.

A SLP mediana dos pacientes incluídos no estudo foi de 13 meses (IC95% de 9,7 - 17,5 meses). A sobrevida livre de progressão aos 12 meses foi de 55% (Figura 11).

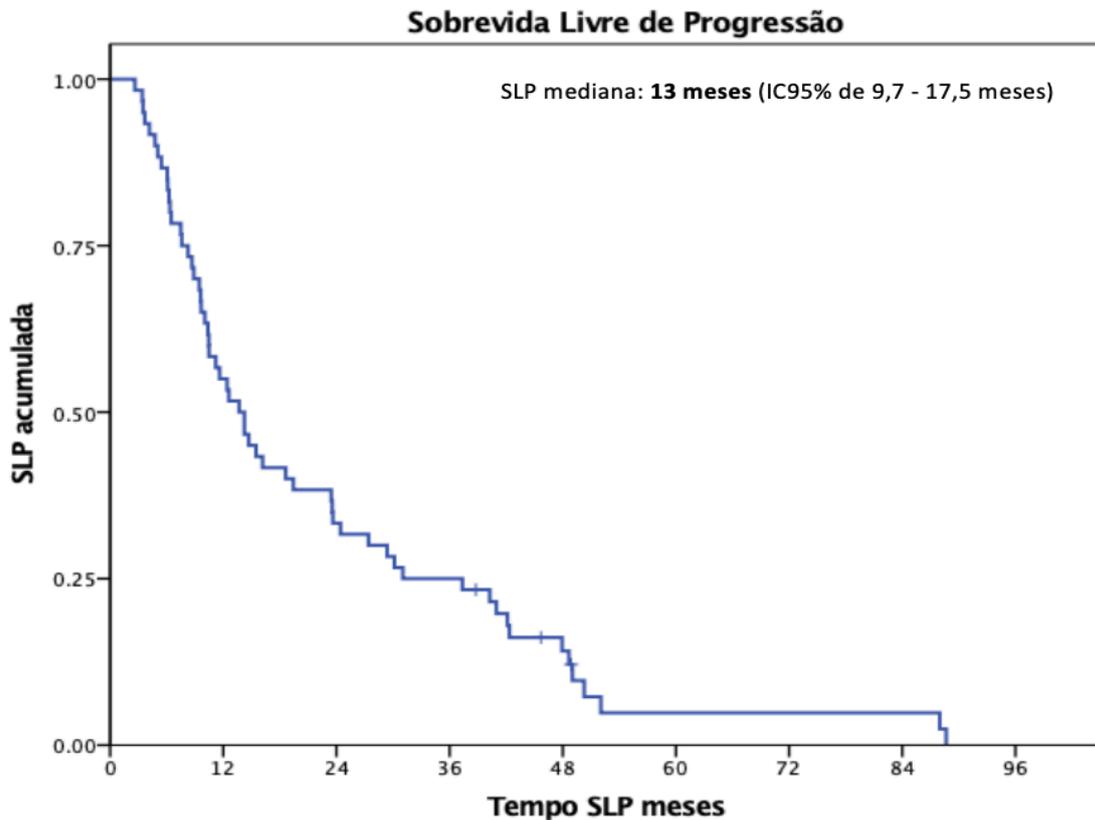


Figura 11 - Estimativa da sobrevida livre de progressão (Kaplan-Meier).

Os pacientes que responderam ao tratamento com sunitinibe (grupo dos respondedores) apresentaram uma maior SLP quando comparada ao grupo dos não-respondedores. O grupo dos respondedores apresentou uma SLP mediana de 27,4 meses (IC95% 18 - 36,7 meses) *versus* 7,5 meses (IC95% de 5,1 - 9,8 meses) do grupo dos não-respondedores ($p \leq 0.0001$) (Figura 12).

Em análise univariada, a resposta ao tratamento, o grupo de risco favorável pelo IMDC, o baixo grau de *Furhman* e aqueles com IMC ≥ 25 apresentaram uma melhor SLP, com diferença estatisticamente significativa (Tabela 4).

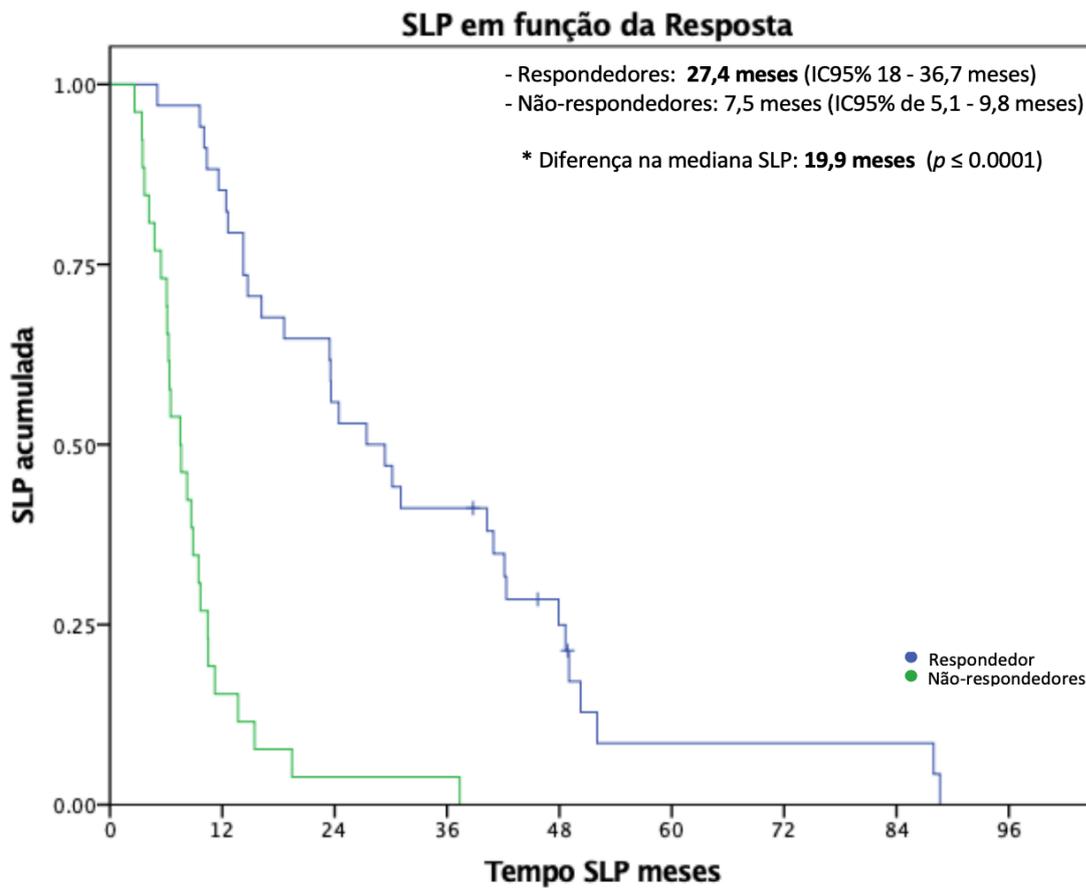


Figura 12 - Kaplan-Meier da SLP e taxa de resposta ao tratamento.

A sobrevida livre de progressão dos diferentes grupos de risco IMDC estão sumarizados também na tabela 4. Os pacientes com risco favorável, intermediário e pobre risco apresentaram respectivamente uma mediana de SLP de 23,4 meses, 13,6 meses e 3,6 meses ($p \leq 0,0001$). Pacientes com baixo grau de Furrhman atingiram uma mSLP de 18,6 meses *versus* 9,4 meses nos pacientes com alto grau ($p = 0,037$). Na análise do índice de massa corpórea (IMC), os pacientes com $IMC \geq 25$ apresentaram um ganho de 9,1m em mSLP, quando comparado aos pacientes com $IMC < 25$ ($p = 0,049$).

Em análise multivariada da SLP realizada através da regressão logística, utilizando o modelo reduzido (método de *Backward*), somente a resposta ao tratamento foi associada a uma diminuição no risco de progressão de doença com significância estatística naqueles pacientes que responderam ao tratamento (HR 0,03; IC95% 0,009 - 0,093; $p \leq 0,001$).

Tabela 4 – Análise univariada da sobrevida livre de progressão.

Variável	SLP mediana (m ^a)	IC 95%	p valor
<i>Resposta ao tratamento</i>			
Respondedores	27,4	(18 – 36,7)	≤ 0,0001
Não-respondedores	7,5	(5,1 - 9,8)	
<i>Grupo de Risco pelo IMDC^b</i>			
Risco Favorável	23,4	(10,9 – 35,9)	≤ 0,0001
Risco Intermediário	13,6	(9,6 – 17,7)	
Risco Pobre	3,6	(0,4 – 6,9)	
<i>Grau de Fuhman</i>			
Baixo Grau	18,6	(9,4 – 27,7)	0,037
Alto Grau	9,4	(6,9 – 11,9)	
<i>Índice de Massa Corpórea</i>			
≥ 25	19,4	(8,5 – 30,3)	0,049
< 25	10,3	(1 – 21,3)	

^a: "m": meses.

^b: IMDC: *International Metastatic Database Consortium*

5.5 Sobrevida Global (SG)

Após atualização dos dados de sobrevida global (SG), constatamos a ocorrência de 48 óbitos (80% dos casos). Com esta proporção de eventos, a mediana de SG foi de 34 meses (IC95% de 21,4 - 46,5 meses). A sobrevida global aos 12 meses foi de 76% (Figura 13).

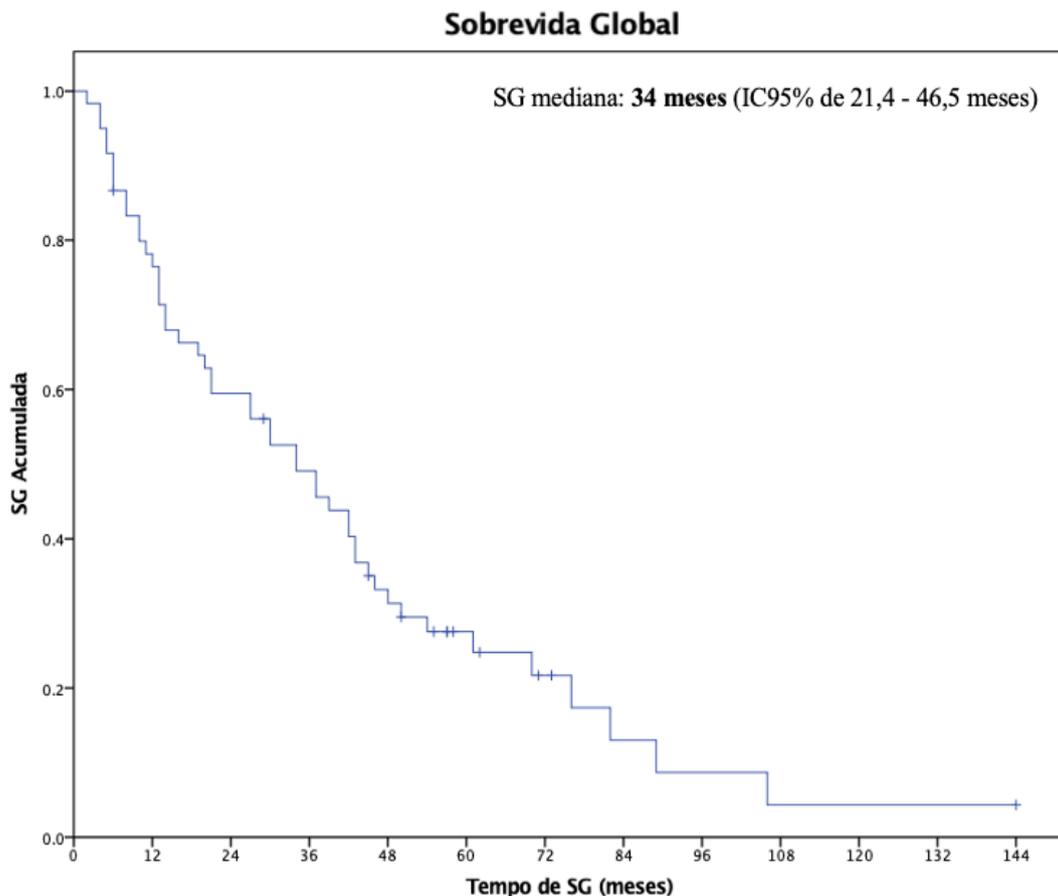


Figura 13 - Estimativa da sobrevida global (Kaplan-Meier).

Em análise univariada da mediana de sobrevida global, as variáveis de resposta ao tratamento, o grupo de risco IMDC, o grau de *Furhman* e o IMC, apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos, conforme exibido na tabela 5. Destacamos que com relação ao grupo de Risco IMDC, a mSG do subgrupo de risco favorável foi de 43,7 meses, do grupo de risco intermediário foi 35 meses e do risco pobre foi de 5,3 meses.

Em análise multivariada da SG realizada através da regressão logística, somente a resposta ao tratamento foi associada a uma diminuição no risco de morte nos pacientes que responderam ao tratamento (HR 0,07; IC95% 0,028 - 0,184; $p \leq 0,001$).

Tabela 5 – Análise univariada da sobrevida global.

Variável	SG mediana (m^a)	IC 95%	p valor
<i>Resposta ao tratamento</i>			
Respondedores	54,5	(37,7 – 71,4)	≤ 0.0001
Não-respondedores	12,7	(8,5 - 16,9)	
<i>Grupo de Risco IMDC^b</i>			
Risco Favorável	43,7	(37,6 – 49,7)	≤ 0.0001
Risco Intermediário	35,0	(19,4 – 50,5)	
Risco Pobre	5,3	(3,2 – 7,4)	
<i>Grau de Furhman</i>			
Baixo Grau	37,7	(20,2– 55,3)	0.021
Alto Grau	19,6	(9,6 – 29,5)	
<i>Índice de Massa Corpórea</i>			
≥ 25	43,7	(36,3 – 51,1)	0.016
< 25	15,0	(1 – 30,6)	

^a: IMDC: *International Metastatic Database Consortium*

^b: m: meses.

As curvas de Kaplan Meier da SG em relação aos grupos de resposta ao tratamento e IMDC são mostradas respectivamente nas figuras 14 e 15.

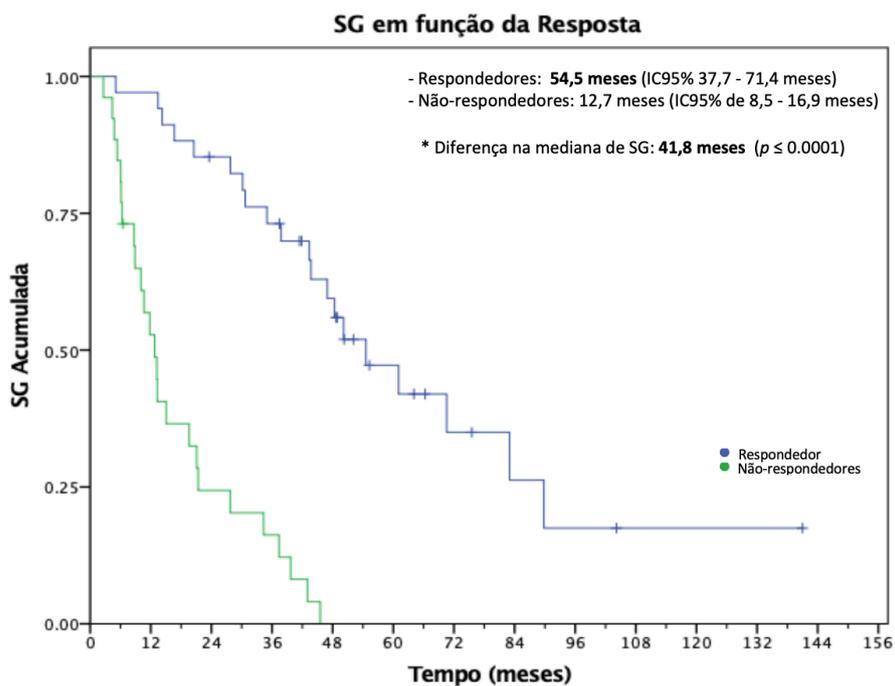


Figura 14 - Kaplan-Meier da sobrevida global relacionada a taxa de resposta ao tratamento.

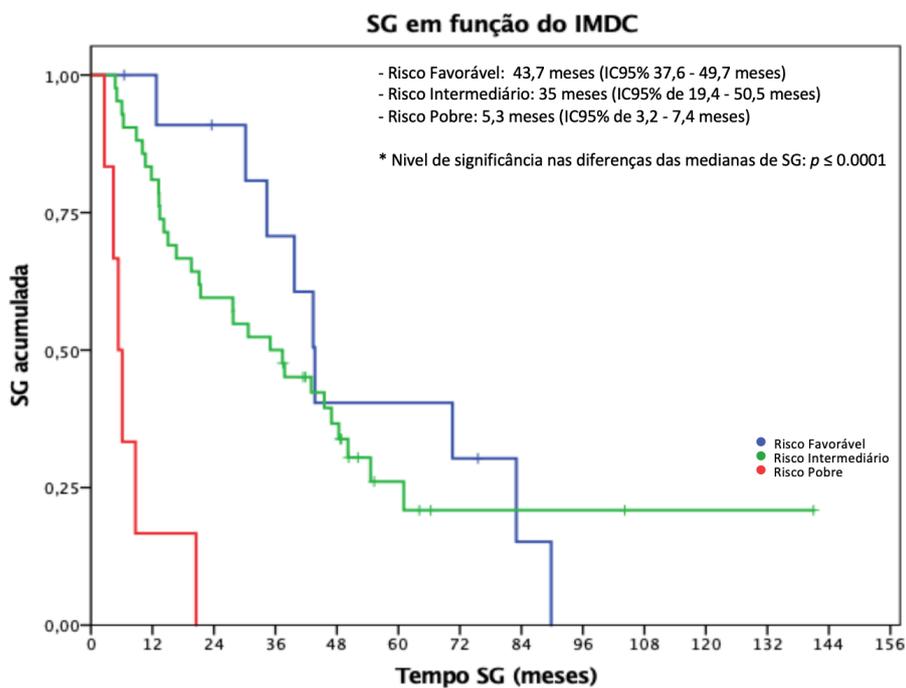


Figura 15 - Kaplan-Meier da sobrevida global relacionada ao IMDC.

5.6 Perfil de expressão gênica

5.6.1 Controle de qualidade dos dados de *nanosttring* e sua normalização

Iniciamos as análises verificando a qualidade dos dados em busca da existência de possíveis inconsistências na qualidade das amostras. Os dados brutos do *nCounter Digital Analyzer* (arquivos RCC) foram exportados para o *software nSolver 3.0* (*NanoString Technologies, Seattle, Washington, EUA*), com a finalidade de avaliarmos o desempenho geral do ensaio. Para isso, utilizamos os controles de qualidade do próprio *software nSolver*, como *binding density*, *imaging QC*, bem como da linearidade de controles positivos e negativos. Todas as amostras passaram nos controles de qualidade técnicas.

Na sequência, exportamos os dados brutos do *software nSolver* para uma planilha *.xls* (*eXcel Spreadsheet*) com o objetivo de prosseguir com as avaliações de qualidade e também de normalização utilizando o pacote *Quantro package*, dentro do ambiente *R Studio* (*R* versão 3.6.6). Este pacote auxilia na avaliação da qualidade do dado bruto, na observação de diferenças significativas de expressão entre os cartuchos, verificando, portanto, a existência dos chamados *Batches* de cartuchos (problemas técnicos relacionados aos cartuchos ou entre seus lotes). Além disso, apoia na análise das diferenças na distribuição global de grupos de interesse, que nos ampara na escolha do método de normalização. Nesta etapa, não constatamos erros de contagem amostral (*flags*) que evidenciassem problemas genéricos no *nSolver*, tampouco foram verificados *batches* de cartuchos (Figura 16).

