

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

DANIEL D'OLIVEIRA SILVA

**“Avaliação da concentração sérica do Fator Tecidual como
biomarcador no Carcinoma de Células Claras de Rim.”**

PORTO ALEGRE

2017

DANIEL D'OLIVEIRA SILVA

“Avaliação da concentração sérica do Fator Tecidual como biomarcador no Carcinoma de Células Claras de Rim. ”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como exame para a obtenção do grau de Doutor em Medicina e Ciências da Saúde - Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal

Co-orientador: Prof^ª. Dra. Bartira Ercília Pinheiro da Costa

PORTO ALEGRE

2017

Ficha Catalográfica

S586a Silva, Daniel D Oliveira

Avaliação da concentração sérica do Fator Tecidual como biomarcador no
Carcinoma de Células Claras de Rim / Daniel D Oliveira Silva . – 2017.
87 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da
Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal.

Co-orientadora: Profa. Dra. Bartira Ercília Pinheiro da Costa.

1. Neoplasia Renal. 2. Tromboplastina. 3. Prognóstico. 4. Biomarcador. I.
Carvalhal, Gustavo Franco. II. Pinheiro da Costa, Bartira Ercília. III. Título.

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

AGRADECIMENTOS

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

À Dra Bartira E.Pinheiro da Costa, minha co-orientadora, esteve sempre presente em todos momentos e trouxe a tranquilidade necessária nos momentos mais difíceis ao longo do doutoramento. Certamente nossos objetivos foram alcançados em razão de sua incansável busca pela perfeição.

Ao Dr Pedro C.Zandona aluno da FAMED, bolsista CNPQ que foi extremamente importante na coleta das amostras e seleção dos pacientes desde o início do projeto. Aos demais bolsistas CNPQ que nos auxiliaram ao longo do tempo também meu agradecimento.

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

À minha esposa Maíra por seu amor, companheirismo e incentivo, esteve sempre presente com sua inteligência e sensibilidade feminina, reconduzindo-me ao caminho correto quando predominavam as incertezas.

Às minhas filhas Sofia e Joana, as mais belas flores do meu jardim, tiveram que compreender minhas ausências neste período, mas nem por isso deixaram de expressar uma alegria contagiante que me fez seguir em frente.

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

À PUCRS e Hospital São Lucas onde fiz toda minha formação profissional desde a graduação, especialização, mestrado e agora o doutorado.

A auxiliar do laboratório Julia Gabriela Motta e todos colegas do Instituto Pesquisas Biomédicas da PUCRS que muito me auxiliaram na realização deste trabalho nas coletas, estocagem e testagem das amostras armazenadas no laboratório.

Aos colegas do serviço de Urologia da PUCRS e residentes da Urologia da PUCRS pela parceria e auxílio na coleta e seleção dos pacientes ao longo destes quatro anos.

DEDICATÓRIA

A todos aqueles que dedicam sua vida, seu trabalho e suas pesquisas com o objetivo de aliviar de alguma forma o sofrimento do próximo.

RESUMO

O câncer renal é uma das neoplasias malignas mais letais. As taxas de mortalidade têm crescido mundialmente a despeito da evolução do diagnóstico precoce e do surgimento de novos fármacos ativos na terapia da doença sistêmica. Atualmente, para se estabelecer riscos de morbimortalidade em câncer renal os pacientes são classificados de acordo com escalas e nomogramas, que ainda não conseguem prever com grande acurácia a evolução clínica dos mesmos. Nosso estudo foi realizado com o objetivo de determinar a utilidade da dosagem do Fator Tecidual (FT) no soro como potencial marcador para pacientes com Carcinoma de Células Claras de Rim (CCCr). Realizamos um estudo prospectivo com 30 pacientes com CCCr submetidos à nefrectomia e 16 controles sem CCCr tratados cirurgicamente para outras condições. O FT sérico foi coletado na sala cirúrgica antes do procedimento e no pós-operatório após pelo menos quatro semanas. Os níveis séricos detectados no pré-operatório foram três vezes mais altos em pacientes com CCCr do que nos controles, e diminuíram em todos os pacientes com CCCr no pós-operatório, com uma redução média de 41,6 pg/ml ($p < 0,001$). Nossos achados sugerem que o FT pode ser utilizado como um marcador sérico para a presença de CCCr.

PALAVRAS-CHAVE: neoplasia renal, tromboplastina, prognóstico, biomarcadores.

ABSTRACT

Purpose: to determine the usefulness of serum TF as a potential marker for patients with clear cell RCC.

Materials and Methods: prospective study of 30 patients with clear cell RCC submitted to nephrectomy and 16 controls without clear cell RCC treated surgically for other conditions. TF is an endothelium marker that was correlated with worse prognosis in a variety of solid tumors including RCC. Serum TF was collected before surgery at the operating room and in the postoperative setting after at least four weeks. Serum samples were analyzed with a commercial ELISA kit for human TF (R&D Systems®).

Results: Mean preoperative serum TF levels in clear cell RCC patients and in controls were 66.8 pg/dl and 28.4 pg/dl, respectively ($p < 0.001$). Mean postoperative serum TF levels in clear cell RCC patients were 26.3 pg/dl. In all patients with clear cell RCC postoperative serum levels of TF were lower, with a mean reduction of 41.6 pg/dl in the postoperative setting ($p < 0.001$). Linear regression revealed that tumor size was correlated with the postoperative reduction of serum TF levels ($p = 0.037$).

Conclusions: We have shown a 3-fold reduction in the median preoperative serum levels of TF in patients with clear cell RCC after surgery. We have also shown a difference of the same magnitude in the serum levels of TF compared with those of a control group of patients with benign diseases. TF appears to be a useful serum marker for the presence of clear cell RCC. Further studies are needed to validate these findings.