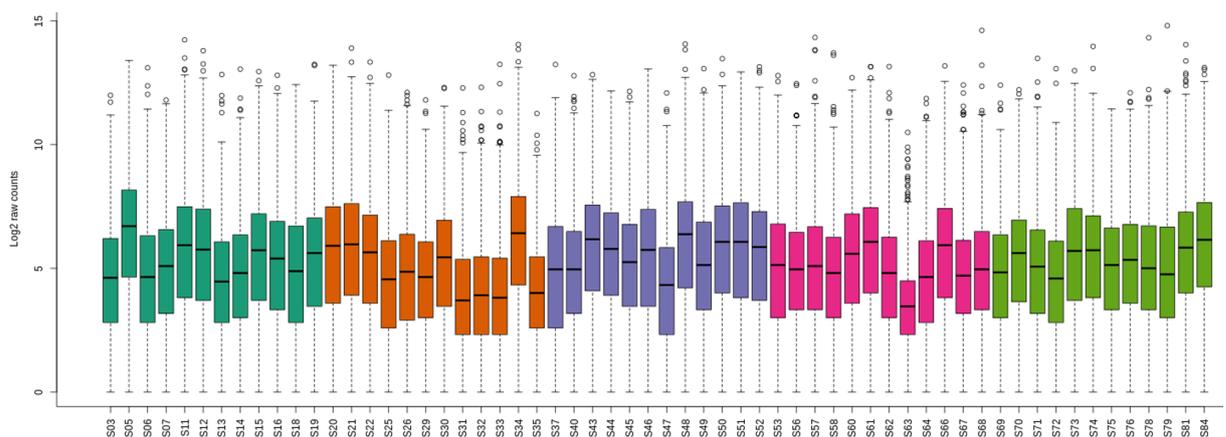


Figura 16 - Representação dos cartuchos com 12 amostras cada, diferenciados por cores. No eixo horizontal inferior estão representadas as amostras, iniciadas com a letra "S"; No eixo vertical à esquerda estão representados os logs de contagem de genes.

Na etapa seguinte, utilizamos o filtro *missing* com *cutoff* de 20 contagens em todas as

Tabela 6 – Controles positivos e negativos.

Code Class	Name	S03	S05
Positive	POS_A	26657	27441
Positive	POS_B	7401	8058
Positive	POS_C	2066	2239
Positive	POS_D	467	530
Positive	POS_E	84	83
Positive	POS_F	39	42
Negative	NEG_A	7	7
Negative	NEG_B	4	3
Negative	NEG_C	5	6
Negative	NEG_D	8	8
Negative	NEG_E	2	8
Negative	NEG_F	8	9
Negative	NEG_G	3	8
Negative	NEG_H	4	8

amostras para eliminar genes de baixa contagem.

Em seguida, realizamos uma inspeção visual para avaliação dos controles positivos e negativos das amostras pelo pacote *NanoStringNorm*. Na avaliação destes controles foram gerados tabelas e gráficos que mostram a qualidade dos dados.

Espera-se que os controles positivos apresentem um aumento linear do nível de contagem de "POS_F" até o "POS_A" e que os controles negativos apresentem um nível similar de baixa contagem, conforme exemplificado na Tabela 6.

Convertendo as informações dos exemplos amostrais acima em gráficos, observamos que os controles positivos apresentam aumento linear

do nível de contagem próxima a linha ascendente do gráfico, e os controles negativos se mostram com expressão baixa e um nível similar de contagem, sendo representado no gráfico de forma agrupada e abaixo a linha dos controles positivos, conforme esperado (Figura 17).

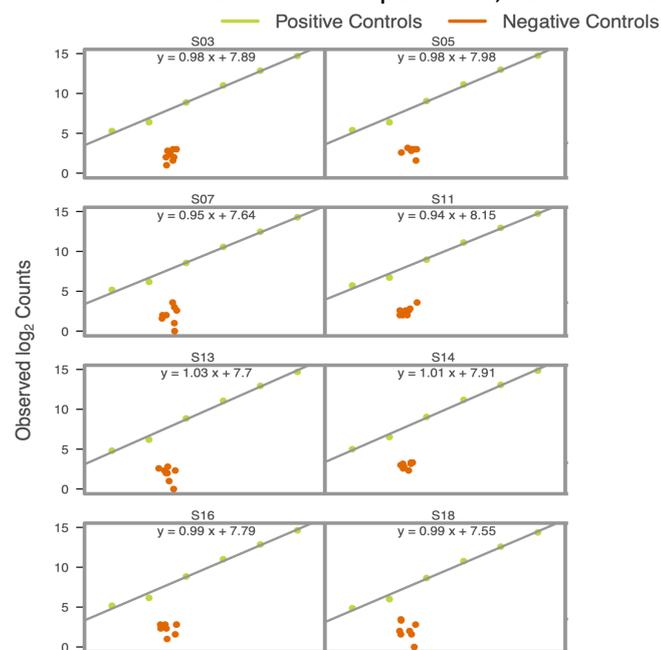


Figura 17 - Controles positivos lineares, e negativos agrupados. Os controles positivos (pontos verde-claros) aparecem em ascensão linear, enquanto os controles negativos (pontos alaranjados) aparecem agrupados com contagem inferior aos controles positivos.

Após as etapas de controle, procedemos com a normalização dos dados. Para tal, executamos a normalização por *Quantil* utilizando o software *NanoStringNorm* dentro do ambiente R (Figuras 18 e 19). Após normalização, não foram constatadas perdas devido a correção na disparidade da contagem de genes, nem na proporção de *missing*.

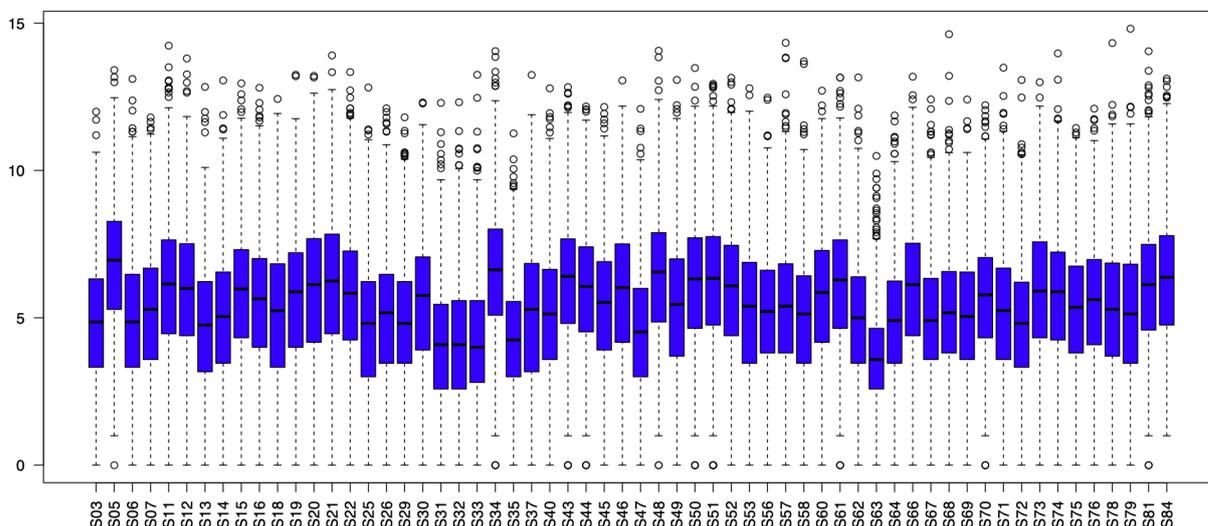


Figura 18 - Genes endógenos antes da Normalização: no eixo horizontal inferior estão representadas as amostras, iniciadas com a letra "S"; no eixo vertical á esquerda está representados o \log_2 da contagem dos genes.

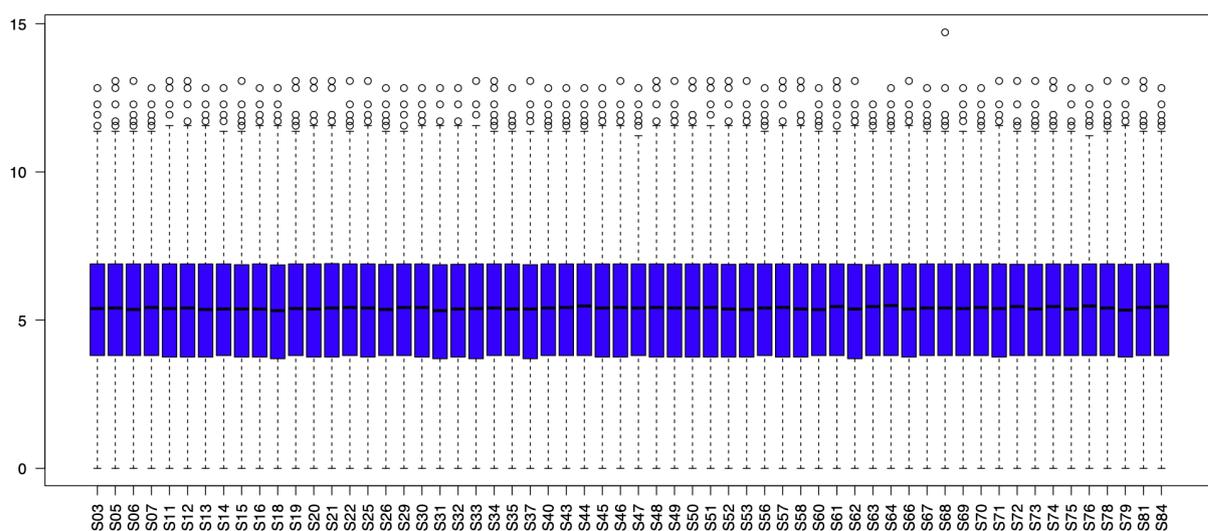


Figura 19 - Genes endógenos após a Normalização: no eixo horizontal inferior estão representadas as amostras, iniciadas com a letra "S"; no eixo vertical á esquerda está representados o \log_2 da contagem dos genes.

5.6.2 Perfil de expressão gênica diferencial entre os grupos de resposta

Utilizando o pacote *NanoStringNorm* no ambiente *R Studio*, avaliamos a expressão gênica diferencial das amostras entre os grupos de resposta (respondedores e não-

Tabela 7 – 31 genes diferencialmente expressos (TRG).

Genes	P^1 _Respondedores	FC^2 _Respondedores
A1	0,0067	0,9
B2	0,047	-0,6
C3	0,0032	0,9
D4	0,0036	0,8
E5	0,03	0,7
E6	0,017	0,6
G7	0,004	0,8
G8	0,035	-0,8
I9	0,00028	1
J10	0,047	0,6
K11	0,01	-0,6
L12	0,021	0,6
M13	0,019	-0,7
N14	0,0032	-0,7
O15	0,0072	-0,6
P16	0,05	-0,6
Q17	0,04	0,7
R18	0,0051	-0,6
S19	0,0027	0,6
T20	0,017	-0,7
U21	0,04	0,6
V22	0,012	0,8
X23	0,04	0,6
W24	0,026	0,7
Y25	0,016	0,6
Z26	0,022	0,6
A27	0,018	0,7
B28	0,024	0,8
C29	0,049	-0,7
D30	0,023	-0,6
E31	0,022	-0,6

¹: p valor
²: Fold Change.

Tabela 8 – 30 genes diferencialmente expressos (TRO).

Genes	P^1 _Respondedores	FC^2 _Respondedores
A1	0,047	0,7
F32	0,017	0,6
C3	0,017	0,8
G33	0,045	-0,7
D4	0,011	0,7
H34	0,048	-0,7
I9	0,021	0,8
I35	0,0028	-0,7
J36	0,05	0,8
K37	0,031	-0,8
J10	0,027	0,7
L38	0,022	-0,6
M39	0,027	1,1
N40	0,0072	-0,7
O41	0,02	0,7
N14	0,022	-0,7
P42	0,01	-0,6
Q43	0,0085	-0,9
P16	0,0047	-0,8
Q17	0,019	0,8
R44	0,021	0,6
S45	0,0087	0,6
S19	0,013	0,6
T20	0,016	-0,7
T46	0,012	-0,6
U47	0,021	-0,8
V48	0,008	-0,9
Y25	0,029	0,7
D30	0,026	-0,6
X49	0,036	0,6

¹: p valor
²: Fold Change.

respondedores), levando em conta a expressão de genes diferencialmente expressos com *fold change* de 1,5 e com nível de significância estatística de 95% ($p= 0,05$).

Na análise amostral do perfil de expressão gênica diferencial entre os grupos de resposta, considerando a taxa de resposta global (TRG), encontramos 31 genes diferencialmente expressos capazes de identificar com significância estatística o grupo dos respondedores, ou seja, aqueles pacientes que apresentaram resposta ao tratamento com uso de sunitinibe na 1ª linha terapêutica do carcinoma renal de células claras metastáticos, na amostra do presente estudo (Tabela 7).

Na mesma análise amostral do perfil de expressão gênica diferencial entre os grupos de resposta, mas agora considerando a taxa de resposta objetiva (TRO), obtivemos 30 genes diferencialmente expressos capazes de identificar os pacientes respondedores ao sunitinibe na 1ª linha terapêutica do carcinoma renal de células claras metastáticos (Tabela 8).

Ainda na análise gênica diferencial entre grupos de resposta, apresentamos nas Figuras 21 e 22, os *heatmaps* com o agrupamento hierárquico dos genes diferencialmente expressos, entre o grupo de pacientes respondedores e não respondedores, observados tanto na TRG (Figura 20), quanto na TRO dos pacientes tratados com sunitinibe (Figura 21).

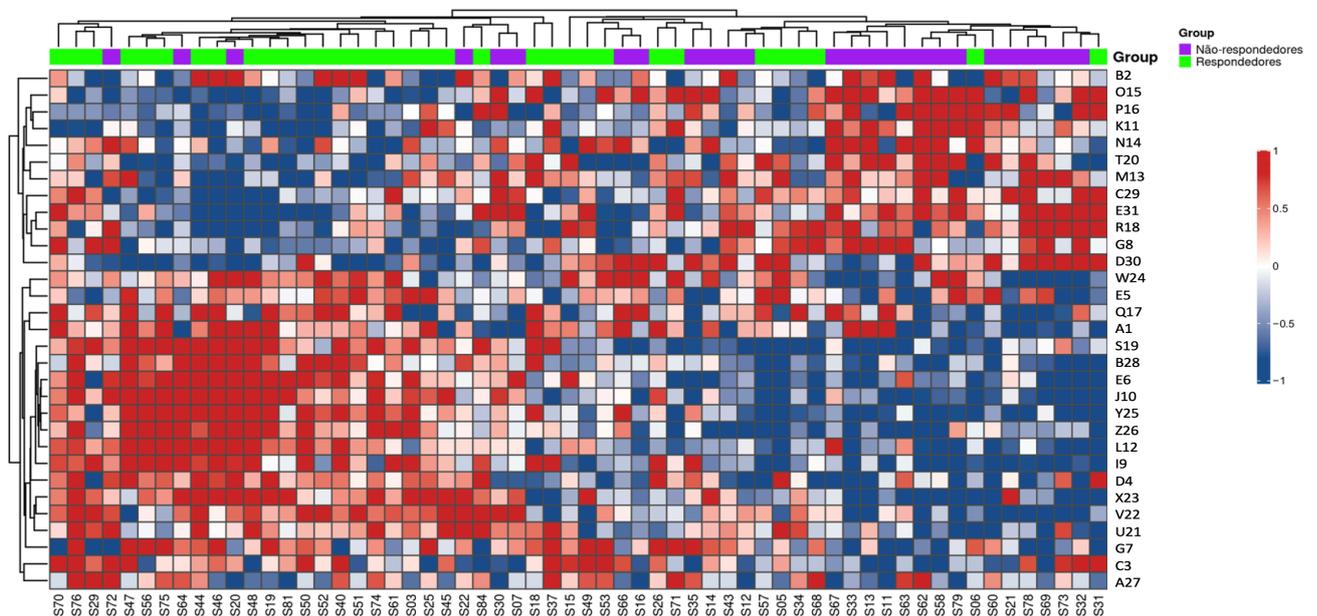


Figura 20 - *Heatmap* com agrupamento de genes diferencialmente expressos de acordo ao grupo de resposta global. No eixo horizontal estão representadas as amostras do estudo iniciadas com a letra "S"; no eixo vertical á direita estão os genes endógenos diferencialmente expressos e agrupados conforme os grupos de resposta (respondedor e não-respondedor); Genes com mais alta expressão estão representados em vermelho; Genes com mais baixa expressão estão representados em azul;

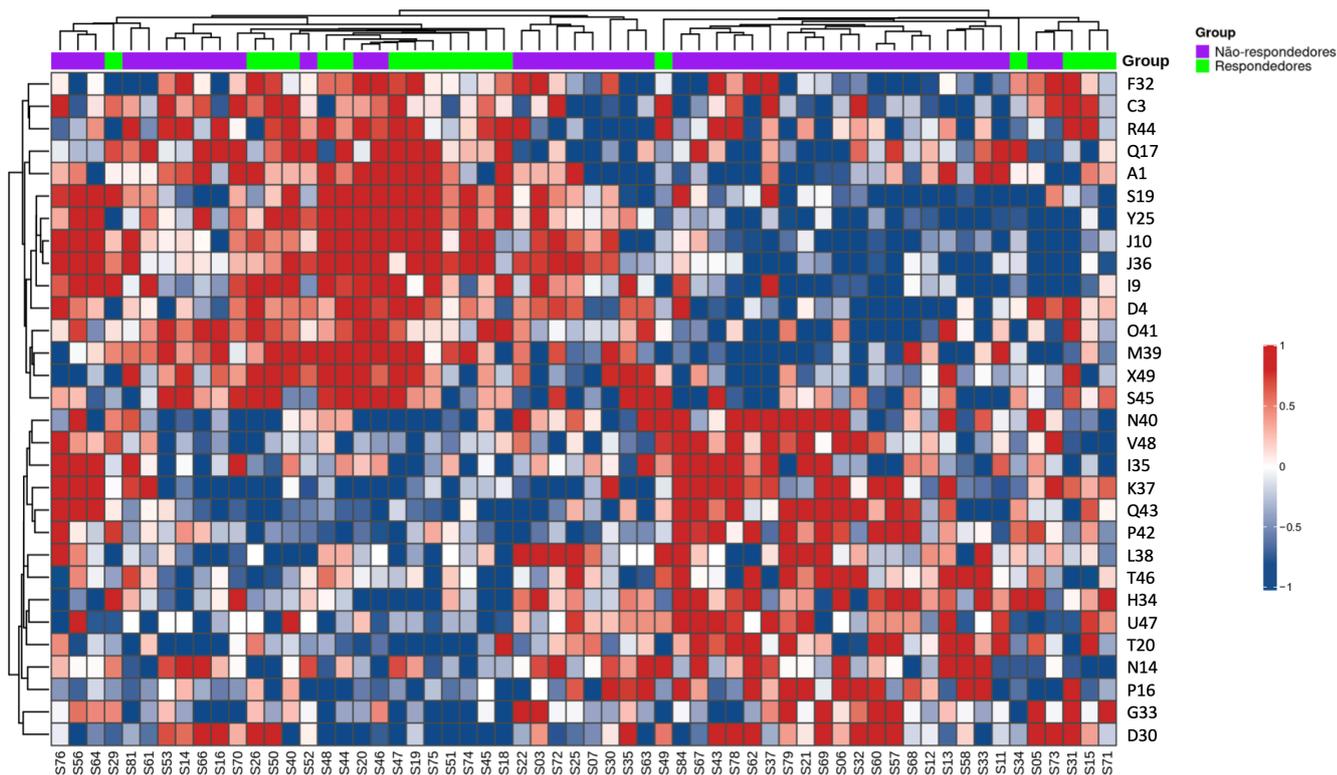


Figura 21 - Heatmap com agrupamento de genes diferencialmente expressos de acordo ao grupo de resposta objetiva. No eixo horizontal estão representadas as amostras do estudo iniciadas com a letra "S"; no eixo vertical á direita estão os genes endógenos diferencialmente expressos e agrupados conforme os grupos de resposta (respondedores e não-respondedores); Genes com mais alta expressão estão representados em vermelho; Genes com mais baixa expressão estão representados em azul;

Na figura 22, apresentamos o diagrama de Venn, que evidencia os genes que são comuns na resposta global e na resposta objetiva.

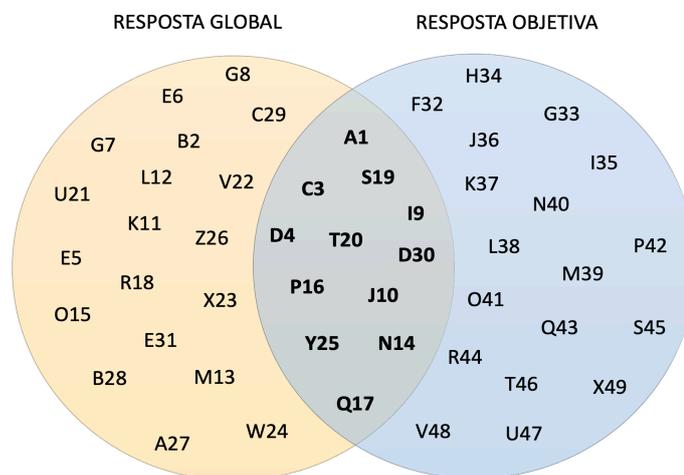


Figura 22 - Diagrama de Venn com os genes de resposta global e resposta objetiva ao tratamento.

5.6.3 Curva ROC individual e combinada dos genes associados a resposta

Com objetivo de avaliar a sensibilidade e especificidade dos genes diferencialmente expressos relacionados a taxa de resposta, realizamos curvas ROC (*receiver operating characteristic*) individuais e combinada dos genes que classificam as amostras em respondedores e não respondedores, utilizando-se de um *fold change* de 1,5 com nível de significância estatística de 95% ($p=0,05$). A forma de uma curva ROC e da sua AUC (*area under the curve*) nos auxilia a quantificar o poder discriminativo de um teste ou biomarcador¹⁰⁵. A AUC pode ter qualquer valor entre 0 e 1, sendo o AUC de 1,0 um teste discriminatório diagnóstico perfeito, enquanto um teste não discriminatório tem uma área menor que 0,5¹⁰⁵. Em geral uma AUC entre 0,7 e 0,8 é considerada aceitável para diferenciar um teste discriminatório de dois grupos¹⁰⁶.

Realizamos a curva ROC com os genes diferencialmente expressos conforme os grupos de resposta (respondedores e não-respondedores), levando em conta a taxa de resposta global ao tratamento. Os resultados são mostrados nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9 – Lista de genes das curvas ROC¹ individuais (grupo dos respondedores).

Genes	Sensibilidade	Especificidade	<i>cutoff</i> ²	AUC ³
I9	0,676470588	0,846153846	5,066	0,75113
G7	0,617647059	0,730769231	2,585	0,72681
S19	0,647058824	0,807692308	5,845	0,72002
D4	0,676470588	0,692307692	3,248	0,71833
C3	0,676470588	0,653846154	2	0,70984
L12	0,794117647	0,615384615	7,331	0,70645
A1	0,794117647	0,653846154	2	0,70305
B28	0,647058824	0,692307692	7,017	0,68948
E6	0,676470588	0,730769231	6,209	0,68269
Z26	0,735294118	0,615384615	4,728	0,68213
V22	0,529411765	0,769230769	6,18	0,67873
J10	0,764705882	0,653846154	5,781	0,6776
E5	0,647058824	0,615384615	3,524	0,67534
Y25	0,617647059	0,730769231	7,788	0,67534
X23	0,588235294	0,769230769	7,14	0,67421
W24	0,676470588	0,653846154	6,5	0,66233
Q17	0,676470588	0,576923077	3,459	0,65724
U21	0,588235294	0,653846154	8,963	0,65724
A27	0,529411765	0,692307692	2	0,64649

¹: ROC (*Receiver Operating Characteristics*):

²: *Cutoff*: Ponto de corte

³: AUC (*Area Under the Curve*): Área sob a curva.

Tabela 10 – Lista de genes das curvas ROC¹ individuais (grupo não-respondedores).

Genes	Sensibilidade	Especificidade	<i>cutoff</i> ²	AUC ³
K11	0,653846154	0,705882353	5,524	0,724547511
R18	0,769230769	0,647058824	7,596	0,721719457
N14	0,769230769	0,558823529	2,322	0,719457014
O15	0,615384615	0,705882353	9,563	0,694004525
M13	0,730769231	0,558823529	2	0,69061086
E31	0,576923077	0,794117647	6,15	0,688348416
T20	0,692307692	0,676470588	4,459	0,680429864
D30	0,576923077	0,676470588	8,637	0,661764706
C29	0,615384615	0,647058824	11,37	0,647624434
G8	0,653846154	0,588235294	3,459	0,638574661
P19	0,576923077	0,676470588	3,807	0,632352941
B2	0,653846154	0,529411765	2,585	0,625

¹: ROC (*Receiver Operating Characteristics*):

²: *Cutoff*: Ponto de corte

³: AUC (*Area Under the Curve*): Área sob a curva.

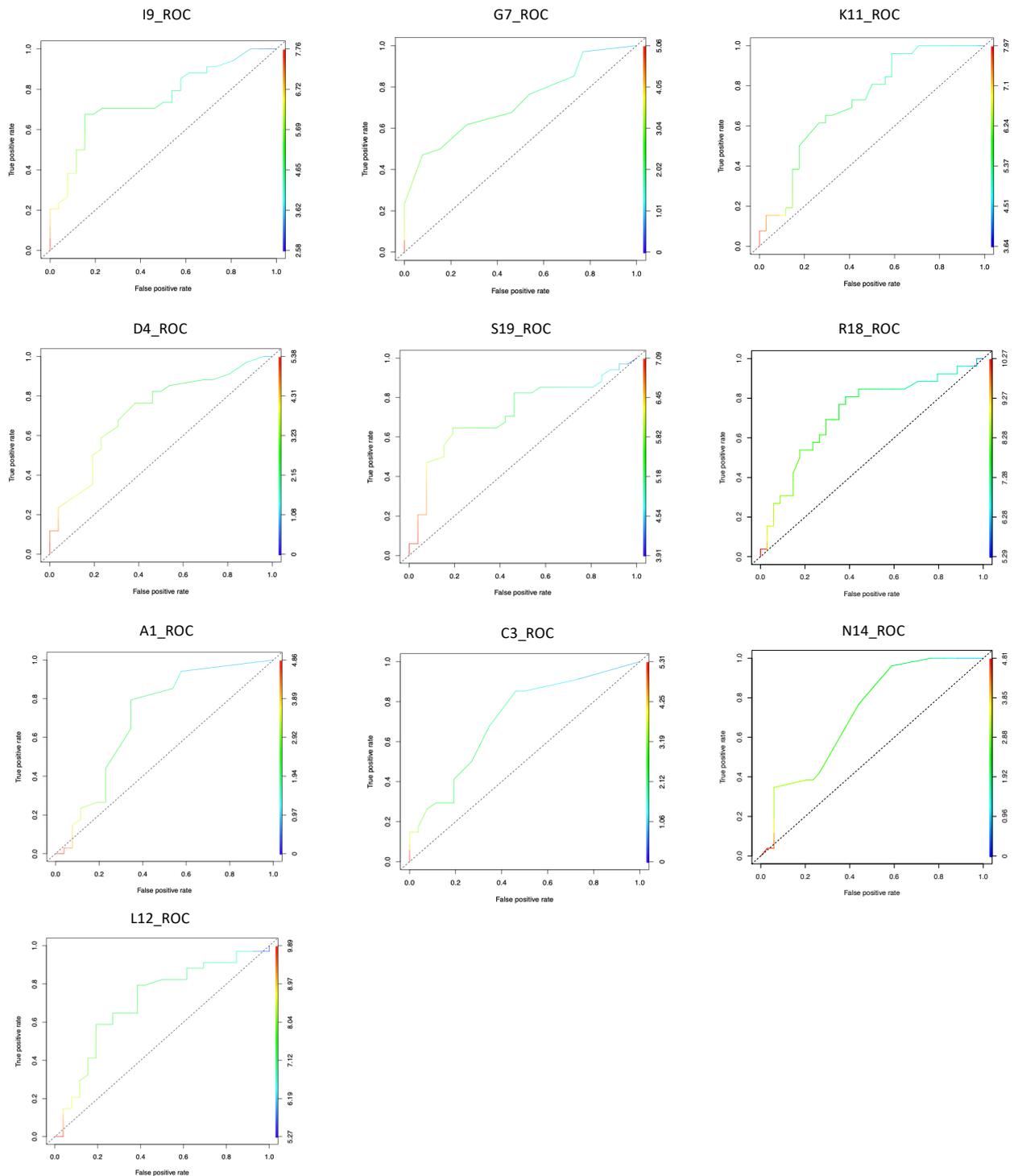


Figura 23 - Curvas ROC individuais. São 10 genes identificados no ponto de corte de 7 na AUC (*area under the curve*): I9; G7; K11; D4; S19; R18; A1; C3; N14; L12.

Aplicando o ponto de corte do AUC em 0,7 identificamos 10 genes acima deste AUC (I9; G7; K11; D4; S19; R18; A1; C3; N14; L12), sendo 7 no grupo dos respondedores e 3 no grupo de não respondedores (Figura 23).

A partir dos 10 genes acima identificados com $AUC \geq 0,7$, procedemos com a elaboração da curva ROC combinada (Figura 24). Para tanto, foi utilizada a regressão logística combinando os dados de expressão dos genes individualmente, com a finalidade de identificar uma associação de expressão que melhor classifica o grupo de pacientes que respondem ao tratamento (respondedores) com o sunitinibe. Para isso foi aplicado o método *backward* do pacote MASS (*Modern Applied Statistics with S*) em ambiente R *Studio*, para selecionar o melhor conjunto de genes para o modelo de regressão.

Após realização da regressão, obtivemos o resultado da expressão combinada de 3 genes que se mostraram capazes de melhor identificar o "grupo dos respondedores", conforme a associação do nível de expressão de cada um: gene R18 (baixa expressão); gene N14 (baixa expressão); gene C3 (alta expressão). A combinação da expressão destes genes apresentou uma sensibilidade de 88,2% e especificidade de 84,6%, para identificar o grupo dos respondedores, com um AUC de 0,896, levando em conta a combinação linear da expressão dos genes (Figura 24).

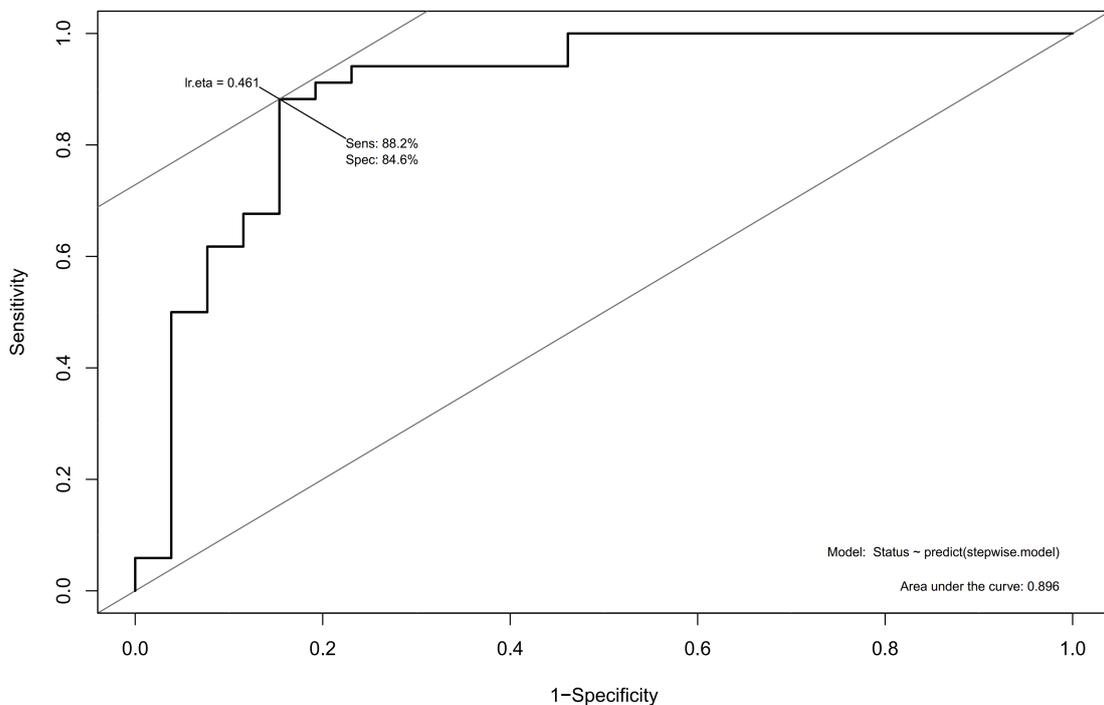


Figura 24 - Curva ROC combinada dos genes C3, N14 e R18 no grupo dos respondedores.

Sens: sensibilidade; *Spec*: especificidade.

5.6.4 Desfechos de sobrevida e perfil de expressão gênica diferencial

Considerando a mediana de expressão (em baixa expressão e alta expressão) dos 10 genes diferencialmente expressos, avaliamos a relação dos mesmos com os desfechos de sobrevida livre de progressão (SLP) e de sobrevida global (SG). A finalidade foi de explorar possíveis associações entre a expressão dos genes e os desfechos de sobrevida.

Desta forma, observamos desfechos significativos somente para os genes R18 e I9. A baixa expressão do gene R18 foi associada a uma SLP mediana de 19,0 meses (IC95% 14,2 - 40,9 meses) *versus* 10,4 meses (IC95% 6,4 - 23,4 meses; $p= 0,024$) quando comparado aos pacientes que apresentaram alta expressão do gene. Uma maior SLP também foi observada com a alta expressão do gene I9, com uma mediana de 23,5 meses (IC95% 13,6 - 42,1 meses) *versus* 9,5 meses (IC95% 7,5 - 16,1 meses; $p= 0,014$) quando comparado aqueles pacientes que apresentaram baixa expressão do gene (Figura 25).

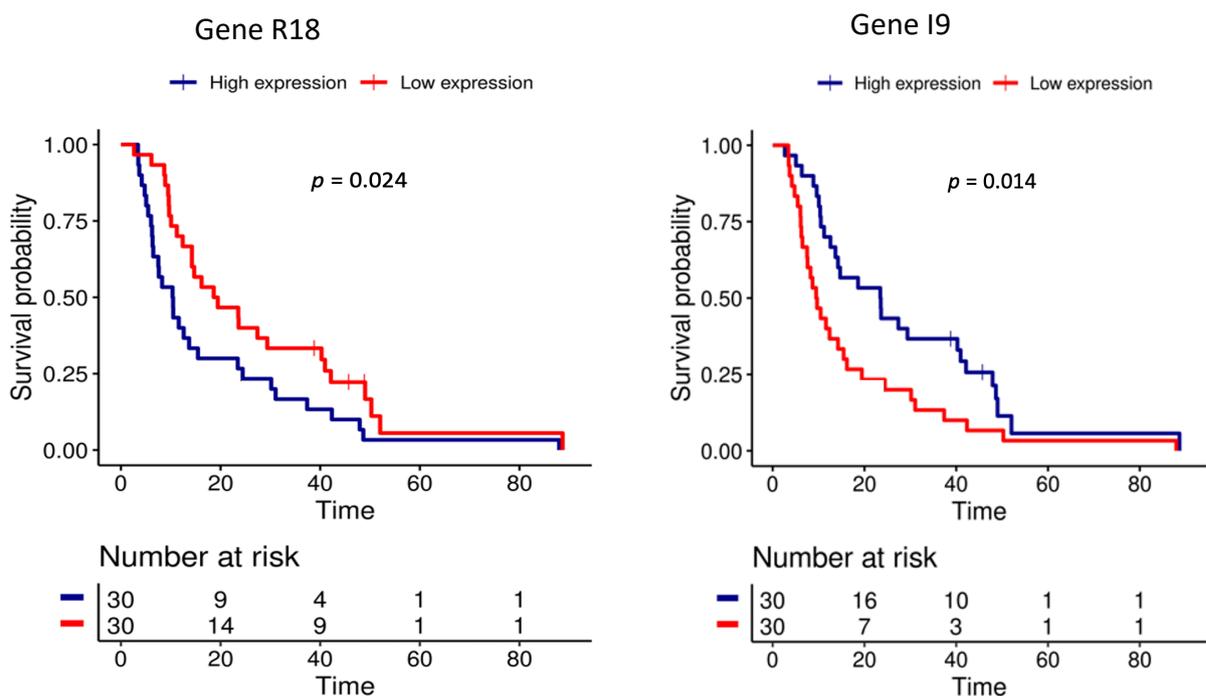


Figura 25 - Kaplan-Meier com dados de sobrevida livre de progressão (SLP) associado a expressão dos genes R18 e I9. Os pacientes que exibiram baixa expressão do gene R18 apresentaram uma maior sobrevida livre de progressão. Os pacientes que a exibiram alta expressão do gene I9 apresentaram uma maior SLP.

Time: tempo em meses

Em termos de sobrevida global (SG), observamos que a baixa expressão do gene R18 foi associado a uma melhor sobrevida global. A SG mediana foi de 45,5 meses (IC95% 34,3 - N/A) *versus* 21,1 meses (IC95% 13,2 - 43,7 meses; $p = 0,012$) quando comparado aqueles pacientes com a alta expressão do gene (Figura 26). Os outros genes analisados não apresentaram associação significativas com desfechos de sobrevida.

Gene R18

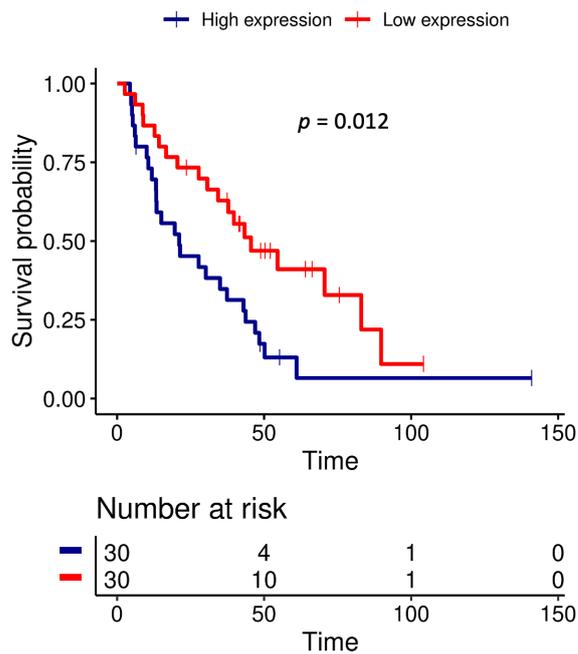


Figura 26 - Kaplan-Meier com dados de sobrevida global (SG) associado a expressão do gene R18. Os pacientes que exibiram baixa expressão do gene R18 apresentaram melhor sobrevida global, quando comparado aos pacientes que apresentaram alta expressão do gene.

Time: tempo em meses

5.6.5 Escore de expressão gênica e desfechos de sobrevida.

Como demonstrado anteriormente, identificamos que a combinação da expressão diferencial de 3 genes (C3, N14 e R18) foi capaz de identificar o grupo dos respondedores com uma sensibilidade de 88,2% e especificidade de 84,6% com um AUC de 0,896 (item 5.6.3). Também, verificamos que 1 dos genes de maneira isolada (R18) foi associado com melhor sobrevida livre de progressão (SLP) e de sobrevida global (SG) quando considerada sua baixa expressão (item 5.6.4).

Assim, com a finalidade de relacionar a combinação dos 3 genes (C3, N14 e R18) com desfechos de sobrevida, pressupomos a elaboração de um "Escore Prognóstico" (EP) e a construção das curvas de Kaplan-Meier com objetivo de estimar a relação da sobrevida livre de progressão (SLP) e da sobrevida global (SG), com a combinação dos referidos genes. Para isto, foi calculado um escore para cada paciente do estudo utilizando os dados de coeficiente linear da expressão dos 3 genes, através da seguinte equação de regressão logística, executada dentro do ambiente R: $\text{Escore} = 14.5089 - (1.6741 \times \text{a expressão do R18}) - (1.3452 \times \text{a expressão do N14}) + (1.0824 \times \text{a expressão do C3})$.

Após cálculo do escore para cada paciente, foi estabelecido um ponto de corte de 0,461. A finalidade foi separar os pacientes em dois grupos: aqueles com escore acima de 0,461 foram classificados como escore alto (*high score*) e aqueles abaixo de 0,461 foram classificados como escore baixo (*low score*).

Este ponto de corte foi definido através da melhor interseção estatística fornecida pela curva ROC da combinação dos genes associados a resposta, conforme figura 24 (item 5.6.3). Esta escolha, utilizando a melhor interseção da análise da curva ROC combinada, foi baseada na metodologia aplicada em estudo retrospectivo dos autores Rabinovitch-Chable *et al*¹⁰⁷.