Lista de Ilustrações e Figuras

Quadro 1 – Risco de desenvolver tumores malignos nos EUA entre 2010-2012, conforme Siegel et al CA Cancer J Clin 2016; 66:7-30.....	14
Quadro 2 - Principais tipos histológicos do CCR e suas características. Modificado de Ferreira, U: Câncer de Rim. Urologia Fundamental. 2010.	19
Figura 1 – Esquema da via m-TOR e seus alvos terapêuticos, modificada de Rini et al: Renal Cell Carcinoma. Lancet 2009;373:1119-32.....	25
Quadro 3 – Descrição do sistema TNM modificado de Edge et al., 2010.	27
Figura 2 - Papel do FT na coagulação sanguínea. Modificado de Versteeg e colaboradores em Molecular Medicine 2004; 10: 7.	33
Figura 3 - Sinalização intracelular FT-FVIIa-PAR2 para promover modificações celulares através do aumento de síntese de fatores pro-angiogênicos.....	36
Figura 4 - Esquematização da função do FT na produção de metástases, crescimento tumoral e angiogênese.....	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AsTF	Do Inglês, Alternative splice Tissue Factor
CTGF	Do Inglês, Connective Tissue Growth Factor (Fator de Crescimento Derivado do Tecido Conjuntivo)
CXCL1	Do Inglês, Chemokine (CXC motif) Ligand 1
Cyr61	Do Inglês, Cysteine Rich, Angiogenic Inducer 61, Indutor Angiogênico da Cisteína
cMET	Do Inglês, MET ou MNNG HOS Transforming gene, proto oncogene
CCR	Carcinoma de Células Renais
CCCr	Carcinoma de Células Claras Renais
ENCARE	Estudo Nacional do Câncer Renal
ELISA	Do Inglês, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FT ou TF	Fator Tecidual ou Tissue Factor
HIF	Fator Indutor de Hipóxia
IHQ	Imuno-Histoquímica
IL1 β	Interleucina 1, Beta
IL6 e IL8	Interleucina 6 e 8
IMP3	Do Inglês, U3 Small Nucleolar Ribonucleoprotein, Homolog (Yeast)
Ki67	Antígeno Nuclear 67
Kras	Do Inglês, Ki Ras2 Kirsten Rats Sarcoma Oncogene Oncogene
MAPK	Do Inglês, Mitogen Activated Protein Kinase, Proteína quinase Ativada por Mitógeno
PAR	Do Inglês, Protease Activated Receptor
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI3	Do Inglês, Kinase Peptidase Inhibitor 3
p53	Do Inglês, Tumor Protein p53, Gene Supressor Tumoral
SEER	Do Inglês, Surveillance Epidemiology and End Results
SSIGN	Do Inglês, Stage, Sign, Grade and Necrosis
TFPI	Inibidor da via do fator Fator Tecidual (do Inglês, Tissue Factor Pathway Inhibitor)
TNM	Do Inglês, Tumor, Linfonodo, Metástase
TNF α	Do Inglês, Fator de Necrose Tumoral α
TSK	Do Inglês Tight Skin Mutation
TF A	Fator Tecidual A
UCLA	Universidade da Califórnia, Los Angeles
VEGF	Fator Endotelial de Crescimento Vascular
VHL	Von Hippel Lindau, Gene

SUMÁRIO

Referencial Teórico	11
Aspectos Históricos das Neoplasias Renais	11
Aspectos Relevantes das Neoplasias Renais.....	11
O Fator Tecidual e sua relação com neoplasias.....	31
Objetivos	43
Objetivo Geral.....	43
Objetivos Específicos	43
Pacientes e Métodos.....	44
Análise Estatística	46
Resultados	48
Discussão.....	69
Conclusões	72
Bibliografia.....	73
Apêndice 1	84
Apêndice 2	85
Anexo 1	86
Anexo 2	88

Referencial Teórico

Aspectos Históricos das Neoplasias Renais

A primeira referência feita aos tumores renais foi de Daniel Sennert em 1613 no seu livro *Practicae Medicinae*. Relatava casos de lesões renais endurecidas levando os pacientes à caquexia e morte. Todavia, o relato inequívoco de câncer renal foi feito por Miril em 1810. Consistia de uma paciente de 35 anos que chegou ao Brest Civic Hospital em 1809 com quadro presumível de gravidez já avançada, porém tratava-se de um carcinoma renal. König em 1826 descreveu a primeira classificação dos tumores renais. Nela o autor dividiu os carcinomas renais em formas fúngicas, cirróticas, estomatosas e medulares. Somente em 1959 é que Oberling, após longo estudo da citologia dos tumores renais, estabeleceu como origem da neoplasia renal as células dos túbulos contorcidos. A classificação atual utilizada segue os parâmetros definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2004. (Delahunt, 2005)

Aspectos Relevantes das Neoplasias Renais

Definição e Epidemiologia

Os rins são órgãos complexos compostos por diferentes tecidos embriológicos. Exercem funções como secreção, excreção e regulação essenciais à fisiologia corporal. Apresentando uma enorme complexidade anatomo-fisiológica, e sendo de incidência reduzida comparativamente aos tumores de próstata e de mama, é por vezes difícil caracterizar os principais tumores que acometem os rins.

Os tumores renais são divididos inicialmente em dois grandes subgrupos: Carcinoma de Células Renais (CCR) e o Carcinoma de Células Transicionais (CCT) presentes no urotélio de tumores da pelve renal. Os CCR são responsáveis por aproximadamente 85% de todos os tumores renais, ao passo que 10-15% são reconhecidos como CCT. Em crianças, cabe ressaltar também a presença do Tumor de Willms, responsável por menos de 5% dos tumores renais. Desde 1986 uma subclassificação é aplicada aos CCR. Eles são subdivididos em cinco subtipos de acordo com critérios morfológicos, histoquímicos e de microscopia eletrônica: células claras, papilar, cromófbos, originários nos ductos coletores e não-classificados (Motzer *et al.*, 1996). Os mais comuns são os CCCr (80%) e os tumores papilares (10%), ficando os cromófbos com 5%, os tumores de ductos coletores em apenas 1%, e os tumores não classificáveis com 4-6% (Deng e Melamed, 2012). Devido à grande representatividade dos CCCr na população mundial, este será o objeto de estudo do presente projeto.