Com a formação dos dois grupos de acordo ao escore calculado, foram realizadas curva de Kaplan-Meier para obter dados de sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida global (SG). A SLP mediana no grupo de pacientes com Escore Alto foi de 24,4 meses (IC95% 18,6 - 42,1) *versus* 8,2 meses (IC95% 6,2 - 14,2 meses; $p < 0,0001$) quando comparado aqueles pacientes com Escore Baixo (Figura 27). A SG mediana no Escore Alto foi de 48,3 meses (IC95% 35 - NR) *versus* 16,6 meses (IC95% 10,6 - 42,9 meses; $p = 0,0015$) quando comparado aqueles pacientes com Escore Baixo (Figura 28).

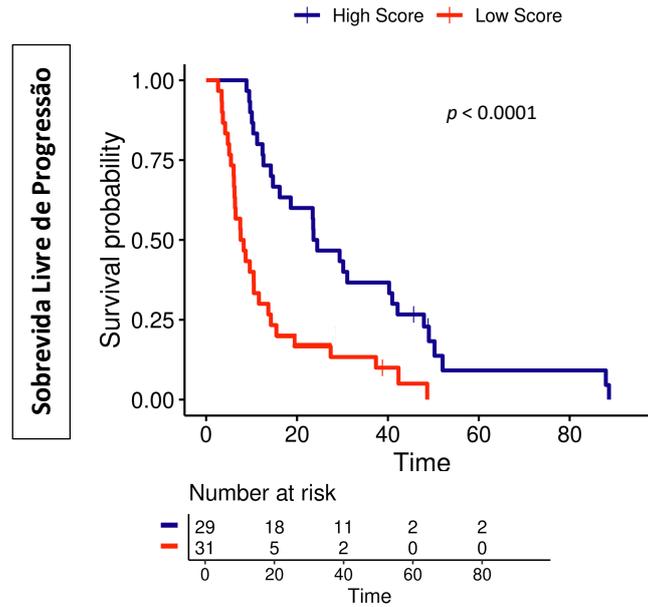


Figura 27 - Kaplan-Meier com a diferença em sobrevida livre de progressão (SLP) associada ao *score* obtido da expressão combinada dos genes C3, N14 e R18. Os pacientes com *score* alto apresentaram melhor SLP quando comparado aos pacientes que apresentaram baixo *score*.

Time: tempo em meses

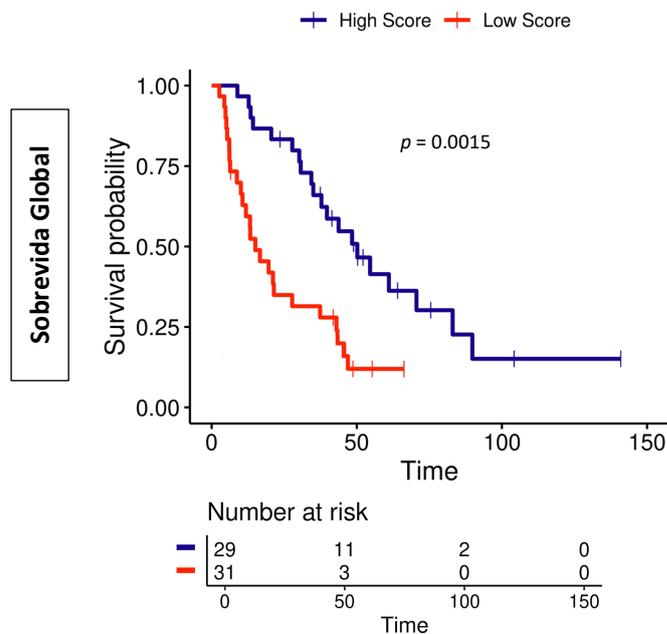


Figura 28: Kaplan-Meier com a diferença em sobrevida global (SG) associada ao *score* obtido da expressão combinada dos genes C3, N14 e R18. Os pacientes com *score* alto apresentaram melhor sobrevida global comparado aos pacientes que apresentaram baixo *score*.

Time: tempo em meses

6 DISCUSSÃO

Com a finalidade de encontrar um perfil de expressão gênica com potencial papel como biomarcador de resposta ao tratamento com sunitinibe no carcinoma de células renais metastáticos, realizamos a avaliação da expressão gênica de um painel de 770 genes associadas a vias de progressão tumoral pela tecnologia de NanoString em material tumoral parafinado de uma coorte de 60 pacientes rigorosamente selecionados seguindo os critérios de inclusão do estudo e cujos dados de resposta radiológica ao tratamento foram definidos de maneira criteriosa através do RECIST 1.1.

O carcinoma de células renais apresenta um comportamento clínico variável entre os pacientes no cenário metastático¹⁰⁸. Mesmo com várias opções de tratamentos no cenário da doença avançada, a escolha da melhor terapêutica permanece desafiadora, e atualmente baseada em dados clínicos⁹⁴. Existem métodos que estratificam o risco clínico para auxiliar na escolha do tratamento sistêmico, como o nomograma de HENG. Entretanto, devido a alta variabilidade entre pacientes dentro destes subgrupos baseados em achados clínicos, pacientes classificados em um subgrupo podem responder de maneira divergente ao tratamento sistêmico⁸⁰. Sabemos que a variabilidade nos desfechos clínicos reflete em grande parte a heterogeneidade biológica do tumor⁷⁴.

O sunitinibe é um inibidor de tirosina quinase amplamente utilizado na primeira linha dos pacientes metastáticos, porém sem nenhum marcador molecular para guiar sua indicação^{78,109}. Apesar de novos tratamentos alvo-direcionados e imunológicos terem surgido nos últimos anos para o CCR metastático, a seleção e a melhor sequência destes tratamentos continua sendo um cenário desafiador⁹⁴.

A taxa de resposta objetiva encontrada foi de 30%, compatível com estudo pivotal que avaliou o sunitinibe em primeira linha nos pacientes com CCR metastáticos⁵². Calculamos a sobrevida livre de progressão e sobrevida global dos pacientes do estudo. Com a ocorrência de 95% dos eventos, a mSLP na amostra do estudo foi de 13 meses (IC95% 9,7 - 17,5 meses), similar aos 11 meses alcançados pelos pacientes na atualização do estudo pivotal de Motzer *et al*⁶⁰. A SG foi calculada com uma maturidade de 80% dos desfechos. Os pacientes do estudo alcançaram uma mSG de 34 meses (IC95% 21,4 - 46,5 meses). Este resultado é acima do esperado quando comparamos com dados de estudos pivotais (mSG de 26,4 meses [IC95% 23 - 32,9 meses])⁶⁰. Porém, quando comparamos com a literatura mais recente, observamos que

o sunitinibe quando utilizado em braço comparador, alcançou uma mSG de 35,7 meses (IC95% 33,3 - *not reached*), similar à observada no estudo¹¹⁰. O melhor cuidado com os pacientes oncológicos, a evolução das diferentes modalidades de tratamento, o *cross-over* em estudos com imunoterapia isolada ou em associação com novos TKIs, bem como o acesso a outras linhas de tratamentos em pesquisa clínica, são aspectos que podem explicar a mSG alcançada neste estudo e também nos seguimentos dos estudos atuais¹¹¹.

As características epidemiológicas e clínico-patológica dos pacientes foram descritas, e comparadas com dados de sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida global (SG). Em análise univariada, a mediana de SLP foi significativamente maior nos pacientes que responderam ao tratamento (27,4 *versus* 7,5 meses) comparado aos não-respondedores ($p \leq 0.0001$). Comparando os grupos de risco conforme o IMDC, aqueles com risco favorável apresentaram uma melhor mSLP quando comparado aos pacientes com risco intermediário e risco alto, respectivamente, 23,4 *versus* 13,6 *versus* 3,6 meses ($p \leq 0,0001$). Os pacientes com baixo grau de *Furhman* alcançaram um ganho em SLP, com mediana de 18,6 meses comparado a 9,4 meses nos pacientes com alto grau de *Furhman* ($p = 0,037$). Na análise do índice de massa corpórea (IMC), os pacientes com $IMC \geq 25$ apresentaram uma mediana de SLP de 19,4 meses, enquanto aqueles pacientes com $IMC < 25$ apresentaram 10,3 meses de mSLP, mostrando um ganho de 9,1 meses em favor dos pacientes com $IMC \geq 25$ ($p = 0,049$). A SG também mostrou diferença estatística entre os grupos estratificados que compõem as variáveis de resposta ao tratamento, grupo de risco IMDC, grau de *Furhman* e IMC. Destacamos que com relação ao grupo de Risco IMDC, a mSG dos subgrupos de risco favorável, intermediário e risco alto foram respectivamente 43,7 meses, 35 meses e 5,3 meses ($p = 0,016$), mostrando similaridade com a literatura comparado aos dados de validação externa do modelo IMDC³⁹. Um dado que chamou a atenção foi a diferença significativa na mSG (43,7 *versus* 15 meses; $p = 0,016$) em favor dos pacientes com $IMC \geq 25$. Sabe-se que o sobrepeso e a obesidade está entre os fatores de risco de ocorrência de carcinoma renal¹¹², porém, curiosamente, os pacientes do estudo que estavam acima do peso tiveram um melhor desfecho de SG comparado aqueles com peso normal pelo IMC. Este aparente paradoxo pode ser explicado, em parte, pelo fato de que o tumor de pacientes obesos mostra uma maior expressão de genes relacionados à angiogênese, bem como mostra um maior infiltrado inflamatório no tecido adiposo peritumoral quando comparado aos pacientes com peso

normal¹¹³. Estes aspectos relacionados ao microambiente tumoral, podem contribuir para um aparente ganho em SG observado nos pacientes obesos com CCR¹¹³.

A análise do perfil genético no presente estudo foi conclusiva em 91% dos casos (60 das 66 amostras com RNA extraído), corroborando a robustez da tecnologia *nCounter* para a análise de expressão de mRNA em material parafinado. Dos 60 casos avaliados, observamos que a expressão diferencial de 31 genes foi capaz de diferenciar os dois grupos de resposta, classificando os pacientes em respondedores e não-respondedores, em termos de taxa de resposta definidos pelo RECIST 1.1. Avaliamos a seguir, a dimensão do impacto de cada gene encontrado com o objetivo de melhor caracterizar a associação entre expressão genica e taxa de resposta. Para isso, elaboramos curvas ROC individuais que mostraram dez genes (I9, G7, K11, D4, S19, R18, A1, C3, N14 e L12) que de maneira significativa foram capazes de diferenciar os grupos de resposta considerando um AUC > 0,7. Para mais, exploramos a combinação destes genes na busca de um melhor ponto de corte em sensibilidade e especificidade, na identificação dos grupos. Assim, foi construída uma curva ROC combinada dos dez genes com AUC > 0,7. Constatamos que a combinação da expressão de três genes (R18, N14 e C3) contribuíram de maneira significativa em melhor identificar o grupo dos respondedores (sensibilidade: 88,2%; especificidade: 84,6%; AUC: 0,896).

Em termos de sobrevida, individualmente, os genes R18 e I9 foram associados com melhor sobrevida, de acordo ao nível de expressão dos genes nos pacientes. Com respeito a SLP, a baixa expressão do gene R18 apresentou uma mSLP de 19,0 meses (IC95% 14,2 - 40,9 meses) quando comparada com 10,4 meses (IC95% 6,4 - 23,4 meses; $p= 0,024$) nos pacientes que apresentaram alta expressão do gene. Os pacientes que apresentaram alta expressão do gene I9, alcançaram uma mSLP de 23,5 meses (IC95% 13,6 - 42,1 meses) *versus* 9,5 meses (IC95% 7,5 - 16,1 meses; $p= 0,014$) naqueles pacientes que apresentaram baixa expressão do gene. Com respeito a SG, aqueles pacientes que tiveram baixa expressão do gene R1 alcançaram uma mSG foi de 45,5 meses (IC95% 34,3 - N/A) comparada a 21,1 meses (IC95% 13,2 - 43,7 meses; $p = 0,012$) naqueles pacientes com a alta expressão do gene. O gene I9 não apresentou associação com desfechos de SG.

Os genes encontrados que se associaram a taxa de resposta e sobrevida, estão envolvidos nas principais vias de desenvolvimento dos carcinomas, em especial neoplasias renais. O gene R18 está associado a regulação da via de adesão celular mediada por integrina nos CCR, e alteração de sua expressão pode interferir no equilíbrio da matriz extracelular,

favorecendo a comunicação celular no tecido tumoral¹¹⁴. Neste trabalho, a baixa expressão (considerando sua expressão média) do gene R18 foi associada a uma melhor sobrevida livre de progressão ($p= 0,024$) e uma melhor sobrevida global ($p= 0,012$) dos pacientes, quando comparado a sua alta expressão. O gene N14 é classificado como gene relacionado a fatores endodérmicos¹¹⁵, e tem um papel principalmente associado a via de angiogênese. Em nosso estudo, os pacientes classificados como respondedores, apresentaram uma baixa expressão do gene N14. O gene C3 também está relacionado a mecanismos associados a angiogênese, adesão da matriz extracelular e comunicação celular¹¹⁶. Em nosso estudo, observamos que os pacientes respondedores, apresentavam alta expressão do gene. O Gene I9, associado a fatores de adesão da matriz extracelular, está "*downregulated*" no carcinoma renal de células claras. No presente trabalho, os pacientes que apresentaram baixa expressão do gene I9 tiveram pior sobrevida livre de progressão, comparado aos pacientes que tinham o gene I9 com alta expressão ($p= 0,014$), porém, sem associação estatisticamente significativa com relação ao desfecho de sobrevida global.

Existem vários estudos que descrevem painéis gênicos para pacientes com carcinomas de células renais. O mais recente, o *ClearCode34*, foi desenvolvido inicialmente a partir de genes relacionados a recidiva de doença localizada⁷⁵. Quando avaliado no cenário metastático não mostrou ser um painel preditivo de resposta ao tratamento nestes pacientes⁷⁹. O painel adotado neste trabalho, "*nCounter PanCancer Progression Panel*", engloba genes relacionados às principais vias associadas a doença metastática. Por outro lado, a avaliação molecular através da metodologia "*nanosttring*" proposta no estudo, tem a vantagem de trabalhar com amostras conservadas em parafina, mesmo aquelas com certo grau de desgaste, sendo portanto, uma ferramenta especialmente útil para medir os níveis de expressão gênica de amostras clínicas degradadas, nas quais os ácidos nucleicos extraídos não são facilmente amplificados por outros métodos, como por exemplo com a PCR⁹⁹. Ressaltamos que os principais genes I9, C3, N14 e R18 associados com resposta ao tratamento e desfechos de sobrevida, identificados neste estudo, não estão contemplados no painel *ClearCode34*⁷⁸. Cabe destacar também que o *ClearCode34*, desenvolvido com base em pacientes com doença localizada, realizou a medida da expressão gênica em coorte de validação utilizando-se da mesma tecnologia *nanosttring*⁷⁹.

Avaliamos também, a elaboração de um escore prognóstico (EP) com a combinação daqueles genes relacionados a resposta ao sunitinibe: R18, N14 e C3. Baseados no ponto de

corde 0,461, classificamos os pacientes como tendo um escore alto (*high score*) se tivesse acima do ponto de corte, e como escore baixo (*low score*), se estivessem abaixo do ponto de corte. Os pacientes classificados com EP alto (*high score*) tiveram uma maior sobrevida livre de progressão (24,4 meses (IC95% 18,6 - 42,1) *versus* 8,2 meses (IC95% 6,2 - 14,2 meses; $p < 0,0001$) e bem como de uma maior sobrevida global 48,3 meses (IC95% 35 - NR) *versus* 16,6 meses (IC95% 10,6 - 42,9 meses; $p = 0,0015$) quando comparado aos pacientes com um EP baixo (*low score*).

O presente trabalho apresenta algumas limitações. O desenho retrospectivo pode estar sujeito a vieses inerentes ao método do estudo, ademais, limita a conclusão dos achados à geração de hipóteses que precisam ser mais bem exploradas em estudos de desenho prospectivo, por exemplo. A elevada mediana de SG poderia ser mais bem explorada para ajudar explicar tal achado. Apesar de não pré-planejada, pensamos em avaliar as linhas subsequentes dos pacientes, porém devido ao cenário atual, com respeito a pandemia de COVID19, houve restrições ao trânsito na região, bem como acesso a algumas dependências do hospital, o que dificultou a finalização de novo levantamento dos prontuários. Outra importante limitação é o tamanho amostral relativamente pequeno. Apesar de incluirmos todos os pacientes disponíveis de acordo os critérios de elegibilidade do estudo, é difícil verificar a dimensão do efeito encontrado quando estratificamos a amostra do estudo. Estas limitações exigem a necessidade de validar os achados encontrados em uma amostragem maior, idealmente em pacientes oriundos de outras instituições, a fim de avaliar o papel desta assinatura gênica, em pacientes sujeitos a outras variáveis, e com processamento de material biológico distinto, para assim assegurar o seu potencial papel como biomarcador.

Em suma, os resultados desenvolvidos na presente dissertação, identificaram um novo perfil gênico que potencialmente poderá auxiliar na seleção do tratamento de pacientes com carcinoma de células renais, definindo aqueles que melhor responderão ao sunitinibe. Futuramente, esta assinatura gênica poderá também ser adicionada a uma calculadora, onde o escore de risco identificado, juntamente a variáveis clínicas e laboratoriais, pode aprimorar o correto manejo destes pacientes.

7 CONCLUSÕES

No presente trabalho, descrevemos as características epidemiológicas e clínico-patológica de uma série de 60 pacientes com câncer de rim metastático, tratados em primeira linha com sunitinibe no Hospital de Câncer de Barretos. Em análise univariada, encontramos correlações entre a taxa de resposta, os grupos de risco pelo IMDC, grau de *Furhman* e o IMC, com os desfechos de sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida global (SG). Em análise multivariada, somente a taxa de resposta foi associada a SLP e SG.

Através de plataforma *nanostring* estudamos um painel de 770 genes associado à progressão tumoral, em tecido tumoral parafinado, onde identificamos 31 genes diferencialmente expressos, capazes de reconhecer os pacientes que responderam ao sunitinibe. Destes genes, a associação do R18, N14 e C3 mostrou alta sensibilidade e especificidade na identificação daqueles pacientes que responderam ao sunitinibe em primeira linha na amostra do estudo.

A associação dos genes R18, N14 e C3 combinada em um escore, mostrou que aqueles pacientes classificados com escore alto tiveram uma maior sobrevida livre de progressão e sobrevida global com significância estatística, quando comparados aos pacientes que apresentavam escore baixo.

No futuro, uma vez validados, estes marcadores poderiam se tornar ferramentas gênicas preditivas e prognósticas, auxiliando na escolha do tratamento sistêmico dos pacientes com carcinoma renal de células claras metastático.

REFERÊNCIAS

1. Cho E, Adami HO, Lindblad P. *Epidemiology of renal cell cancer*. **Hematol Oncol Clin North Am**. 2011;25(4):651-65.
2. 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*. **Eur Urol**. 2016;70(1):93-105.
3. Karumanchi SA, Merchan J, Sukhatme VP. *Renal cancer: molecular mechanisms and newer therapeutic options*. **Curr Opin Nephrol Hypertens**. 2002;11(1):37-42.
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. 2018;68(6):394-424.
5. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics, 2020*. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. 2020;70(1):7-30.
6. Vigilância CdPe. *Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva*. **INCA**. 2017:128.
7. Vigilância CdPe. *Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva*. **INCA**. 2019:122.
8. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. *Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths*. **CA Cancer J Clin**. 2011;61(4):212-36.
9. Siemer S, Hack M, Lehmann J, Becker F, Stockle M. *Outcome of renal tumors in young adults*. **J Urol**. 2006;175(4):1240-3; discussion 3-4.
10. Thompson RH, Ordonez MA, Iasonos A, Secin FP, Guillonneau B, Russo P, et al. *Renal cell carcinoma in young and old patients--is there a difference?* **J Urol**. 2008;180(4):1262-6; discussion 6.
11. Lipworth L, Tarone RE, McLaughlin JK. *The epidemiology of renal cell carcinoma*. **J Urol**. 2006;176(6 Pt 1):2353-8.
12. PubMed. 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 epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**. 2009;18(3):801-7.
13. SEER. *SEER Stat Fact Sheets: Kidney and Renal Pelvis 2011*.