Dados Epidemiológicos

Mundialmente os CCR correspondem ao nono tipo de câncer mais comum, com 337.860 casos diagnosticados em 2012 (Ferlay *et al.*, 2015). Para 2016 a previsão é de 62.700 novos casos nos Estados Unidos da América (EUA) com 14.240 mortes esperadas atribuídas ao câncer renal (Siegel *et al.*, 2015). Na Europa, a OMS estimou 121.629 novos casos ocorridos em 2012, dos quais 75.676 afetaram homens. Dados de mortalidade por câncer de 2012 relatam 143.000 mortes ocorrendo no mundo, sendo 91.000 em homens e 52.000 em mulheres, atingindo o 16º lugar como causa mais comum de mortalidade.

Dados brasileiros sobre incidência dos tumores renais são escassos. Atualmente estes tumores sequer fazem parte da estatística do Instituto Nacional do

Câncer (INCA) com as incidências esperadas para 2016-17. O estudo realizado pela Sociedade Brasileira de Urologia denominado ENCARE coletou dados durante o período de maio de 2007 a maio de 2008 levantando o número de 508 casos (Nardi *et al.*, 2010). Dados da incidência no Brasil podem estar com os números defasados, pois o levantamento é de 2002 registrando 7-10 casos a cada 100.000 habitantes (Wünsch-Filho, 2002). Em termos de comparação, os dados americanos indicam a chance de desenvolver a neoplasia por faixa etária. A chance maior, por exemplo, está associada aos pacientes do sexo masculino com mais de 70 anos, que tem 1,3% de chance ou 1 em cada 76 americanos. A chance de desenvolver tumores renais desde o nascimento até a morte é de 2% para homens (1 em cada 49) e 1.2% para mulheres (1 em cada 83). O Quadro 1 apresenta a probabilidade de desenvolvimento de tumores malignos por faixa etária nos EUA no período entre 2010 e 2012. Em destaque os valores para neoplasias renais.

Quadro 1 – Risco de desenvolver tumores malignos nos EUA entre 2010-2012, conforme Siegel et al CA Cancer J Clin 2016; 66:7-30.

		BIRTH TO 49	50 TO 59	60 TO 69	≥70	BIRTH TO DEATH
All sites†	Male	3.4 (1 in 29)	6.5 (1 in 15)	14.5 (1 in 7)	34.6 (1 in 3)	42.1 (1 in 2)
	Female	5.4 (1 in 19)	6.0 (1 in 17)	10.0 (1 in 10)	26.1 (1 in 4)	37.6 (1 in 3)
Breast	Female	1.9 (1 in 53)	2.3 (1 in 44)	3.5 (1 in 29)	6.7 (1 in 15)	12.3 (1 in 8)
Colorectum	Male	0.3 (1 in 300)	0.7 (1 in 149)	1.2 (1 in 82)	3.7 (1 in 27)	4.7 (1 in 21)
	Female	0.3 (1 in 318)	0.5 (1 in 195)	0.9 (1 in 117)	3.4 (1 in 30)	4.4 (1 in 23)
Kidney & renal pelvis	Male	0.2 (1 in 467)	0.3 (1 in 295)	0.6 (1 in 158)	1.3 (1 in 76)	2.0 (1 in 49)
	Female	0.1 (1 in 748)	0.2 (1 in 576)	0.3 (1 in 317)	0.7 (1 in 136)	1.2 (1 in 83)
Leukemia	Male	0.2 (1 in 415)	0.2 (1 in 591)	0.4 (1 in 261)	1.4 (1 in 72)	1.8 (1 in 57)
	Female	0.2 (1 in 508)	0.1 (1 in 939)	0.2 (1 in 458)	0.9 (1 in 115)	1.2 (1 in 82)
Lung & bronchus	Male	0.2 (1 in 608)	0.7 (1 in 145)	2.0 (1 in 51)	6.4 (1 in 16)	7.2 (1 in 14)
	Female	0.2 (1 in 572)	0.6 (1 in 177)	1.5 (1 in 67)	4.8 (1 in 21)	6.0 (1 in 17)
Melanoma of the skin‡	Male	0.3 (1 in 297)	0.4 (1 in 238)	0.8 (1 in 127)	2.2 (1 in 45)	3.0 (1 in 33)
	Female	0.5 (1 in 206)	0.3 (1 in 321)	0.4 (1 in 242)	0.9 (1 in 107)	1.9 (1 in 52)
Non-Hodgkin lymphoma	Male	0.3 (1 in 376)	0.3 (1 in 347)	0.6 (1 in 174)	1.8 (1 in 55)	2.4 (1 in 42)
	Female	0.2 (1 in 546)	0.2 (1 in 477)	0.4 (1 in 237)	1.4 (1 in 73)	1.9 (1 in 53)
Prostate	Male	0.3 (1 in 325)	2.1 (1 in 48)	5.8 (1 in 17)	10.0 (1 in 10)	14.0 (1 in 7)
Thyroid	Male	0.2 (1 in 560)	0.1 (1 in 821)	0.2 (1 in 635)	0.2 (1 in 451)	0.6 (1 in 169)
	Female	0.8 (1 in 131)	0.4 (1 in 281)	0.3 (1 in 306)	0.4 (1 in 258)	1.7 (1 in 58)
Uterine cervix	Female	0.3 (1 in 364)	0.1 (1 in 850)	0.1 (1 in 871)	0.2 (1 in 576)	0.6 (1 in 157)
Uterine corpus	Female	0.3 (1 in 355)	0.6 (1 in 170)	0.9 (1 in 107)	1.3 (1 in 76)	2.8 (1 in 36)

*For people free of cancer at beginning of age interval.

†All sites excludes basal cell and squamous cell skin cancers and in situ cancers except urinary bladder.

‡Probabilities are for whites.

Acerca destas informações, podemos estabelecer que a população masculina é a mais afetada com um risco 2 vezes maior de adquirir a neoplasia. Também a faixa etária mais comum é a de pacientes com mais de 70 anos, principalmente entre 70 e 75 anos. Com relação à raça, o CCR se apresenta mais comumente nos pacientes de raça branca, com risco menor em africanos e asiáticos (Ljungberg *et al.*, 2011).

As incidências mundiais destes tumores têm crescido há pelo menos 10 anos, principalmente em países desenvolvidos; sempre mantendo uma taxa estável. Quando avaliamos país por país a mais alta taxa de incidência ocorre na República Tcheca, com 22 novos casos a cada 100.000 habitantes. As taxas na Europa oriental também são elevadas (15/100.000). A América do Norte e Austrália apresentam taxas intermediárias com >9/100.000. Taxas baixas são observadas na maioria dos países africanos e na Ásia (1/100.000) (Znaor *et al.*, 2015).

Com relação à mortalidade, os dados refletem uma desigualdade social. As taxas de mortalidade vêm diminuindo progressivamente nos países desenvolvidos desde os anos 1990, principalmente quando comparamos o Leste com o Oeste europeu, e a América do Norte com a América Central e do Sul. As taxas persistem elevadas nas Américas do Sul e Central e no leste europeu talvez na dificuldade de acesso ao sistema público de saúde, bem como a falta de disponibilidade das terapias de órgão-alvo nestes sistemas públicos (Znaor *et al.*, 2015).

Etiologia, Fatores de Risco e Síndromes Hereditárias

O CCR tem origem no epitélio do túbulo contorcido proximal. A maioria dos casos são esporádicos, com apenas 2-3% ditos familiares (Gonzalvo *et al.*, 2004). As causas dos tumores renais ainda não são completamente entendidas, mas determinados fatores como obesidade, tabagismo, diabetes e hipertensão (HAS) são fatores de risco importantes.

O tabagismo é um fator de risco estabelecido para CCR. Uma metanálise publicada em 2011 incluindo 19 estudos de caso-controle e cinco (5) estudos de coorte confirmou esse achado. A associação, porém, é fraca e causa aumento de 1,5 a 2 vezes no risco de desenvolver CCR para quem fuma mais de 20 cigarros/dia (Hunt *et al.*, 2005). A

cessação do tabagismo diminui significativamente o risco de desenvolver CCR após dezanos de suspensão. Pacientes que reduzem por período menor que dez anos, o risco só diminuiu em homens de 1,75(1,41-2,18) para 1,21(0,86-1,7).

A obesidade tem sido descrita como fator de risco na maioria dos estudos de coorte e de caso-controle. Uma metanálise mostrou que a cada 5kg/m² de aumento no Índice de Massa Corporal (IMC) aumenta de 1,24 vezes nos homens e 1,34 nas mulheres a chance de desenvolver CCR (Renehan *et al.*, 2008).

Dados americanos mostram uma taxa de obesos (IMC>30) em torno de 15% na década de 80. Atualmente são aproximadamente 33% de obesos nos EUA. Este aumento importante no número de obesos, de certo modo, contrapõe a tendência de se afirmar que o aumento da incidência dos tumores renais foi ocasionado apenas pelo maior número de exames realizados. O motivo pelo qual a obesidade causa CCR ainda não está bem estabelecido. Especulam-se alguns marcadores inflamatórios e de crescimento tumoral como TNF- α (do Inglês: Tumoral Growth Factor alpha) e o IGF-1 (do Inglês: Insulin Growth Factor-1) (Calle e Kaaks, 2004).

Diversos estudos de coorte e prospectivos vêm relacionando a HAS e/ou seu tratamento com CCR. Em metanálise incluindo 13 estudos longitudinais e caso controle foi demonstrada associação positiva entre HAS e CCR. A razão de chances agrupada neste estudo foi de 1,75(95% IC-1,6-1,9) (Grossmann *et al.*, 2002). O aumento na taxa de incidência de HAS nos EUA ajuda a explicar o concomitante aumento da incidência de CCR em algumas comunidades negras onde as taxas de HAS são elevadas. (Decastro e Mckiernan, 2008).

O diabetes mellitus também é fator de risco com representação demonstrada recentemente por relevantes estudos. Metanálise de nove estudos de coorte mostrou que os pacientes com diabetes apresentavam risco elevado de desenvolver tumores renais

(Larsson e Wolk, 2011). Também em metanálise de 18 estudos, foi concluído que o diagnóstico de diabetes está associado a pior prognóstico em pacientes com CCR. A presença de glicemia elevada traz prejuízos na sobrevida global e câncer específica (Chen *et al.*, 2015).

O tumor renal não é uma doença clássica de exposição ocupacional, porém alguns carcinógenos têm sido associados ao risco de desenvolver CCR. O solvente Tricloroetileno (TCE) usado na indústria metalúrgica está associado ao aumento na incidência de tumores, principalmente nos países da Europa Oriental. Dados sugerem um aumento de 1,6 vezes mais chance nesses trabalhadores (Mundt *et al.*, 2003).