14. PubMed. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, et al. *Renal cell carcinoma*. **Nature reviews Disease primers**. 2017;3:17009-.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. PubMed. 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*. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**. 2008;14(15):4726-34.
20. Sakashita N, Takeya M, Kishida T, Stackhouse TM, Zbar B, Takahashi KJTHJ. *Expression of von Hippel-Lindau Protein in Normal and Pathological Human Tissues*. **The Histochemical Journal**. 1999;31(2):133-44.
21. Shuch B, Amin A, Armstrong AJ, Eble JN, Ficarra V, Lopez-Beltran A, et al. *Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity*. **Eur Urol**. 2015;67(1):85-97.
22. Ohh M, Kaelin WG, Jr. *The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: new perspectives*. **Mol Med Today**. 1999;5(6):257-63.
23. 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.
24. 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.
25. 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.

26. PubMed. Rosner I, Bratslavsky G, Pinto PA, Linehan WM. *The clinical implications of the genetics of renal cell carcinoma*. **Urologic oncology**. 2009;27(2):131-6.
27. Prasad SR, Humphrey PA, Catena JR, Narra VR, Srigley JR, Cortez AD, et al. *Common and Uncommon Histologic Subtypes of Renal Cell Carcinoma: Imaging Spectrum with Pathologic Correlation*. **RadioGraphics**. 2006;26(6):1795-806.
28. Muglia VF, Prando A. *Renal cell carcinoma: Histological classification and correlation with imaging findings*. **Radiologia brasileira**. 2015;48:166-74.
29. 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.
30. Comp erat E, Camparo P. *Histological classification of malignant renal tumours at a time of major diagnostic and therapeutic changes*. **Diagnostic and Interventional Imaging**. 2012;93(4):221-31.
31. Srigley JR, Delahunt B. *Uncommon and recently described renal carcinomas*. **Mod Pathol**. 2009;22 Suppl 2:S2-s23.
32. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershewald JE, Brookland RK, et al. *The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging*. 2017;67(2):93-9.
33. 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.
34. Eichelberg C, Junker K, Ljungberg B, Moch H. *Diagnostic and Prognostic Molecular Markers for Renal Cell Carcinoma: A Critical Appraisal of the Current State of Research and Clinical Applicability*. **European Urology**. 2009;55(4):851-63.
35. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. *Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma*. **Am J Surg Pathol**. 1982;6(7):655-63.
36. 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.
37. Mikami S, Kuroda N, Nagashima Y. *Pathology of Renal Cell Carcinoma*. In: Oya M, editor. *Renal Cell Carcinoma: Molecular Features and Treatment Updates*. Tokyo: Springer Japan; 2017. p. 105-37.
38. 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.

39. 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.
40. 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.
41. Zurita AJ, Gagnon RC, Liu Y, Tran HT, Figlin RA, Hutson TE, et al. *Integrating cytokines and angiogenic factors and tumour bulk with selected clinical criteria improves determination of prognosis in advanced renal cell carcinoma.* **Br J Cancer.** 2017;117(4):478-84.
42. Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, Rowan AJ, Salm MP, Varela I, et al. *Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing.* **Nature Genetics.** 2014;46:225.
43. Okita K, Hatakeyama S, Tanaka T, Ikehata Y, Tanaka T, Fujita N, et al. *Impact of Disagreement Between Two Risk Group Models on Prognosis in Patients With Metastatic Renal-Cell Carcinoma.* **Clinical Genitourinary Cancer.** 2019;17(3):e440-e6.
44. Jiang G, Chen S, Chen M. *Exploration of IMDC model in patients with metastatic renal cell carcinoma using targeted agents: a meta-analysis.* **Int Braz J Urol.** 2019;45.
45. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Rioux-Leclercq N, Bex A, Khoo V, et al. *Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†.* **Annals of Oncology.** 2019;30(5):706-20.
46. Ljungberg B, Albiges L, Abu-Ghanem Y, Bensalah K, Dabestani S, Fernández-Pello S, et al. *European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2019 Update.* **European Urology.** 2019;75(5):799-810.
47. Network NCC. *Kidney Cancer v 2.2020.* **NCCN.** 2020.
48. 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.
49. Calvo E, Porta C, Grunwald V, Escudier B. *The Current and Evolving Landscape of First-Line Treatments for Advanced Renal Cell Carcinoma.* **Oncologist.** 2019;24(3):338-48.
50. McDermott DF, Regan MM, Clark JI, Flaherty LE, Weiss GR, Logan TF, et al. *Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma.* **J Clin Oncol.** 2005;23(1):133-41.

51. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. **Cell**. 2011;144(5):646-74.
52. 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.
53. Singer EA, Gupta GN, Marchalik D, Srinivasan R. *Evolving therapeutic targets in renal cell carcinoma*. **Curr Opin Oncol**. 2013;25(3):273-80.
54. Choueiri TK, Motzer RJ. *Systemic Therapy for Metastatic Renal-Cell Carcinoma*. **New England Journal of Medicine**. 2017;376(4):354-66.
55. Motzer RJ, Escudier B, Tomczak P, Hutson TE, Michaelson MD, Negrier S, et al. *Axitinib versus sorafenib as second-line treatment for advanced renal cell carcinoma: overall survival analysis and updated results from a randomised phase 3 trial*. **Lancet Oncol**. 2013;14(6):552-62.
56. Gupta K, Miller JD, Li JZ, Russell MW, Charbonneau C. *Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): A literature review*. **Cancer Treatment Reviews**. 2008;34(3):193-205.
57. PubMed. 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)*. **Therapeutics and clinical risk management**. 2007;3(2):341-8.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. *The protein tyrosine kinase family of the human genome*. **Oncogene**. 2000;19(49):5548-57.
62. Schlessinger J. *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. **Cell**. 2000;103(2):211-25.
63. Schutz FAB. *CÂNCER DE RIM - Carcinoma de células renais (CCR)*. **Soc Bras Oncol Clin (SBOC)**. 2020;1:19.

64. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, et al. *Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma*. **New England Journal of Medicine**. 2018;378(14):1277-90.
65. Motzer RJ, Penkov K, Haanen J, Rini B, Albiges L, Campbell MT, et al. *Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma*. **New England Journal of Medicine**. 2019;380(12):1103-15.
66. Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, et al. *Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma*. **New England Journal of Medicine**. 2019;380(12):1116-27.
67. PubMed. Goossens N, Nakagawa S, Sun X, Hoshida Y. *Cancer biomarker discovery and validation*. **Translational cancer research**. 2015;4(3):256-69.
68. Lassere MN. *The Biomarker-Surrogacy Evaluation Schema: a review of the biomarker-surrogate literature and a proposal for a criterion-based, quantitative, multidimensional hierarchical levels of evidence schema for evaluating the status of biomarkers as surrogate endpoints*. **Stat Methods Med Res**. 2008;17(3):303-40.
69. Committee on the Review of Omics-Based Tests for Predicting Patient Outcomes in Clinical T, Board on Health Care S, Board on Health Sciences P, Institute of M. *Evolution of Translational Omics: Lessons Learned and the Path Forward*. In: Micheel CM, Nass SJ, Omenn GS, editors. *Evolution of Translational Omics: Lessons Learned and the Path Forward*. **Washington (DC): National Academies Press (US)** Copyright 2012 by the National Academy of Sciences. All rights reserved.; 2012.
70. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. **N Engl J Med**. 2001;344(11):783-92.
71. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin TR, Lavin P, Lidgard GP, et al. *Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening*. **N Engl J Med**. 2014;370(14):1287-97.
72. Garcia-Donas J, Rodriguez-Antona C, Jonasch E. *Molecular Markers to Predict Response to Therapy*. **Seminars in Oncology**. 2013;40(4):444-58.
73. Takagi T, Fukuda H, Kondo T, Ishihara H, Yoshida K, Kobayashi H, et al. *Prognostic Markers for Refined Stratification of IMDC Intermediate-Risk Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma Treated with First-Line Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy*. **Targeted Oncology**. 2019;14(2):179-86.
74. Nogueira M, Kim HL. *Molecular markers for predicting prognosis of renal cell carcinoma*. **Urol Oncol**. 2008;26(2):113-24.

75. Takahashi M, Rhodes DR, Furge KA, Kanayama H, Kagawa S, Haab BB, et al. *Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2001;98(17):9754-9.
76. Brannon AR, Reddy A, Seiler M, Arreola A, Moore DT, Pruthi RS, et al. *Molecular Stratification of Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Consensus Clustering Reveals Distinct Subtypes and Survival Patterns*. **Genes Cancer**. 2010;1(2):152-63.
77. Brannon AR, Haake SM, Hacker KE, Pruthi RS, Wallen EM, Nielsen ME, et al. *Meta-analysis of clear cell renal cell carcinoma gene expression defines a variant subgroup and identifies gender influences on tumor biology*. **Eur Urol**. 2012;61(2):258-68.
78. Brooks SA, Brannon AR, Parker JS, Fisher JC, Sen O, Kattan MW, et al. *ClearCode34: A prognostic risk predictor for localized clear cell renal cell carcinoma*. **Eur Urol**. 2014;66(1):77-84.
79. Ghatalia P, Rathmell WK. *Systematic Review: ClearCode 34 - A Validated Prognostic Signature in Clear Cell Renal Cell Carcinoma (ccRCC)*. **Kidney Cancer**. 2018;2(1):23-9.
80. de Velasco G, Culhane AC, Fay AP, Hakimi AA, Voss MH, Tannir NM, et al. *Molecular Subtypes Improve Prognostic Value of International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium Prognostic Model*. **Oncologist**. 2017;22(3):286-92.
81. Apanovich N, Peters M, Apanovich P, Mansorunov D, Markova A, Matveev V, et al. *The Genes—Candidates for Prognostic Markers of Metastasis by Expression Level in Clear Cell Renal Cell Cancer*. **Diagnostics**. 2020;10(1):30.
82. PubMed. Henrique R, Luís AS, Jerónimo C. *The epigenetics of renal cell tumors: from biology to biomarkers*. **Frontiers in genetics**. 2012;3:94-.
83. Zhang C, Wang F, Guo F, Ye C, Yang Y, Huang Y, et al. *A 13-gene risk score system and a nomogram survival model for predicting the prognosis of clear cell renal cell carcinoma*. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. 2020;38(3):74.e1-.e11.
84. Zhang C, Huang D, Liu A, Xu Y, Na R, Xu D. *Genome-wide screening and cohorts validation identifying novel lncRNAs as prognostic biomarkers for clear cell renal cell carcinoma*. **Journal of Cellular Biochemistry**. 2020;121(3):2559-70.
85. Nam H-Y, Chandrashekar DS, Kundu A, Shelar S, Kho E-Y, Sonpavde G, et al. *Integrative Epigenetic and Gene Expression Analysis of Renal Tumor Progression to Metastasis*. **Molecular Cancer Research**. 2019;17(1):84.
86. Palomero L, Bodnar L, Mateo F, Herranz-Ors C, Espín R, García-Varelo M, et al. *EV11 as a Prognostic and Predictive Biomarker of Clear Cell Renal Cell Carcinoma*. **Cancers**. 2020;12(2):300.

87. Hwang HS, Park Y-Y, Shin S-J, Go H, Park J-M, Yoon SY, et al. *Involvement of the TNF- α Pathway in TKI Resistance and Suggestion of TNFR1 as a Predictive Biomarker for TKI Responsiveness in Clear Cell Renal Cell Carcinoma.* **J Korean Med Sci.** 2020;35(5).
88. Tamura K, Matsushita Y, Watanabe H, Motoyama D, Ito T, Sugiyama T, et al. *Feasibility of the ACL (albumin, C-reactive protein and lactate dehydrogenase) model as a novel prognostic tool in patients with metastatic renal cell carcinoma previously receiving first-line targeted therapy.* **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.** 2020;38(1):6.e9-6.e16.
89. Zucca LE, Morini Matushita MA, da Silva Oliveira RJ, Scapulatempo-Neto C, de Lima MA, Ribeiro GG, et al. *Expression of tyrosine kinase receptor AXL is associated with worse outcome of metastatic renal cell carcinomas treated with sunitinib.* **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.** 2018;36(1):11.e3-.e21.
90. Dzik C, Reis ST, Viana NI, Brito G, Paloppi I, Nahas W, et al. *Gene expression profile of renal cell carcinomas after neoadjuvant treatment with sunitinib: new pathways revealed.* **Int J Biol Markers.** 2017;32(2):e210-e7.
91. Garrigós C, Molina-Pinelo S, Meléndez R, Espinosa M, Lerma A, Taron M, et al. *MicroRNAs as potential predictors of extreme response to tyrosine kinase inhibitors in renal cell cancer.* **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.** 2020.
92. Adashek JJ, Salgia MM, Posadas EM, Figlin RA, Gong J. *Role of Biomarkers in Prediction of Response to Therapeutics in Metastatic Renal-Cell Carcinoma.* **Clinical Genitourinary Cancer.** 2019;17(3):e454-e60.
93. Choueiri TK, Plimack E, Arkenau HT, Jonasch E, Heng DYC, Powles T, et al. *Biomarker-Based Phase II Trial of Savolitinib in Patients With Advanced Papillary Renal Cell Cancer.* **J Clin Oncol.** 2017;35(26):2993-3001.
94. Dudani S, Savard M-F, Heng DYC. *An Update on Predictive Biomarkers in Metastatic Renal Cell Carcinoma.* **European Urology Focus.** 2020;6(1):34-6.
95. Chan JY, Choudhury Y, Tan MH. *Predictive molecular biomarkers to guide clinical decision making in kidney cancer: current progress and future challenges.* **Expert Rev Mol Diagn.** 2015;15(5):631-46.
96. Agarwal N, Nussenzweig R, Pal SK. *Biomarkers in renal-cell carcinoma: building on clinical paradigms.* **Lancet Oncol.** 2018;19(12):1560-1.
97. Almeida DVPS, F. *Nova opção de tratamento de primeira linha é aprovada para o carcinoma de células renais nos EUA.* **Manual de Oncologia Clínica do Brasil - On line.** 2019.
98. Schwartz LH, Litière S, de Vries E, Ford R, Gwyther S, Mandrekar S, et al. *RECIST 1.1-Update and clarification: From the RECIST committee.* **Eur J Cancer.** 2016;62:132-7.

99. Tsang HF, Xue VW, Koh SP, Chiu YM, Ng LP, Wong SC. *NanoString, a novel digital color-coded barcode technology: current and future applications in molecular diagnostics*. **Expert Rev Mol Diagn**. 2017;17(1):95-103.
100. Warren S. *Simultaneous, Multiplexed Detection of RNA and Protein on the NanoString((R)) nCounter((R)) Platform*. **Methods Mol Biol**. 2018;1783:105-20.
101. Veldman-Jones MH, Brant R, Rooney C, Geh C, Emery H, Harbron CG, et al. *Evaluating Robustness and Sensitivity of the NanoString Technologies nCounter Platform to Enable Multiplexed Gene Expression Analysis of Clinical Samples*. **Cancer Res**. 2015;75(13):2587-93.
102. Waggott D, Chu K, Yin S, Wouters BG, Liu FF, Boutros PC. *NanoStringNorm: an extensible R package for the pre-processing of NanoString mRNA and miRNA data*. **Bioinformatics**. 2012;28(11):1546-8.
103. Afgan E, Baker D, van den Beek M, Blankenberg D, Bouvier D, Cech M, et al. *The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update*. **Nucleic Acids Res**. 2016;44(W1):W3-w10.
104. PubMed. Evans C, Hardin J, Stoebel DM. *Selecting between-sample RNA-Seq normalization methods from the perspective of their assumptions*. **Briefings in bioinformatics**. 2018;19(5):776-92.
105. Eusebi P. *Diagnostic Accuracy Measures*. **Cerebrovascular Diseases**. 2013;36(4):267-72.
106. Mandrekar JN. *Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment*. **J Thorac Oncol**. 2010;5(9):1315-6.
107. Rabinovitch-Chable H, Durand K, Genet D, Marin B, Dzugan H, Léobon S, et al. *Logistic regression model of the clinical response to 5-fluorouracil based chemotherapy for metastatic colorectal cancer patients*. **Anticancer Res**. 2006;26(5b):3885-92.
108. Voss MH, Reising A, Cheng Y, Patel P, Marker M, Kuo F, et al. *Genomically annotated risk model for advanced renal-cell carcinoma: a retrospective cohort study*. **Lancet Oncol**. 2018.
109. Beuselinck B, Job S, Becht E, Karadimou A, Verkarre V, Couchy G, et al. *Molecular subtypes of clear cell renal cell carcinoma are associated with sunitinib response in the metastatic setting*. **Clin Cancer Res**. 2015;21(6):1329-39.
110. Powles T, Plimack ER, Soulières D, Waddell T, Stus V, Gafanov R, et al. *Pembrolizumab plus axitinib versus sunitinib monotherapy as first-line treatment of advanced renal cell carcinoma (KEYNOTE-426): extended follow-up from a randomised, open-label, phase 3 trial*. **The Lancet Oncology**. 2020.
111. Motzer RJ, Rini BI, McDermott DF, Arén Frontera O, Hammers HJ, Carducci MA, et al. *Nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in first-line treatment for advanced renal cell*

carcinoma: extended follow-up of efficacy and safety results from a randomised, controlled, phase 3 trial. **Lancet Oncol.** 2019;20(10):1370-85.

112. Gild P, Ehdaie B, Kluth LA. *Effect of obesity on bladder cancer and renal cell carcinoma incidence and survival.* **Curr Opin Urol.** 2017;27(5):409-14.

113. Sanchez A, Furberg H, Kuo F, Vuong L, Ged Y, Patil S, et al. *Transcriptomic signatures related to the obesity paradox in patients with clear cell renal cell carcinoma: a cohort study.* **Lancet Oncol.** 2020;21(2):283-93.

114. Sültmann H, Heydebreck Av, Huber W, Kuner R, Buneß A, Vogt M, et al. *Gene Expression in Kidney Cancer Is Associated with Cytogenetic Abnormalities, Metastasis Formation, and Patient Survival.* **Clinical Cancer Research.** 2005;11(2):646.

115. Yu S, Jiang X, Li J, Li C, Guo M, Ye F, et al. *Comprehensive analysis of the GATA transcription factor gene family in breast carcinoma using gene microarrays, online databases and integrated bioinformatics.* **Scientific Reports.** 2019;9(1):4467.

116. Gad AA, Balenga N. *The Emerging Role of Adhesion GPCRs in Cancer.* **ACS Pharmacology & Translational Science.** 2020;3(1):29-42.

ANEXOS

Anexo A – Sistema de Classificação TNM para câncer de rim 8ª edição (2017)

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 – Eficácia de drogas alvo moleculares em CCR metastáticos

Medicação	Comparador	SLP mediana (meses)	Hazard ratio SLP	SG mediana (meses)	Hazard ratio SG	p-value SG
Sorafenibe ¹	Placebo	5.5 vs 2.8	0.44	17.8 vs 15.2	0.88	0.146
Sunitinibe ²	IFN-a	11.0 vs 5.0	0.54	26.4 vs 21.8	0.82	0.051
Temsirolimo ³	IFN-a	5.5 vs 3.1	0.66	10.9 vs 7.3	0.73	0.0078
Everolimo ⁴	Placebo	4.9 vs 1.9	0.33	14.8 vs 14.4	0.87	0.162
Bevacizumab e + IFN-a ^{5,6}	IFN-a	10.2 vs 5.4	0.60	23.3 vs 21.3	0.86	0.129
Pazopanibe ^{7,8}	Placebo	9.2 vs 4.2	0.46	22.9 vs 20.5	0.91	0.224
Axitinibe ⁹	Sorafenibe	6.7 vs 4.7	0.66	29.4 vs 27.8*	0.81	0.144

¹Escudier B, et al. J Clin Oncol. 20 July 10, 2009; ²Motzer RJ, et al. JCO. 27 August 1, 2009;

³Torisel Prescribing Information, 2011; ⁴Motzer RJ, et al. Câncer. September 15, 2010;

⁵Avastin Prescribing Information, 2009; ⁶Escudier B, et al. J Clin Oncol. 28: 2144-2150, 2010;

⁷Votrient Prescribing Information, 2011; ⁸Sternberg C, et al. J Clin Oncol. 28:1061-1068, 2010;

⁹Rini BI, et al. Lancet 2011; * OS available only in cytokine-treated subgroup Michaelson et

al , ASCO 2012, Abstract No. 4546.