Algumas síndromes genéticas são responsáveis pelo surgimento do CCR em cerca de 2-3% dos casos. O risco de surgimento de CCR num familiar de primeiro grau de portador de CCR é duas vezes maior (Lipworth *et al.*, 2006). A mutação genética mais comum no CCR ocorre no gene Von Hippel Lindau (VHL) localizado no braço curto do cromossomo 3. Ela ocorre em 1 a cada 36.000 nascimentos nos EUA, codifica uma proteína que é responsável pela estabilização dos fatores indutores de hipóxia (HIF). Com o gene mutado, não ocorre a estabilização e há o conseqüentemente aumento dos HIFs. Estes levam a um aumento generalizado de fatores de crescimento vasculares como o VEGF (do Inglês: Vascular Endothelial Growth Factor) que induz aumento da angiogênese e crescimento tumoral (Pfaffenroth e Linehan, 2008).

A ativação do proto-oncogene chamado c-MET, por mutação, o qual codifica um fator de crescimento pode levar ao desenvolvimento da síndrome carcinoma de células papilares hereditárias ou CCR papilar Tipo1. Já a mutação no gene que codifica a proteína fumarato-hidratase leva ao desenvolvimento da leiomiomatose familiar que consiste no surgimento de tumores uterinos-miomas em idade precoce, leiomiomas cutâneos e está relacionada aos carcinomas papilares tipo II com grande tendência a

agressividade.(Ljungberg *et al.*, 2011).

Por último, temos a síndrome de Birt-Hogg Dube, caracterizada por pacientes com fibrofoliculomas cutâneos, cistos pulmonares, pneumotórax espontâneo e uma variedade de tumores renais incluindo CCR cromóforos, oncocitomas e tumores renais híbridos. A mutação está no gene supressor tumoral foliculina (Hansel e Rini, 2008).

Aspectos histopatológicos

A classificação atual dos tumores renais é determinada pela OMS e segue basicamente os mesmos princípios de Heidelberg e Rochester (Deng e Melamed, 2012). Ela reconhece a heterogeneidade dos tumores e descreve os diversos subtipos de tumores com características morfológicas e genéticas únicas. Estudos clínicos comprovam esta teoria. Assim, o CCR não pode ser considerado uma doença única. Cada um dos seus subtipos tem características histopatológicas e respostas terapêuticas também diferentes. Os principais tipos histológicos que englobam cerca de 90-95% dos CCR são os seguintes: carcinoma renal tipo células claras, papilar, cromofobo e de ductos coletores. Outros tumores mais raros compondo o restante (5%) são o carcinoma medular, o carcinoma transacional Xp11 e os tumores não classificáveis. O Quadro 2 apresenta os principais tipos histológicos de CCR, sua frequência e seus desfechos comparativos.

Quadro 2 - Principais tipos histológicos do CCR e suas características. Modificado de Ferreira, U: Câncer de Rim. Urologia Fundamental. 2010.

Tipo tumoral	Frequência	Prognóstico
Clássico (células claras)	70 a 80%	Intermediário
Papilífero (cromófilo)	10 a 15%	Favorável intermediário
Cromófobo	3 a 5%	Favorável
Ducto coletor (Bellini)	1%	Desfavorável
Não classificado	1%	Desfavorável

A grande maioria dos tumores são CCCr, dessa forma um comparativo entre os subtipos histológicos correlacionando fatores prognósticos específicos de cada subtipo não é adequado pelo reduzido número de pacientes nos estudos com outros tipos de tumores.

O CCCr se caracteriza por células contendo um citoplasma mais claro associado a uma delicada rede vascular (Grignon e Che, 2005). Na aparência macroscópica geralmente são tumores sólidos com cor amarelo-dourada. A alteração genética mais comum é baseada em duas vias moleculares: a perda ou mutação do gene supressor tumoral VHL e a via sinalizadora com alvo nos receptores mamíferos de rapamicina (mTOR). Ela ocorre em cerca de 60-90% dos casos esporádicos (Kaelin, 2007). Como dito anteriormente, sua perda/mutação acarreta a diminuição, ou até mesmo a suspensão da produção de uma proteína responsável pela estabilização e

eliminação dos HIFs, que determinam uma aceleração na produção de fatores de transcrição de genes relacionados ao crescimento tumoral e angiogênese como o VEGF, o PGF (do Inglês: Platelet Growth Factor) e o TGF- α . Os pacientes que apresentam a Síndrome VHL são acometidos por tumores renais, bilaterais e múltiplos, além de hemangioblastomas cerebelares e da medula espinhal, angiomas de retina e feocromocitomas (Pfaffenroth e Linehan, 2008).

Outros eventos genéticos associados ao surgimento do CCCr incluem mutações em genes responsáveis pela remodelação da cromatina como o PBRM1 o BAP1 e o SETD2, além de uma variedade de mutações em genes modificadores de histonas como o KDM5 α , ARID1 α e UTX (Jonasch *et al.*, 2014). O cromossomo 3 é a sede da maior parte dos genes mutados com aproximadamente 91% das amostras tendo alterações nos 4 genes mais importantes-VHL, PBM, BAP1 e SETD2 (Network, 2013).

O carcinoma papilar é o segundo tipo histológico mais comum. Ocorre em aproximadamente 10% de todos CCR e em 29% dos CCR em afro-americanos. Existe uma subdivisão dos papilares em tipo I e tipo II. O diagnóstico histopatológico é baseado na arquitetura do tumor que forma papilas, geralmente envolvidos por uma pseudocápsula que deixa o tumor bem circunscrito (Tickoo e Reuter, 2011). Duas síndromes familiares são descritas: as mutações no gene c-MET levam ao CCR multifocal papilar tipo I, já a mutação no gene fumarato-hidratase leva a uma síndrome denominada Leiomiomatose Hereditária e CCR caracterizada por leiomiomatose uterina, cutânea e tumores renais de comportamento extremamente agressivo (Toro *et al.*, 2003). Devido a certa raridade destes tumores, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos genéticos envolvidos na gênese desta síndrome.