Anexo C – Ficha de coleta

Confidential

Perfil dos pacientes com CCR tipo CC metastático do HCB
Page 1

Ficha De Coleta CCR

Record ID

DESCRIÇÃO DEMOGRÁFICA, IDENTIFICAÇÃO E REGISTRO

Pass ID

Nome (iniciais)

 ((Iniciais em letra maiúscula))

RH Barretos

Município de Nascimento

Estado

Data de Nascimento

Sexo

- Feminino
 Masculino

Cor

- Indefinido
 Branco
 Negro
 Amarelo
 Pardo
 Indígena
 Cafuso
 Ignorado

Estado Civil

- Indefinido
 Separado
 Divorciado
 Casado
 Solteiro
 Viuvo
 União estável

Grau de Instrução

- Indefinido
 Analfabeto
 Primeiro grau incompleto
 Primeiro grau completo
 Segundo grau incompleto
 Segundo grau completo
 Superior incompleto
 Superior completo
 Pós graduação incompleto
 Pós graduação completo

Confidential

Page 2

Religião	<input type="radio"/> Católico <input type="radio"/> Evangélica <input type="radio"/> Espírita <input type="radio"/> Umbanda e Candomblé <input type="radio"/> Judaica <input type="radio"/> Religiões orientais <input type="radio"/> Sem religião <input type="radio"/> Outro
----------	--

Ocupação	_____
	(Se não informado: N/I)

Telefone para recados	_____
	(Se não informado: N/I)

HISTÓRIA FAMILIAR

História Familiar de Câncer (parentes de 1º grau)	<input type="radio"/> Não <input type="radio"/> Mama <input type="radio"/> Próstata <input type="radio"/> Pulmão <input type="radio"/> Cérvix <input type="radio"/> Estômago <input type="radio"/> Colorretal <input type="radio"/> Ovário <input type="radio"/> SNC <input type="radio"/> Rim <input type="radio"/> Melanoma <input type="radio"/> CP <input type="radio"/> Ignorado <input type="radio"/> Outro
---	--

DADOS ONCOLÓGICOS

Data do Diagnóstico do Câncer	_____
	(Data de entrada (1º AP - mx ou primário))
Tipo de amostra	<input type="radio"/> Nefrectomia <input type="radio"/> Core biópsia de rim
Data da Nefrectomia	_____
Data da Core biópsia de rim	_____
Nº Exame de Patologia	_____
	(Descrever ex E00/0000)

MICROSCOPIA PATOLÓGICA DA AMOSTRA TUMORAL

Tipo Histológico Células Claras (sem outra especificação)
 Células Claras (subtipo especificado)

Subtipo Histológico Componente eosinofílico
 Componente sarcomatóide
 Outro subtipo

Porcentagem do componente sarcomatóide _____

Especificar "outro subtipo" _____

Grau de Furhman I
 II
 III
 IV
 Ignorado

Tamanho do Tumor Primário _____

(Maior diâmetro (em cm))

ESTADIAMENTO TNM - AJCC

Data do estadiamento inicial _____

Estadiamento T 0
 1a
 1b
 2a
 2b
 3a
 3b
 3c
 4
 X
 Ignorado

Estadiamento N 0
 1
 2
 X
 Ignorado

Estadiamento M 0
 1
 Ignorado

Agrupamento TNM I
 II
 III
 IV
 Ignorado

AVALIAÇÃO POR IMAGEM AO DIAGNÓSTICO DE METÁSTASE

Data do diagnóstico de metástase

(data da inicial da biópsia ou data do diagnóstico radiológico se M0 inicial)

Sítio metástases

- Fígado
 Pulmão
 Ossos
 LFN
 SNC
 Outro
 Ignorado

Se outras metástases, detalhar:

AVALIAÇÃO FÍSICA E LABORATORIAL AO DIAGNÓSTICO DE METÁSTASE

Peso

(Em Kg)

Altura

(em centímetros)

Intervalo entre o diagnóstico e o tratamento < 1 ano?

- Sim
 Não

KPS < 80%?

- Sim
 Não
 (KPS de 80% corresponde a ECOG 1)

LDH maior que 1.5x o LSN?

- Sim
 Não
 Ignorado
 (LSN: limite superior da normalidade.)

Hemoglobina menor que 11 g/dL?

- Sim
 Não

Neutrófilos ACIMA do LSN?

- Sim
 Não
 (LSN: limite superior da normalidade.)

Plaquetas ACIMA do LSN?

- Sim
 Não
 (LSN: limite superior da normalidade.)

Albumina

((em g/dL))

Cálcio sérico ACIMA do LSN?

- Sim
 Não
 (LSN: limite superior da normalidade.)

TRATAMENTO DE PRIMEIRA LINHA

Data do Início do Sunitinibe

Dose Inicial

(em miligramas)

Resposta ao tratamento

- Completa
 Parcial
 Estável
 Progressão
 Benefício Clínico
 Resposta Mista
 Ignorado
 (Resposta na 1ª avaliação pós início do Sutent)

Evento adverso Grau 5 (CTCAE)

- Não
 Sim
 Não se aplica
 Ignorado

Redução de dose durante o tratamento

- Não
 Sim
 Não se aplica
 Ignorado

Interrupção de dose por toxicidade

- Não
 Sim
 Não se aplica
 Ignorado

Motivo da interrupção por toxicidade

- Diarreia
 Sd. Mão-Pé
 Hipotireoidismo
 Náusea
 Hematológico
 Fadiga
 Astenia
 Dispnéia
 Não se aplica
 Ignorado
 Outro motivo

Outro motivo de interrupção por toxicidade:

(Descrever o motivo)

Progressão da doença?

- Sim
 Ignorado
 Outro

Outro:

(Descrever, exemplo: seguimento, etc)

Data do fim do tratamento com Sunitinib

ADESAO E OUTRAS LINHAS DE TRATAMENTO

Posologia Inicial

- 50mg 4:2
 50mg 2:1
 50mg 1:1
 Outros

Se outra posologia inicial, descreva:

Alteracao de dose

- Nao
 Alterou para 37,5mg 4:2
 Alterou para 37,5mg 2:2
 Alterou para 12,5mg 4:2
 Alterou para 12,5mg 2:2
 Alterou para 50mg 2:2
 Alterou para 50mg 1:1
 Outras

Se outra posologia, descreva:

Tratamento na segunda linha

- Nivolumabe
 Nivolumabe + ipilimumabe
 Pembrolizumabe
 Pazopanibe
 Axitinibe
 Cabozantinibe
 Everolimo
 Interferon alfa
 Sorafenibe
 Quimioterapia
 Outros

Se outro segunda linha, descreva:

Tratamento na terceira linha

- Nivolumabe
 Nivolumabe + ipilimumabe
 Pembrolizumabe
 Pazopanibe
 Axitinibe
 Cabozantinibe
 Everolimo
 Interferon alfa
 Sorafenibe
 Quimioterapia
 Outros

Se outro terceira linha, descreva:

Confidential

Page 7

DESFECHO

Último Follow Up:

(Data do último contato)

Status clínico no último follow-up

- Vivo SEM doença
- Vivo COM doença
- Óbito PELA doença
- Óbito OUTRAS causas
- Óbito causa não descrita
- Perda do seguimento
- Ignorado

Data do óbito

Anexo D – Lista de genes do Painel "*nCounter progression panel*" e suas vias.

Gene Name	Angiogenesis	EMT	ECM	Metastasis	Progression Categories
AAMP	+				Angiogenesis, ECM Layers
ABI3BP			+		ECM Layers
ACHE			+		ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
ACTG2				+	Metastasis
ACVR1			+		ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
ACVR1C			+		ECM Layers, Tumor Growth
ACVRL1	+		+		Angiogenesis, Tumor Growth
ADAM15	+		+		Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, EMT, Tumor Invasion
ADAM17			+		ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Growth, Tumor Invasion, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
ADAM28			+		ECM Layers, ECM Remodeling
ADAM8	+		+		Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
ADAM9			+		ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Growth, Tumor Invasion
ADAMTS1			+		ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Growth, Tumor Invasion
ADAMTS12			+		ECM Layers, ECM Remodeling
ADAMTS8			+		ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Growth
ADAP1		+			ECM Layers, EMT
ADD1	+				Angiogenesis, ECM Layers, Transcription Factor, Tumor Invasion
ADM2	+				Angiogenesis
ADRA2B	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
AEBP1			+		ECM Layers, Transcription Factor, Tumor Invasion
AGGF1	+				Angiogenesis, Tumor Growth, Tumor Invasion
AGR2		+			EMT
AGRN			+		ECM Layers, ECM Remodeling
AGT	+		+		Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
AHNAK		+			EMT
AKAP12		+		+	ECM Layers, EMT, Metastasis
AKAP2		+			EMT
AKT1	+	+		+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, EMT, Tumor Invasion, Tumor Growth
AKT2	+			+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, Hypoxia
AKT3	+	+		+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, EMT, Hypoxia
ALB			+		Angiogenesis, ECM Layers
ALDOA				+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, Hypoxia, Tumor Invasion
ALOX5		+			EMT
AMH			+		Transcription Factor, Tumor Growth
ANG	+		+		Angiogenesis, ECM Layers, Hypoxia, Tumor Growth
ANGPT1	+			+	Angiogenesis, Hypoxia, Tumor Invasion
ANGPT2	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, Hypoxia
ANGPTL2		+			EMT
ANGPTL4	+				Angiogenesis, Hypoxia
ANPEP	+				Angiogenesis, ECM Layers
ANXA2P2	+		+		Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Invasion
AP1M2		+			EMT
APC				+	Tumor Growth
APOD	+				Angiogenesis, Tumor Growth, Tumor Invasion
APOE			+		ECM Layers, Tumor Growth
APOH	+		+		Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
AQP1	+				Angiogenesis, ECM Layers
ARAP2		+			EMT
AREG		+			ECM Layers, EMT, Tumor Growth
ARHGAP32		+			ECM Layers, EMT
ARHGDIB		+		+	EMT, Metastasis, Tumor Invasion
ASPN		+	+		ECM Layers, EMT, Tumor Growth
ATPIF1	+				Angiogenesis, Tumor Growth
B3GNT3		+			ECM Layers, EMT
BAD	+				Angiogenesis, Tumor Growth
BAG2		+			EMT
BAI1	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
BAI3	+				Angiogenesis, ECM Layers
BCAS1		+			EMT
BGN		+	+		ECM Layers, EMT
BICC1		+			EMT
BMP4	+		+		Angiogenesis, Tumor Growth
BMP5			+		Tumor Growth
BMP7		+	+		Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Transcription Factor, Tumor Growth, Tumor Invasion
BMPER	+				Angiogenesis, Tumor Growth
BMPR1A			+		ECM Layers, Tumor Growth
BMPR1B			+		ECM Layers, Tumor Growth
BMPR2			+		ECM Layers, Tumor Growth
BNC2		+			ECM Layers, EMT
BRMS1				+	Tumor Growth, Metastasis, Transcription Factor
BTG1	+				Angiogenesis, Tumor Growth
C1S		+			EMT

(Continuação...)

C3	+				Angiogenesis, Tumor Growth
C3AR1	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
CADM1				+	ECM Layers, Metastasis, Tumor Growth, Tumor Invasion
CALCRL	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
CALD1		+			ECM Layers, EMT, Tumor Invasion
CAMK2A				+	ECM Layers, Hypoxia, Transcription Factor, Tumor Growth
CAMK2B				+	ECM Layers, Hypoxia, Tumor Growth
CAMK2D				+	ECM Layers, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
CAMP	+				Angiogenesis
CASP8	+			+	Angiogenesis, ECM Remodeling, Metastasis
CAV1	+	+			Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
CBLC			+		EMT, Tumor Growth
CCBE1	+		+		Angiogenesis, ECM Layers
CCDC80				+	ECM Layers
CCL11	+		+		Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
CCL21				+	ECM Layers, Tumor Invasion
CCL5				+	Tumor Invasion
CCL7			+	+	ECM Remodeling, Tumor Growth, Tumor Invasion
CCL8			+		EMT
CCR2	+		+		Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
CCR3	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
CD163			+		ECM Layers, EMT
CD24			+		ECM Layers, EMT, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
CD2AP			+		ECM Layers, EMT, Tumor Growth
CD34	+				Angiogenesis, ECM Layers, Transcription Factor, Tumor Growth, Tumor Invasion
CD36				+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Transcription Factor, Tumor Invasion
CD44			+	+	ECM Layers, ECM Remodeling, Metastasis, Transcription Factor, Tumor Invasion
CD46			+		ECM Layers, EMT
CD82				+	ECM Layers, Metastasis
CDC42	+				Angiogenesis, ECM Layers
CDH1			+	+	ECM Layers, ECM Remodeling, EMT, Metastasis, Tumor Invasion
CDH11			+	+	ECM Layers, EMT, Tumor Invasion, Metastasis
CDH13	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
CDH2			+		ECM Layers, EMT, Tumor Invasion
CDK14			+		ECM Layers, EMT, Tumor Growth
CDKN1A				+	Hypoxia, Tumor Growth
CDKN2A				+	Tumor Growth, Transcription Factor, Tumor Invasion
CDS1			+		ECM Layers, EMT
CEACAM1	+		+		Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Tumor Invasion
CEACAM5			+		ECM Layers, EMT
CEACAM6			+		ECM Layers, EMT
CEP170			+		EMT
CEP295				+	ECM Layers
CFP				+	ECM Layers
CGN			+		EMT
CHAD				+	ECM Remodeling, Tumor Growth
CHD4				+	Transcription Factor
CHI3L1	+				Angiogenesis
CHP1	+				Angiogenesis
CHP2	+				Angiogenesis
CHRDL1			+		EMT
CHRNA7	+				Angiogenesis, ECM Layers, Hypoxia, Tumor Growth
CIB1	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
CKMT1A			+		EMT
CLDN1				+	ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
CLDN3			+		ECM Layers, EMT, Hypoxia, Tumor Invasion
CLDN4			+		ECM Layers, EMT, Tumor Invasion
CLDN7			+		ECM Layers, EMT, Tumor Invasion
CLEC2B			+		ECM Layers, EMT
CLEC3B				+	ECM Layers, Tumor Growth
CLIC4	+		+		Angiogenesis, ECM Layers, EMT
CLU				+	Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
CMA1	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
CNN1				+	Metastasis
COL18A1	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
COL1A1				+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, EMT, Metastasis
COL1A2			+	+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Metastasis, Tumor Growth
COL3A1			+	+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Growth, Tumor Invasion
COL4A1				+	ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Growth
COL4A2	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Growth
COL4A6				+	ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
COL5A1				+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Growth, Tumor Invasion
COL5A2			+	+	ECM Layers, ECM Remodeling, EMT, Tumor Invasion
COL6A1			+	+	ECM Layers, ECM Remodeling, EMT, Tumor Growth, Tumor Invasion
COL6A2			+	+	ECM Layers, ECM Remodeling, EMT, Tumor Invasion

(Continuação...)

COL6A3			+		ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
COL7A1			+		ECM Layers, Tumor Invasion
COMP			+		ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Growth, Tumor Invasion
CREBBP			+	+	Tumor Growth, Hypoxia, Transcription Factor
CRIP2			+		ECM Layers, Tumor Growth
CRISPLD2			+	+	ECM Layers, EMT
CSF2RB			+		ECM Layers, EMT
CSPG4		+			Angiogenesis, ECM Layers
CST7				+	Metastasis
CTNNB1		+	+		Angiogenesis, ECM Layers, Transcription Factor, Tumor Growth, Tumor Invasion
CTNND1			+		ECM Layers, Tumor Invasion
CTSG			+		ECM Layers, Tumor Invasion
CTSH		+	+		Angiogenesis, EMT, Tumor Growth
CTSK			+		EMT
CTSL				+	Metastasis
CUL1			+		Tumor Growth, Tumor Invasion
CX3CL1		+			Angiogenesis, ECM Layers, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
CXADR			+		Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Tumor Invasion
CXCL10		+			Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
CXCL11				+	ECM Remodeling
CXCL12			+	+	Tumor Growth, EMT, Tumor Invasion
CXCL13		+	+		Angiogenesis, EMT, Tumor Growth, Tumor Invasion
CXCL17		+			Angiogenesis
CXCL8		+		+	Angiogenesis
CXCR2				+	ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
CXCR3		+			Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Invasion
CXCR4			+	+	ECM Layers, EMT, Hypoxia
CYB561			+		ECM Layers, EMT
CYBB				+	ECM Layers, Hypoxia
CYP1B1		+	+		Angiogenesis, EMT, Tumor Invasion
DAG1				+	ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
DCC				+	ECM Layers, Metastasis
DCN			+	+	ECM Layers, EMT, Tumor Growth
DDR2			+		ECM Layers, EMT, Transcription Factor, Tumor Invasion
DENN5A			+		EMT
DENR				+	Tumor Growth, Tumor Invasion
DES1			+		EMT
DICER1		+			Angiogenesis, Tumor Growth
DLC1				+	Metastasis, Tumor Invasion
DLG1				+	ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
DLL4		+			Angiogenesis, ECM Layers
DPT			+	+	ECM Layers, EMT, Tumor Growth, Tumor Invasion
DPYSL3			+		EMT, Metastasis
DSC2			+		ECM Layers, EMT, Tumor Invasion
DST				+	ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
ECM1		+		+	Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
ECM2			+	+	ECM Layers, EMT
ECSCR		+			Angiogenesis, ECM Layers
EDN1				+	Hypoxia, Tumor Growth
EGF		+		+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, Hypoxia, Tumor Growth
EGFL7		+		+	Angiogenesis, ECM Layers
EGFR			+	+	Cancer Metabolism, EMT, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
EGLN2				+	Cancer Metabolism, Hypoxia, Tumor Growth
EGLN3				+	Cancer Metabolism, Hypoxia, Tumor Growth
EIF2AK3		+			Angiogenesis, Cancer Metabolism
EIF4E2				+	Cancer Metabolism, Tumor Invasion, Hypoxia, Metastasis
EIF4EBP1				+	Cancer Metabolism, Hypoxia, Tumor Growth
ELF3			+		EMT, Transcription Factor
ELK3		+			Angiogenesis, Transcription Factor
EMCN		+			Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Invasion
EMILIN1				+	ECM Layers, Tumor Invasion
EMILIN3				+	ECM Layers
EMP3			+		ECM Layers, EMT, Tumor Growth
ENO1				+	Cancer Metabolism, ECM Layers, Hypoxia, Transcription Factor, Tumor Growth
ENO2				+	ECM Layers, Hypoxia
ENO3				+	Hypoxia
ENPEP		+			Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
ENPP2			+		ECM Layers, EMT, Transcription Factor
EP300				+	Tumor Growth, Hypoxia, Transcription Factor
EPAS1		+			Angiogenesis, Hypoxia, Transcription Factor
EPCAM			+		ECM Layers, EMT, Tumor Growth
EPHA1		+	+		Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Tumor Growth, Tumor Invasion
EPHA2		+			Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
EPHB1		+			Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
EPHB3		+			Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Invasion
EPHB4		+			Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Invasion
EPN3			+		EMT
EPS8L1			+		EMT
ERBB2		+	+	+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, EMT, Hypoxia, Tumor Growth
ERBB2IP				+	ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
ERBB3			+		ECM Layers, EMT, Tumor Growth, Tumor Invasion

(Continuação...)