O CCR cromóforo é o terceiro em frequência dos tumores renais, ocorrendo em cerca de 5% dos casos. Tipicamente apresenta uma aparência de tumor claro, pálido.

A maioria dos casos são lesões bem delimitadas com baixo potencial metastático (menos de 5% dos casos). A origem genética encontra-se na mutação de um gene localizado no cromossomo 17 denominada Birt-Hogg-Dubbé que também identifica a síndrome de mesmo nome. Esta síndrome é caracterizada por tumores renais bilaterais e multifocais, nódulos cutâneos, cistos pulmonares e pneumotórax espontâneo (Schmidt e Linehan, 2015).

Os carcinomas de ductos coletores são um tipo de CCR muito raro ocorrendo em menos de 2% dos casos. Baseado nos escassos casos da literatura são tumores muito agressivos em estágios geralmente avançados e com pior prognóstico.

Por último existe um subtipo denominado não-classificável, pois são tumores que não se encaixam em nenhum outro subtipo já listado. As estatísticas mostram números variáveis entre 0,7-5,7% dos casos(Deng e Melamed, 2012).

Apresentação Clínica

Nos últimos anos, com o uso rotineiro de ecografias e tomografias, houve um aumento expressivo do diagnóstico de lesões renais incidentais (descobertas por “acidente”). Atualmente 75% dos pacientes apresentam a lesão neoplásica inicial restrita ao rim sem nenhum sinal ou exame radiológico mostrando lesão metastática. Uma série dos anos 60-70 relatou que cerca de dois terços dos tumores renais são descobertos na autópsia, sendo que hoje ainda temos a detecção de 20-30% de tumores renais com metástases. O local mais comum da doença metastática é o pulmão em 60% dos casos, seguido por ossos e fígado em 40% e cérebro em menos de 5%.

Devido à múltipla variedade de sinais e sintomas presentes ao diagnóstico, o CCR também é chamado de tumor do internista. Pequenas lesões são na maioria dos casos assintomáticas, e atualmente através de exames de imagem têm sido a maneira

mais comum de diagnosticar tumor renal. Quando surgem sintomas relacionados à lesão, o diagnóstico geralmente é tardio. O sintoma mais comum é a hematúria macroscópica em 50-60% dos casos, seguido de dor abdominal em 40% e massa palpável em 40%. Esses três sinais associados recebem o nome de Tríade Clássica, que ocorre em menos de 10% dos casos (Ritchie e Chisholm, 1983). Outros sinais inespecíficos presentes: febre, sudorese noturna, fadiga e perda de peso. Já a varicocele à esquerda ocorre em menos de 2% dos casos devido à obstrução tumoral da veia gonadal na sua inserção na veia renal esquerda.

Existem também relatos de síndromes paraneoplásicas ocorrendo em 25% dos pacientes. Os sinais mais frequentes são eritrocitose, hipercalcemia, disfunção hepática (síndrome de Stauffer) e amiloidose. A causa provável é pela produção de marcadores e hormônios como a eritropoietina, o hormônio paratireóide, além de complexos auto-ímmunes (Motzer *et al.*, 1996).

Aspectos do tratamento cirúrgico do Carcinoma de Células Renais

Com a maioria dos casos sendo diagnosticados incidentalmente, o principal e mais freqüente tratamento com intenção curativa é a ressecção cirúrgica. Sem dúvida é o tratamento mais realizado e eficaz na busca da cura dos pacientes.

As lesões renais com menos de 4 cm, e em alguns casos até 7cm, tem sido motivo de muita discussão entre os urologistas sobre a melhor abordagem cirúrgica. A preservação do órgão (Nefrectomia Parcial), segundo as mais recentes diretrizes, tem sido a mais recomendada (Jonasch *et al.*, 2014). A seleção de pacientes para este tipo de abordagem tem sido estimada pela facilidade para a retirada da lesão, o estágio tumoral e outros fatores que possam impedir a cura cirúrgica. Com relação à linfadenectomia, ainda não existe consenso sobre seu real benefício. As recomendações atuais sugerem

avaliação individualizada, mas sempre que houver linfonodomegalia, sua retirada é indicada (Blomet *et al.*, 2009). A descrição inicial da nefrectomia radical feita por Robson na década de 60 consistia na retirada de todo o rim com a gordura perirrenal, fásia de Gerota e adrenal ipsilateral. Atualmente todos os princípios são realizados, seja por videolaparoscopia, robótica ou cirurgia aberta. Entretanto, a retirada da adrenal só tem sido indicada em casos de provável ou inequívoca invasão da glândula ou em tumores extensos do pólo superior, quando a preservação da adrenal não é factível (Kim *et al.*, 2012).

Tratamento sistêmico do CCR

Um a cada três pacientes apresenta metástase no momento do diagnóstico. Adicionalmente 20-40% dos pacientes tratados com doença supostamente localizada irão desenvolver lesões metastáticas e nesse estágio as chances de cura são baixíssimas. A recomendação atual para o tratamento dos tumores neste estágio sugere realizar a nefrectomia citorrredutora antes da terapia sistêmica sempre que possível. A nefrectomia citorrredutora consiste na retirada do tumor renal mesmo na presença de lesões metastáticas. Inicialmente era realizada para retirar o tumor trazendo alívio de sintomas como dor ou sangramento de maneira paliativa. Os estudos subsequentes mostraram benefício maior, como redução e, até mesmo, desaparecimento das lesões metastáticas e melhora da sobrevida global (Flanigan *et al.*, 2001).

Atualmente diversas categorias de drogas estão disponíveis para o tratamento sistêmico do CCR: imunoterapia com citocinas (IL2- Interferon), medicações que atuam na via do VEGF, os inibidores da via do m-TOR e a imunoterapia baseada nos inibidores de *checkpoints* (PD-L1).