EREG	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
ERMP1		+			ECM Layers, EMT
ESRP1		+			ECM Layers, EMT
ETV4				+	Transcription Factor, Tumor Growth
EVI2A		+			ECM Layers, EMT
EVPL		+			EMT
F11R		+			Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Tumor Invasion
F3	+		+		Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
FAM174B		+			ECM Layers, EMT
FAP	+	+			Angiogenesis, ECM Layers, EMT
FASLG	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
FBLN1		+	+		ECM Layers, EMT
FBLN5			+		Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Invasion
FBN1		+	+		ECM Layers, EMT
FBN2			+		ECM Layers
FBP1		+			EMT, Tumor Growth
FERMT2		+			EMT, Tumor Invasion
FGF18	+				Angiogenesis, Tumor Growth
FGF2	+		+		Angiogenesis, ECM Remodeling, Tumor Growth
FGF9	+		+		Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
FGFR1	+				Angiogenesis, Cancer Metabolism, Tumor Growth
FGFR2	+		+		Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, Tumor Growth
FGFR3		+			Cancer Metabolism, ECM Layers, EMT, Tumor Growth, Tumor Invasion
FGFR4				+	ECM Layers, Tumor Growth
FGL2		+			EMT
FHL1		+			ECM Layers, EMT, Tumor Growth
FIGF	+				Angiogenesis, Hypoxia, Tumor Growth
FLI1		+			EMT, Transcription Factor
FLT1	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, Hypoxia, Tumor Growth
FLT4	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
FMOD			+		ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
FN1	+	+	+	+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, EMT, Tumor Invasion
FOXC2	+	+			Angiogenesis, EMT, Transcription Factor, Tumor Growth, Tumor Invasion
FOXO4	+				Angiogenesis, Transcription Factor, Tumor Growth
FRAS1			+		ECM Layers, Tumor Invasion
FREM1			+		ECM Layers, Tumor Invasion
FREM2			+		ECM Layers, Tumor Invasion
FST			+		Tumor Growth
FSTL1		+			EMT
FUT3		+			ECM Layers, EMT
FXYD6		+			ECM Layers, EMT
GALNT7		+			ECM Layers, EMT
GATA4	+				Angiogenesis, Transcription Factor, Tumor Growth
GDF15		+			EMT, Tumor Growth
GDF5			+		Tumor Growth
GDF6			+		Tumor Growth
GIMAP4		+			EMT
GIMAP6		+			EMT
GJAS	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Invasion
GLYR1		+			EMT
GPI	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
GPR124	+				Angiogenesis, ECM Layers
GPR56	+	+			Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Tumor Invasion
GPX1	+				Angiogenesis, Tumor Growth
GREM1	+	+	+		Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Transcription Factor, Tumor Growth
GRHL2		+			EMT, Transcription Factor
GSN				+	Metastasis, Tumor Invasion
GTF2I	+				Angiogenesis, Transcription Factor
GZMK		+			EMT
HAPLN1			+		ECM Layers, Tumor Invasion
HAS1			+		ECM Layers, Tumor Invasion
HDAC5	+				Angiogenesis, Transcription Factor
HDHD3		+			EMT
HEG1		+			Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Tumor Invasion

(Continuação...)

HGF	+		+	+	Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Tumor Growth, Tumor Invasion
HIF1A	+		+	+	Angiogenesis, Ca Metabolism, ECM Layers, ECM Remodeling, EMT, Hypoxia, Transcription, Tumor Growth
HIPK1	+				Angiogenesis, Tumor Growth
HIPK2	+				Angiogenesis, Tumor Growth
HK2				+	Cancer Metabolism, Hypoxia
HK3				+	Cancer Metabolism, Hypoxia
HKDC1				+	Cancer Metabolism, Hypoxia
HLA-DPB1				+	ECM Layers, Metastasis
HMOX1	+			+	Angiogenesis, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
HOXA5	+				Angiogenesis, Transcription Factor, Tumor Growth
HOXA7	+				Angiogenesis, Transcription Factor
HOXB13	+				Angiogenesis, Transcription Factor
HOXB3	+				Angiogenesis, Transcription Factor
HPSE	+			+	Angiogenesis, Tumor Growth, Tumor Invasion
HRAS	+			+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, Tumor Growth
HSD17B12				+	ECM Layers
HSP90B1				+	ECM Layers, Hypoxia, Tumor Invasion
HSPB1	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Invasion
HSPG2	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling
HUNK				+	Metastasis
IBSP				+	ECM Remodeling, Tumor Growth, Tumor Invasion
ICAM1				+	ECM Layers, Transcription Factor, Tumor Invasion
ID1	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, Transcription Factor, Tumor Growth, Tumor Invasion
ID2				+	Transcription Factor, Tumor Growth
ID4				+	Transcription Factor, Tumor Growth
IFNG				+	Angiogenesis, ECM Layers, Hypoxia, Tumor Growth
IGF1			+	+	Angiogenesis, EMT, Hypoxia, Tumor Growth
IGFBP4			+		EMT, Tumor Growth
IGFBP7			+		ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
IL10RA			+		ECM Layers, EMT
IL11				+	Tumor Growth
IL13RA2				+	Angiogenesis, ECM Layers
IL15	+				ECM Layers, Tumor Growth
IL18	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
IL1A	+			+	Angiogenesis, Hypoxia, Tumor Growth
IL1B	+			+	Angiogenesis, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
IL1RL1				+	ECM Layers
IL1RN				+	ECM Layers, EMT, Tumor Invasion
IL6	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, Hypoxia, Tumor Growth
ILK			+	+	ECM Layers, EMT, Tumor Growth, Tumor Invasion
INHBA				+	Tumor Growth
INHBE				+	Tumor Growth
IRF6				+	Tumor Growth, EMT, Transcription Factor
ISL1	+				Angiogenesis, Transcription Factor, Tumor Growth
ISLR				+	EMT, Tumor Invasion
ITGA1				+	ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
ITGA11				+	ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
ITGA2				+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
ITGA3				+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
ITGA5	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Growth, Tumor Invasion
ITGA6				+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
ITGA7				+	ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
ITGA8				+	ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Growth, Tumor Invasion
ITGA9				+	ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
ITGAM				+	Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Invasion
ITGB1	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Growth, Tumor Invasion
ITGB1BP1	+				Angiogenesis
ITGB2				+	Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Invasion
ITGB3	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Growth, Tumor Invasion
ITGB4				+	ECM Layers, ECM Remodeling, EMT, Tumor Invasion
ITGB6				+	ECM Layers, ECM Remodeling, EMT, Tumor Invasion
ITGB7				+	ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
ITGB8				+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
ITM2A				+	ECM Layers, EMT
JAG1	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Tumor Growth, Tumor Invasion
JAM2				+	Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Tumor Invasion
JAM3	+			+	Angiogenesis, EMT, Tumor Invasion
JUN	+				Angiogenesis, Cancer Metabolism, Transcription Factor, Tumor Growth, Tumor Invasion
KCNJ8				+	ECM Layers, EMT
KDM1A				+	Angiogenesis, Metastasis, Transcription Factor
KDR	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
KIAA1462				+	EMT
KISS1				+	Metastasis, Tumor Growth
KLK3	+				Angiogenesis, Tumor Invasion
KRAS	+			+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, Tumor Growth
KRIT1	+				Angiogenesis, Tumor Growth
KRT1	+			+	Angiogenesis, ECM Layers
KRT14				+	EMT, Tumor Invasion
KRT19				+	EMT
KRT7				+	EMT
LAD1				+	ECM Layers, EMT
LAMA1				+	ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion

(Continuação...)

LAMA3				+		ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
LAMA4					+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
LAMA5		+			+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Growth, Tumor Invasion
LAMB3					+	ECM Remodeling, Tumor Invasion
LAMC1					+	ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Growth, Tumor Invasion
LAMC2					+	ECM Remodeling, Tumor Invasion
LDHA					+	Hypoxia
LEFTY1					+	Tumor Growth
LGALS1				+	+	ECM Layers, EMT
LHFP					+	ECM Layers, EMT
LIFR					+	ECM Layers, Metastasis, Tumor Growth
LLGL2				+	+	ECM Remodeling, EMT, Tumor Growth
LOX				+	+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, EMT
LOXL2		+		+	+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, EMT, Tumor Invasion
LRG1		+				Angiogenesis
LTBP4					+	ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
LUM					+	ECM Layers, Tumor Growth
LY96					+	ECM Layers, EMT
MAF					+	EMT, Transcription Factor
MAP2K1		+			+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
MAP2K2		+			+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
MAP2K4					+	Metastasis
MAP3K7		+				Angiogenesis, ECM Layers
MAPK1		+		+	+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Remodeling, Hypoxia, Transcription Factor, Tumor Growth, Tumor Invasion
MAPK3		+		+	+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
MAPKAPK3		+				Angiogenesis
MCAM		+			+	Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Invasion
MED1		+				Angiogenesis, Tumor Invasion, Transcription Factor
MED23					+	Metastasis, Transcription Factor
MEG3		+				Angiogenesis, Tumor Growth, Tumor Invasion
MEOX2		+	+			Angiogenesis, EMT, Transcription Factor
MET					+	Cancer Metabolism, ECM Layers, Tumor Growth
MFAP4				+	+	ECM Layers, EMT, Tumor Invasion
MGAT5					+	ECM Layers, Tumor Invasion
MGP					+	ECM Layers
MISP					+	EMT
MMP1					+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
MMP10					+	ECM Layers, ECM Remodeling
MMP12					+	ECM Remodeling, Tumor Growth
MMP13					+	ECM Layers, ECM Remodeling, Hypoxia
MMP14		+			+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Hypoxia, Transcription Factor, Tumor Growth, Tumor Invasion
MMP17					+	ECM Layers, ECM Remodeling
MMP2		+	+		+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, EMT, Hypoxia
MMP24					+	ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
MMP3				+	+	ECM Layers, ECM Remodeling, EMT, Hypoxia, Tumor Invasion
MMP9				+	+	ECM Layers, ECM Remodeling, EMT, Hypoxia, Tumor Growth
MMRN2		+			+	Angiogenesis, ECM Layers
MPDZ					+	ECM Layers, EMT
MRC1					+	ECM Layers, EMT
MS4A4A					+	ECM Layers, EMT
MS4A6A					+	ECM Layers, EMT
MT3					+	Angiogenesis, Hypoxia, Metastasis, Tumor Growth
MTA1					+	Transcription Factor
MTBP					+	Metastasis, Tumor Growth
MTDH		+				Angiogenesis, ECM Layers, Transcription Factor
MTOR					+	Cancer Metabolism, Hypoxia, Transcription Factor, Tumor Growth
MUC1				+		ECM Layers, EMT, Tumor Growth
MYC				+	+	Cancer Metabolism, Transcription Factor, Tumor Growth
MYCL					+	Transcription Factor
MYH11					+	Metastasis
MYLK				+	+	EMT, Metastasis
MYO1D					+	EMT
MYO5C					+	EMT
NAA15		+				Angiogenesis, Transcription Factor
NAP1L3					+	EMT
NCAM1					+	ECM Layers, Tumor Invasion
NCL		+				Angiogenesis
NDNF					+	ECM Layers, Tumor Growth
NDP					+	Angiogenesis, ECM Layers, Transcription Factor, Tumor Growth
NDRG1					+	ECM Layers, Hypoxia, Metastasis
NF1		+				Angiogenesis, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
NF2					+	ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
NFAT5		+				Angiogenesis, Transcription Factor
NFATC2		+				Angiogenesis, ECM Layers, Transcription Factor, Tumor Growth
NFKB1					+	Hypoxia, Transcription Factor
NID2					+	ECM Layers, Tumor Invasion
NME1					+	Metastasis, Tumor Growth
NME4					+	Metastasis
NODAL		+	+	+		Angiogenesis, EMT, Tumor Growth, Tumor Invasion
NOS2					+	Angiogenesis, Hypoxia, Tumor Growth
NOS3		+			+	Angiogenesis, ECM Layers, Hypoxia, Tumor Growth
NOTCH1		+	+			Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Transcription Factor, Tumor Invasion

(Continuação...)

NOX5	+				Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, Tumor Growth
NPR1	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
NR3C1		+			Angiogenesis, EMT, Transcription Factor, Tumor Growth
NR4A1	+			+	Angiogenesis, Metastasis, Transcription Factor, Tumor Growth
NR4A3				+	Transcription Factor, Tumor Growth
NRCAM	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Invasion
NRP1	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
NRP2	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
NRXN1	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Invasion
NRXN3	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Invasion
NTRK1	+				Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
OAS1		+			EMT
OCLN		+			ECM Layers, EMT
OGN			+		ECM Layers, Tumor Growth
OLFML2B		+	+		ECM Layers, EMT
OVOL2	+	+			Angiogenesis, EMT, Tumor Growth
P3H1		+			EMT
P3H2			+		ECM Layers, Tumor Invasion
PCOLCE		+	+		ECM Layers, EMT
PDCD10	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
PDCL3	+				Angiogenesis, Tumor Invasion
PDGFA	+		+		Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, ECM Remodeling, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
PDGFC		+			Angiogenesis, Cancer Metabolism, EMT, Tumor Growth
PDGFRB	+	+			Cancer Metabolism, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
PDK1				+	Cancer Metabolism, Hypoxia
PDPN	+				ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
PEBP4				+	Metastasis
PECAM1			+		Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Invasion
PFKFB1				+	Hypoxia
PFKFB4				+	Hypoxia
PGK1				+	Cancer Metabolism, Hypoxia
PIK3CA	+			+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, Hypoxia, Tumor Growth
PIK3CD	+			+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, Hypoxia
PIK3CG	+			+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
PIK3R1	+			+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, Hypoxia, Tumor Invasion
PIK3R2	+			+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, Hypoxia, Tumor Growth
PIK3R5	+			+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, Hypoxia
PIK3R6	+				Angiogenesis
PITX2			+		Transcription Factor, Tumor Growth
PKM			+		Cancer Metabolism, ECM Layers
PKN1		+		+	ECM Layers, EMT, Transcription Factor, Tumor Invasion
PKNOX1	+				Angiogenesis, Transcription Factor
PLA2G10	+				Angiogenesis, Transcription Factor
PLA2G2A	+				Angiogenesis
PLA2G2D	+				Angiogenesis
PLA2G3	+				Angiogenesis, ECM Layers
PLAU			+		Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
PLAUR				+	Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
PLCG1	+			+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, Hypoxia, Tumor Growth
PLCG2	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, Hypoxia
PLEKHO1		+			ECM Layers, EMT
PLS1		+			EMT
PLXDC1	+				Angiogenesis, ECM Layers
PLXNC1		+			ECM Layers, EMT, Tumor Invasion
PLXND1	+				Angiogenesis, ECM Layers
PMP22		+			ECM Layers, EMT, Tumor Growth
PNPLA6	+				Angiogenesis, ECM Layers
POPDC3		+			ECM Layers, EMT
POSTN			+		ECM Layers, Tumor Invasion
PPFIBP2		+			EMT
PPL		+			ECM Layers, EMT
PPP1R16B	+				Angiogenesis, ECM Layers
PPP2CB			+		Tumor Growth
PPP2R1A			+		Tumor Growth
PPP3R1	+				Angiogenesis, EMT
PRELP			+		ECM Layers, Tumor Invasion
PRF1		+		+	ECM Layers, EMT, Transcription Factor
PRKCB	+			+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
PRKCG	+			+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
PRKCZ		+			EMT, ECM Layers
PROK2	+				Angiogenesis, Tumor Growth, Tumor Invasion
PROM1		+		+	ECM Layers, EMT, Transcription Factor
PRR15L		+			EMT
PRSS22			+		ECM Remodeling
PRSS8		+			ECM Layers, ECM Remodeling, EMT
PTEN	+			+	Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, Tumor Growth
PTGDS		+			EMT
PTGIS	+	+			Angiogenesis, ECM Layers, EMT
PTGS2	+				Angiogenesis, Tumor Growth, Tumor Invasion
PTK2	+	+	+		Angiogenesis, ECM Remodeling, EMT, Tumor Invasion
PTK2B	+				Angiogenesis, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
PTK6		+			ECM Layers, EMT

(Continuação...)

PTPRB	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Invasion
PTPRC			+		ECM Layers, EMT, Tumor Growth, Tumor Invasion
PTPRM	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
PTRF			+		ECM Layers, EMT
PTTG1				+	Tumor Growth, Metastasis, Transcription Factor
PTX3			+		EMT
PXDN				+	ECM Layers
PYCARD			+		EMT, Transcription Factor
QKI			+		Angiogenesis, ECM Layers, EMT
RAB25			+		ECM Layers, EMT, Tumor Growth
RAC1	+		+		Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, EMT, Tumor Invasion
RAC2	+				Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
RAF1	+				Angiogenesis, Cancer Metabolism, ECM Layers, Hypoxia, Tumor Growth
RAMP1	+				Angiogenesis, ECM Layers
RAMP2	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
RB1				+	Transcription Factor, Tumor Growth
RBL1				+	Transcription Factor, Tumor Growth
RBL2				+	Transcription Factor, Tumor Growth
RBM47			+		EMT
RBPJ	+				Angiogenesis, Transcription Factor, Tumor Invasion
RBX1			+	+	Hypoxia, Tumor Growth
RELN				+	ECM Remodeling, Tumor Invasion
RGCC	+				Angiogenesis
RHOA			+	+	ECM Layers, EMT, Tumor Growth, Tumor Invasion
RNH1	+				Angiogenesis
ROBO4	+				Angiogenesis, ECM Layers
ROCK1	+			+	Angiogenesis, Tumor Growth, Tumor Invasion
ROCK2	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
RORA	+				Angiogenesis, Transcription Factor
RORB				+	Transcription Factor, Tumor Growth
RPS27A			+		ECM Layers, EMT, Tumor Growth, Tumor Invasion
RPS6KB1				+	Cancer Metabolism, Hypoxia, Tumor Growth
RPS6KB2				+	Cancer Metabolism, Hypoxia, Tumor Growth
RRAS	+				Angiogenesis, ECM Layers
RTN4	+				Angiogenesis, ECM Layers, EMT
RUNX1	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, Metastasis, Transcription Factor
RUNX1T1				+	EMT, Transcription Factor
S100A14				+	ECM Layers, EMT
S100A7	+				Angiogenesis, Tumor Invasion
S1PR1	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
SACS				+	EMT
SAMSN1				+	EMT
SCG2	+				Angiogenesis, Tumor Growth
SCNN1A				+	ECM Layers, EMT
SDC4				+	ECM Layers, ECM Remodeling, EMT, Tumor Invasion
SELE				+	ECM Layers, Tumor Invasion
SEMA3E	+				Angiogenesis
SERINC5				+	ECM Layers, EMT
SERPINA1				+	Angiogenesis, ECM Remodeling, Hypoxia
SERPINE1	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, EMT, Hypoxia
SERPINF1	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Tumor Growth
SERPING1				+	Angiogenesis, EMT
SERPINH1				+	ECM Layers, ECM Remodeling
SET				+	Tumor Growth
SETD2	+				Angiogenesis
SFRP1	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Tumor Growth
SFRP2	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Tumor Growth
SH2B3				+	Angiogenesis, EMT
SH2D3A				+	EMT
SH3YL1				+	EMT
SHB	+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
SIRT1	+				Angiogenesis
SKP1				+	Tumor Growth
SLC12A6	+				Angiogenesis, ECM Layers
SLC2A1				+	Cancer Metabolism, ECM Layers, Hypoxia
SLC35A3				+	ECM Layers, EMT
SLC37A1				+	ECM Layers, EMT
SLC44A4				+	Cancer Metabolism, ECM Layers, EMT
SLIT2	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Tumor Growth
SLPI				+	ECM Layers, EMT
SMAD1				+	Transcription Factor, Tumor Growth
SMAD2				+	ECM Remodeling, EMT, Tumor Growth, Tumor Invasion, Transcription Factor
SMAD3				+	ECM Remodeling, Hypoxia, Transcription Factor, Tumor Growth
SMAD4				+	ECM Layers, Hypoxia, Transcription Factor, Tumor Growth
SMAD5				+	Transcription Factor, Tumor Growth
SMAD9				+	Tumor Growth, Hypoxia, Transcription Factor
SMC3				+	ECM Layers, Tumor Growth
SMOC1				+	ECM Layers
SMURF1				+	ECM Layers, EMT, Tumor Growth
SMURF2				+	ECM Layers, Tumor Growth
SNAI1	+			+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, EMT, Transcription Factor, Tumor Invasion
SNAI2	+			+	EMT, Transcription Factor, Tumor Invasion

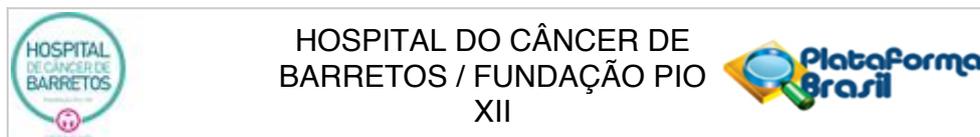
(Continuação...)

SNAI3		+				EMT, Transcription Factor
SNRPF					+	Metastasis
SOD1				+		Angiogenesis, ECM Layers
SORD			+			EMT, Tumor Invasion
SOX17		+				Angiogenesis, Transcription Factor, Tumor Growth
SOX2			+		+	EMT, Transcription Factor, Tumor Growth
SOX9			+		+	EMT, Transcription Factor, Tumor Growth, Tumor Invasion
SP1					+	Cancer Metabolism, Transcription Factor, Tumor Growth
SPARC		+		+		Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Tumor Growth
SPARCL1			+			EMT
SPDEF				+		EMT, Transcription Factor
SPHK2		+				Angiogenesis, Tumor Growth
SPINK5			+			Angiogenesis
SPINT1				+		Angiogenesis, EMT
SPOCK3					+	ECM Layers
SPP1				+	+	ECM Remodeling, EMT, Tumor Invasion
SRC		+			+	Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
SRF		+				Angiogenesis, Transcription Factor, Tumor Growth, Tumor Invasion
SRGN				+		Angiogenesis, ECM Layers, EMT
SRPK2		+				Angiogenesis, Tumor Growth
SRPX2		+				Angiogenesis, Tumor Invasion
SSTR2					+	ECM Layers, Tumor Growth
ST14				+		ECM Layers, EMT
STAB1		+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Invasion
STAB2		+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Invasion
STAT1		+				Angiogenesis, Transcription Factor, Tumor Growth
STAT3			+		+	ECM Layers, Hypoxia, Transcription Factor, Tumor Growth, Tumor Invasion
SULF1		+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
SV2B					+	ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
SYK		+			+	Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
SYNE1				+		ECM Layers, EMT
TACSTD2				+		ECM Layers, EMT, Tumor Growth, Tumor Invasion
TAL1		+				Angiogenesis, Transcription Factor
TBX1		+				Angiogenesis, Transcription Factor, Tumor Growth
TBX4		+				Angiogenesis, Transcription Factor
TBXA2R		+				Angiogenesis, ECM Layers
TCEB1					+	Hypoxia
TCEB2					+	Hypoxia
TCF20					+	Metastasis
TCF3				+		Transcription Factor, Tumor Growth
TCF4				+		EMT, Transcription Factor
TDGF1		+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
TEK		+			+	Angiogenesis, ECM Layers, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
TF					+	Angiogenesis, ECM Layers, Hypoxia
TFDP1					+	Tumor Growth, Transcription Factor
TFPI2				+		Angiogenesis, EMT
TGFB1				+	+	ECM Remodeling, EMT, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
TGFB2		+		+	+	Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
TGFB1		+			+	Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
TGFBR2		+		+	+	Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Tumor Growth
THBS1		+			+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
THBS2		+			+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Growth, Tumor Invasion
THBS4		+			+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Growth, Tumor Invasion
THY1		+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Invasion
TIE1		+				Angiogenesis, ECM Layers
TIMP1				+	+	Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling, Hypoxia, Metastasis, Tumor Growth
TIMP2					+	ECM Layers, ECM Remodeling, Metastasis, Tumor Growth
TIMP4					+	ECM Remodeling, Metastasis, Tumor Growth
TJP2				+		ECM Layers, EMT
TJP3				+		ECM Layers, EMT
TLR4					+	ECM Layers, Hypoxia, Tumor Invasion
TMC6				+		ECM Layers, EMT
TMEM100		+				Angiogenesis, ECM Layers
TMEM30B				+		ECM Layers, EMT, Tumor Invasion
TMPRSS2				+		ECM Layers, ECM Remodeling, EMT
TMPRSS4				+		ECM Layers, ECM Remodeling, EMT
TMPRSS6		+				Angiogenesis, ECM Layers, ECM Remodeling
TNC				+	+	ECM Layers, ECM Remodeling, EMT, Tumor Growth, Tumor Invasion
TNF					+	ECM Layers, ECM Remodeling, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
TNFRSF12A		+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Invasion
TNFRSF1A		+				Angiogenesis, Hypoxia
TNFSF10					+	ECM Layers
TNFSF12		+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
TNFSF13				+		ECM Layers, EMT, Tumor Growth
TNMD		+				Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth, Tumor Invasion
TNN					+	ECM Remodeling, Tumor Growth
TNS1				+		EMT, Tumor Invasion
TNXB					+	ECM Layers, ECM Remodeling, Tumor Invasion
TOM1L1				+		EMT
TP53					+	Cancer Metabolism, Transcription Factor, Tumor Growth
TPM2				+		EMT

(Continuação...)

TPSB2			+		ECM Remodeling
TPSD1			+		ECM Remodeling
TSHR				+	ECM Layers, Tumor Growth
TSPAN1			+		ECM Layers, EMT
TWIST1		+	+		Angiogenesis, EMT, Transcription Factor, Tumor Invasion
TWIST2			+	+	EMT, Transcription Factor, Tumor Growth
TXNIP				+	Metastasis, Tumor Growth
TYMP		+			Angiogenesis, Tumor Growth
UBA52			+		ECM Layers, EMT, Tumor Growth
UTS2		+			Angiogenesis
VAMP8			+		ECM Layers, EMT
VASH1		+			Angiogenesis, Tumor Growth
VAV2		+			Angiogenesis, ECM Layers, Tumor Growth
VAV3		+	+		Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Tumor Growth, Tumor Invasion
VCAM1			+	+	Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Hypoxia, Tumor Growth, Tumor Invasion
VCAN			+	+	ECM Layers, EMT, Tumor Growth, Tumor Invasion
VEGFA		+		+	Angiogenesis, ECM Remodeling, Tumor Growth, Hypoxia
VEGFB		+		+	Angiogenesis, ECM Remodeling, Tumor Growth
VEGFC		+			Angiogenesis, Tumor Growth, Tumor Invasion
VEZF1		+			Angiogenesis
VHL				+	Angiogenesis, Hypoxia, Transcription Factor, Tumor Growth, Tumor Invasion
VIM			+		ECM Layers, EMT, Tumor Invasion
VIT				+	EMT
VPS13A			+		EMT
VSIG4			+		ECM Layers, EMT, Tumor Growth, Tumor Invasion
VWA1				+	ECM Layers
VWA2				+	ECM Layers
WARS		+			Angiogenesis
WIPF1				+	EMT, Tumor Invasion
WNT5A		+		+	Angiogenesis, ECM Layers, EMT, Transcription Factor, Tumor Growth, Tumor Invasion
WNT5B				+	ECM Layers, EMT, Tumor Invasion
WWTR1				+	EMT, Transcription Factor
ZC3H12A			+		Angiogenesis, ECM Layers
ZCCHC24			+		EMT
ZEB1			+	+	Tumor Growth, EMT, Transcription Factor
ZEB2			+	+	Tumor Growth, EMT, Transcription Factor
ZFPM2			+		Angiogenesis, EMT, Transcription Factor
ZFYVE16				+	Tumor Growth
ZFYVE9				+	Tumor Growth
AGK					HKs
AMMECR1L					HKs
CC2D1B					HKs
CNOT10					HKs
CNOT4					HKs
COG7					HKs
DDX50					HKs
DHX16					HKs
DNAJC14					HKs
EDC3					HKs
EIF2B4					HKs
ERCC3					HKs
FCF1					HKs
GPATCH3					HKs
HDAC3					HKs
MRPS5					HKs
MTMR14					HKs
NOL7					HKs
NUBP1					HKs
PRPF38A					HKs
SAP130					HKs
SF3A3					HKs
TLK2					HKs
TMUB2					HKs
TRIM39					HKs
USP39					HKs
ZC3H14					HKs
ZKSCAN5					HKs
ZNF143					HKs
ZNF346					HKs

Anexo E – Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Análise do perfil de expressão gênica pelo método de nanoString e do receptor tirosina-quinase AXL em carcinomas de células renais metastáticos tratados com sunitinibe e sua associação com prognóstico.

Pesquisador: Luis Eduardo Rosa Zucca

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 34091114.1.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.787.173

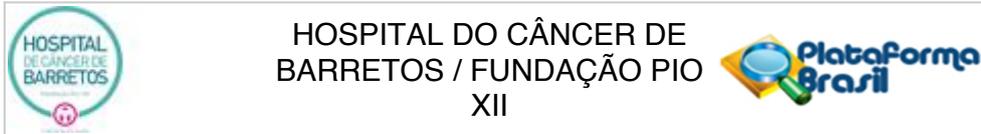
Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos denominados "apresentação do projeto", "objetivos" e "avaliação dos riscos e benefícios" foram retiradas do documento intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_908958_E3.pdf" (submetido na Plataforma Brasil em 15/05/2018)

RESUMO:

Carcinoma de células renais representa 2-3% de todos dos cânceres de países ocidentais. Dados de 2008, estimaram a incidência de câncer de rim no Brasil de aproximadamente 4100 brasileiros, sendo que metade dessas pacientes morreram da doença naquele ano. Novas terapias alvomoleculares emergiram nos últimos anos para pacientes com câncer de rim metastático, apresentando respostas tumorais objetivas em torno de 30%, com aumento significativo em sobrevida global. Devido a heterogeneidade desses pacientes e a falta de marcadores específicos, atualmente o tratamento baseia-se em análises clínicas e laboratoriais. A busca por 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. Objetivos: Avaliar a expressão do receptor tirosina quinase AXL através da técnica de imuno-histoquímica em 64 pacientes com carcinoma de células renais metastático tratados com sunitinibe no Hospital de Câncer de

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



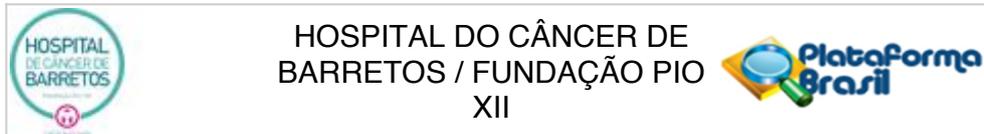
Continuação do Parecer: 2.787.173

Barretos, e correlacionar o perfil de expressão com as características clínico-patológicas e resposta terapêutica ao uso desta medicação. Também pretendemos avaliar a expressão gênica diferencial de um painel de 770 genes pela técnica de nanoString em 104 pacientes com carcinoma renal de células claras que receberam tratamento com sunitinibe como primeira linha e sua associação com prognóstico dos pacientes. Metodologia: Determinar o perfil epidemiológico e características clínicas e 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 tirosina quinase AXL, tanto sua forma total quanto fosforilada dos casos; 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; avaliar os níveis de expressão de 770 genes relacionados ao perfil imunológico associado ao câncer e sua relação com prognóstico e outros dados clínico-patológicos de pacientes com carcinoma renal de células claras tratados com sunitinibe como primeira linha.

INTRODUÇÃO:

O paciente com carcinoma de células renais metastático são heterogêneos e atualmente numerosas terapias sistêmicas estão no mercado, porém ainda não temos nenhum biomarcador que nos ajude a traçar a melhor abordagem para um tipo de paciente⁵⁸. Biomarcador é qualquer indicador que possa ser usado para identificar alguma característica de certa doença ou de seu tratamento. O contexto específico onde um biomarcador pode influenciar uma decisão médica inclui⁵⁸: 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 quer dizer que o paciente tenha se beneficiado do tratamento). Numerosos marcadores tumorais moleculares estão sendo analisados e investigados, como anidrase carbônica IX, fator de crescimento endotelial, fator indutor de hipóxia, Ki67, p53, PTEN, entre outros⁵⁸. 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, e muitos outros. Sem esses testes disponíveis, a histologia e a

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: 2.787.173

estratificação de risco pelos nomogramas de Motzer e mais recentemente pelo nomograma de Heng, aprovado com base no uso de terapia alvo molecular, são essenciais para individualização do tratamento, porém são testes inespecíficos que se baseiam em análises retrospectivas. A identificação de um biomarcador tanto para prognóstico ou predição de resposta se faz necessário para melhor identificarmos e individualizarmos a terapia para o paciente com carcinoma de células renais metastático.

HIPÓTESE:

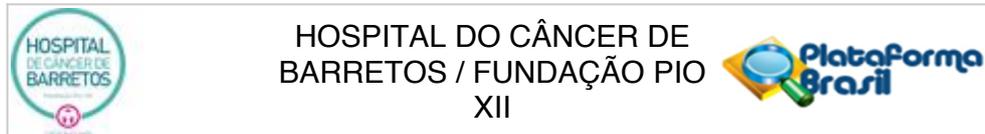
- 1) H0 - Os desfechos clínicos estudados em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos em uso de sunitinibe são iguais entre aqueles que expressam e os que não expressam AXL. H1 - Os desfechos clínicos estudados em pacientes com carcinoma de células renais metastáticos em uso de sunitinibe são diferentes entre aqueles que expressam e os que não expressam AXL.
- 2) Identificação de novos biomarcadores preditores de resposta ao tratamento com sunitinibe e prognóstico

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO:

- 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 tissue microarray (TMA) dos pacientes selecionados.
- Avaliar a expressão por imuno-histoquímica do receptor tirosina-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.
- Avaliar o perfil de expressão gênica pela técnica de nanoString em pacientes com carcinoma renal de células claras metastáticos, submetidos a tratamento com sunitinibe como primeira linha.
- Correlacionar os dados de expressão gênica com características clínico-patológicas e prognóstico

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: 2.787.173

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS:

Trata-se de um estudo retrospectivo, observacional, com uso de amostras biológicas já armazenadas, que não envolve aconselhamento genético ou mudança na conduta clínica dos participantes. Assim, o principal risco está relacionado à quebra accidental de sigilo, mas no entanto, a equipe do estudo se compromete em adotar medidas para evitar que a quebra de sigilo ocorra.

BENEFÍCIOS:

O estudo não deve trazer benefícios diretos aos seus participantes, mas gerar conhecimentos que trarão benefícios futuros a outras pessoas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente submissão trata-se de E2 ao projeto para aprovação dos seguintes documentos:

- FolhaRosto_assinada.pdf;
- Projeto_Emenda2.pdf;
- CienciaEstudo_assinada.pdf;
- ResponsabilidadePesquisador_assinada.pdf;
- Mabin_assinado.pdf;
- CadastroNAP_assinado.pdf;
- FormularioEmenda_assinada.pdf;
- FonteFinanciamento_assinada.pdf;
- Zucca_et_al_2018.pdf;
- FormularioEmenda.docx;
- PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1130546_E2.pdf

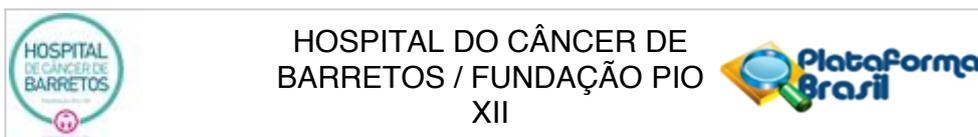
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram adequadamente apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem óbices éticos.

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: 2.787.173

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos analisou o(s) seguinte(s) documento(s) do projeto 837/2014, e:

- Aprovou a emenda ao estudo, submetida em 22/06/2018;

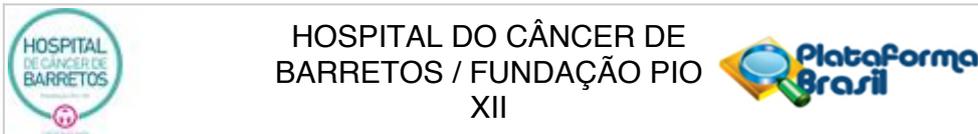
Após análise do(s) documento(s) supracitado(s), o Comitê faz a seguinte recomendação:

- (x) O Estudo deve Continuar;
- () O Estudo dever ser Interrompido;
- () O Estudo está Finalizado;
- () Solicita-se Esclarecimento;

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1130546_E2.pdf	22/06/2018 09:55:04		Aceito
Outros	FormularioEmenda.docx	22/06/2018 09:52:56	Ana Carolina Laus	Aceito
Outros	Zucca_et_al_2018.pdf	14/06/2018 15:03:38	Ana Carolina Laus	Aceito
Outros	FormularioEmenda_assinada.pdf	14/06/2018 15:03:13	Ana Carolina Laus	Aceito
Outros	FonteFinanciamento_assinada.pdf	14/06/2018 15:02:17	Ana Carolina Laus	Aceito
Outros	CadastroNAP_assinado.pdf	14/06/2018 15:01:22	Ana Carolina Laus	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Mabin_assinado.pdf	14/06/2018 15:00:58	Ana Carolina Laus	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ResponsabilidadePesquisador_assinada.pdf	14/06/2018 15:00:34	Ana Carolina Laus	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CienciaEstudo_assinada.pdf	14/06/2018 15:00:03	Ana Carolina Laus	Aceito

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

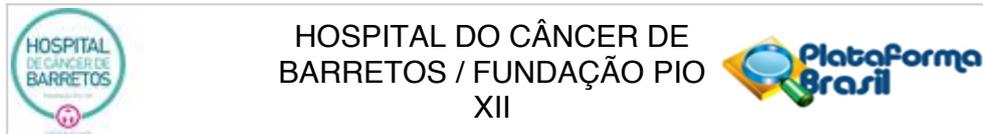


HOSPITAL DO CÂNCER DE
BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO
XII

Continuação do Parecer: 2.787.173

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Emenda2.pdf	14/06/2018 14:58:44	Ana Carolina Laus	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto_assinada.pdf	14/06/2018 14:57:35	Ana Carolina Laus	Aceito
Outros	Formulário para Emenda julho.2015.pdf	07/08/2015 09:42:01		Aceito
Outros	mabin eduardo zucca ago.2015 2:2.pdf	07/08/2015 09:40:29		Aceito
Outros	mabin eduardo zucca ago.2015 1:2.pdf	07/08/2015 09:39:57		Aceito
Outros	Projeto modificado com emenda julho.2015.pdf	30/07/2015 11:26:57		Aceito
Outros	Formulário para Emenda julho.2015.docx	30/07/2015 11:24:34		Aceito
Envio de Relatório Parcial	Relatório de Estudo Semestral - CEP AXL.pdf	19/05/2015 15:50:53		Aceito
Outros	Carta de Resposta Pendências - Eduardo Zucca.pdf	20/09/2014 15:26:31		Aceito
Outros	carta de resposta ao cep.docx	20/09/2014 15:25:57		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Mestrado AXL 05.09.2014.FINAL.pdf	05/09/2014 11:42:27		Aceito
Outros	declaracao assegurando a manutencao do material residual.pdf	05/09/2014 11:41:17		Aceito
Outros	Declaracao Rui PAIP.pdf	05/09/2014 11:40:50		Aceito
Outros	declaração de ciencia e autorização de estudo - CEPOM.pdf	28/07/2014 15:41:08		Aceito
Outros	declaração de ciencia departamento de patologia.pdf	28/07/2014 15:40:34		Aceito
Outros	Formulário MABIN - Dr. Eduardo Zucca.pdf	28/07/2014 15:39:53		Aceito
Outros	cadastro projeto de pesquisa - nap.pdf	28/07/2014 15:39:35		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Declaracao de isencao do TCLE 2:2.jpeg.pdf	21/07/2014 21:27:47		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Declaracao de isencao do TCLE.jpeg.pdf	21/07/2014 21:26:28		Aceito
Outros	Declaracao de Potencial Conflito de Interesse 1.jpeg.pdf	17/07/2014 16:06:29		Aceito
Outros	Declaracao de fonte de	17/07/2014		Aceito

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



HOSPITAL DO CÂNCER DE
BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO
XII

Continuação do Parecer: 2.787.173

Outros	Financiamento.jpeg.pdf	16:05:19		Aceito
Outros	Declaracao de compromisso do pesquisardo com a fundacao .jpeg.pdf	17/07/2014 16:04:52		Aceito
Outros	Declaracao de ciencia e autorizacao do estudo 2.jpeg.pdf	17/07/2014 16:04:23		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BARRETOS, 26 de Julho de 2018

Assinado por:
Thiago Buosi Silva
(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

Anexo F – Documento comprobatório da situação do artigo científico.



Instituto de Ensino e Pesquisa

Pós-graduação

Carta de Intenção

De acordo com as normas do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos, o parágrafo 3º, do artigo 26 prevê que *“Para depósito da Dissertação de Mestrado, o aluno deverá ter previamente **submetido** artigo científico derivado do seu projeto, em revista Qualis B1 ou superior (área de avaliação MEDICINA I). Para depósito da Tese de Doutorado o aluno deverá ter previamente artigo científico **aceito para publicação** em revista Qualis B1 ou superior (área de avaliação MEDICINA I).”*

Como o artigo científico não foi apresentado no momento do depósito do exemplar, através do presente documento, aluno e orientador comprometem-se fazê-lo no prazo máximo de 90 (noventa) dias a partir da data da defesa. Para tanto, deverão encaminhar ao Conselho de Pós-Graduação deste Programa, uma cópia do artigo submetido e o respectivo comprovante de submissão ao periódico.

Barretos, 28 de dezembro de 2020.

André Octávio Nicolau Sanches

Rui Manuel Vieira Reis