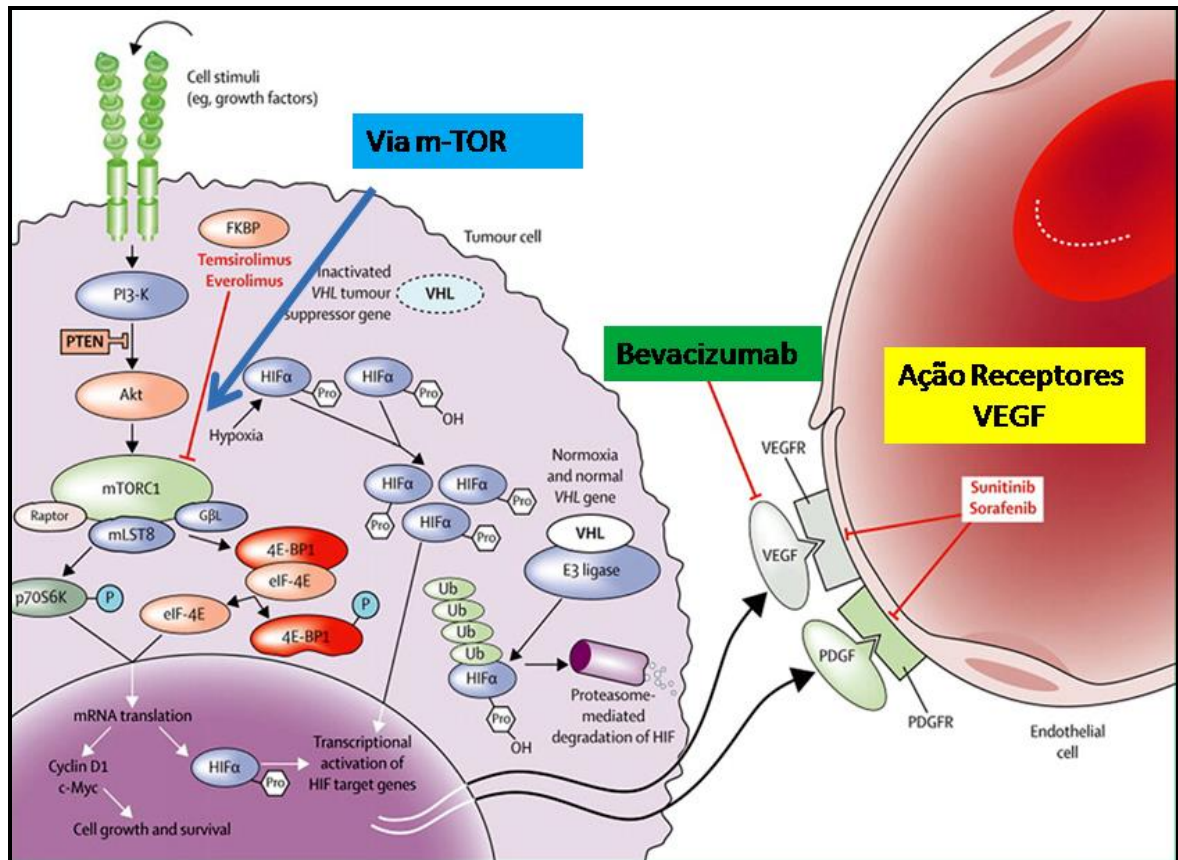
O primeiro tratamento sistêmico aprovado pelo FDA (do Inglês: Food and

Drug Administration) empregando citocinas, foi com Interleucina-2 em 1992. Um estudo de fase 2 na época mostrou taxa de resposta total (parcial + completa) de 15%, e resposta completa isolada em 5% (Fyfe *et al.*, 1995), porém às custas de uma toxicidade extrema foi impossível expandir a outros pacientes. Estudos subsequentes mostraram taxa de mortalidade relacionada à terapia de 1% (Yang *et al.*, 2003). Até hoje, nenhum estudo conseguiu selecionar adequadamente quais pacientes poderiam se beneficiar desta terapia.

Com a descoberta do gene VHL e de toda a cascata culminando na ativação da via do VEGF, várias drogas foram desenvolvidas para atuar nesta via, sendo hoje o tratamento de primeira linha para a grande maioria dos pacientes com CCR metastático. Cinco agentes estão disponíveis atualmente, quatro de uso oral (Sorafenib, Sunitinib, Pazopanib e Axitinib) e um de uso intravenoso (Bevacizumab). Destes, atualmente o Sunitinib foi o que obteve os melhores resultados e por isso nas atuais diretrizes tem sido a primeira escolha para pacientes com CCR metastático (Atkinson *et al.*, 2014).

Outra via molecular passível de tratamento sistêmico descoberta recentemente é a via do m-TOR. O Temsirolimus é atualmente o representante mais utilizado dos inibidores da via do m-TOR e é utilizado com melhores respostas nos tumores não-células claras e também em pacientes com pior prognóstico e de mais alto risco (Hudes, 2007). A Figura 1 apresenta o papel do gene VHL e os principais alvos terapêuticos relacionados aos receptores VEGF e m-TOR.

Figura 1 - Esquema da via m-TOR e seus alvos terapêuticos, modificada de Rini et al: Renal Cell Carcinoma. Lancet 2009;373:1119-32.



O tratamento mais recente e com ótimos resultados é o uso dos inibidores de receptores PD/PDL1, também chamados de inibidores de *immunecheckpoints*. O mecanismo de ação consiste no bloqueio de sinais que inativam linfócitos T, levando a morte celular do tumor. Ao se utilizar estas medicações, os linfócitos ficam livres para eliminarem as células tumorais. Os estudos mostraram boas respostas em tumores sólidos como rim, pulmão e melanoma. Os resultados recentes sugerem respostas objetivas de 18-28% nestes tumores. Especificamente em rim, a resposta foi de 27% sustentada por no mínimo um ano. Estudos de fase 3 estão ainda em andamento (Brahmer *et al.*, 2012).

Fatores Prognósticos

Com tanta variabilidade de tipos histológicos, genética dos tumores e fatores inerentes aos pacientes, estabelecer um prognóstico adequado e correto para os CCR pode ser uma tarefa quase impossível. Considerando que a grande maioria dos pacientes apresenta lesões em estágio inicial com doença restrita ao rim, por que ainda temos números que giram em torno de 30% de pacientes que irão apresentar metástases à distância? Dentre todos os sistemas de prognósticos e de estadiamento, o mais utilizado para o CCR é o conhecido acrônimo TNM da AJCC (American Joint Committee on Cancer) revisado em 2010 (Edge e Compton, 2010). Ele consiste de três componentes: T indicando o tamanho do tumor primário e a extensão da invasão, N o estado de invasão linfonodal e M a presença de metástase à distância. Os números e letras após o TNM, subcategorizam o tamanho do tumor e a extensão da doença (Edge e Compton, 2010). O Quadro 3 apresenta a descrição do sistema TNM.

Quadro 3 – Descrição do sistema TNM modificado de Edge et al.,2010.

Tumor Primário			
TX	Tumor primário não pode ser acessado.		
T0	Sem evidência de tumor.		
T1	Tumor ≤7 cm em sua maior dimensão, limitado ao rim.		
T1a	Tumor ≤4 cm em sua maior dimensão, limitado ao rim.		
T1b	Tumor >4 cm inferior à >7 cm em sua maior dimensão, limitado ao rim.		
T2	Tumor >7 cm em sua maior dimensão, limitado ao rim.		
T2a	Tumor >7 cm, mas ≤10 cm em sua maior dimensão, limitado ao rim.		
T2b	Tumor >10 cm, limitado ao rim.		
T3	Tumor com extensão para grandes vasos ou tecido perinefrético, mas sem invadir adrenal ipsilateral ou ultrapassar a fáscia de Gerota.		
T3a	Tumor com extensão grosseira para a veia renal ou ramos segmentares ou tumor invade seio renal, mas sem ultrapassar a fáscia de Gerota.		
T3b	Tumor com extensão grosseira para a veia cava abaixo do diafragma.		
T3c	Tumor com extensão grosseira para a veia cava acima do diafragma ou invade parede da veia cava.		
T4	Tumor invade além da fáscia de Gerota (incluindo extensão contígua para adrenal ipsilateral).		
Linfonodos Regionais (N)			
NX	Linfonodos Regionais não podem ser acessados.		
N0	Sem metástases em linfonodos regionais.		
N1	Metástases em linfonodos regionais.		
Metástases à distância (M)			
M0	Sem metástases à distância.		
M1	Metástases à distância.		
Estadio Anatomico			
Stage	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1 /T2	N1	M0
	T3	N0/N1	M0
IV	T4	N0,1	M0
	T1,2,3,4	N0,1	M1

Fonte: Edge et al: AJCC Cancer Staging Manual. 7th Ed. New York, NY: Springer, 2010.

Utilizando esta classificação temos que os pacientes categorizados no estágio 1 apresentam sobrevida global de cinco anos em mais de 90% dos casos. Ao passo que dos 30% de pacientes no estágio 4, menos de 5% estarão vivos em cinco anos com uma

sobrevida média de 10-15 meses (Mekhail *et al.*, 2005).

O estadiamento tumoral TNM continua sendo o melhor marcador prognóstico isolado. A crítica que se faz a este tipo de estadiamento é que num mesmo estágio a heterogeneidade dos tumores determina uma limitada capacidade de estabelecer um prognóstico mais acurado e individualizado.

Pacientes que apresentam sintomas ao diagnóstico são considerados com pior prognóstico. Os sintomas de caquexia, perda de peso, fadiga, anorexia ou redução nos escores de saúde global (ECOG) são considerados marcadores clínicos de evolução insatisfatória. Alguns exames laboratoriais simples também são marcadores de pior prognóstico, como a presença de anemia, trombocitose, hipercalcemia, elevação da fosfatase alcalina, proteína c reativa e velocidade de sedimentação globular (VSG) (Motzer *et al.*, 1997).

Um parâmetro muito utilizado para estabelecer prognóstico nos tumores renais é o grau de diferenciação nuclear de Fuhrmann. Algumas características das células tumorais podem ajudar a definir o prognóstico. Fuhrman e colaboradores propuseram um sistema de classificação de tumores renais baseado na morfologia nuclear. A escala varia de 1 a 4, sendo o grau de melhor prognóstico aquele com núcleos menores, morfologia regular e sem nucléolos (Grau 1), e o de pior prognóstico aquele com núcleos acima de 20µm, formas bizarras e vários nucléolos (Grau 4) (Fuhrman *et al.*, 1982). Estudos ulteriores confirmaram o escore de Fuhrman como marcador independente de prognóstico no carcinoma renal, em especial no de células claras (Teloken *et al.*, 2009).

Modelos prognósticos caracterizam-se pela associação de fatores de risco para aumentar a acurácia ao diagnóstico. No CCR existem modelos prognósticos estabelecidos para dois momentos: um quando a doença é localizada no rim e queremos

estabelecer individualmente a chance de recorrência da doença ou de metástase, outro, num segundo momento, com a doença metastática já estabelecida. No primeiro caso, os modelos preditivos incluem características clínicas e histológicas. Destes, os mais utilizados são o de Leibovich que incorpora tamanho tumoral, estágio, grau de Fuhrmann, presença de necrose e estado linfonodal sendo desenvolvido pela Clínica Mayo, conhecido pela sigla SSIGN (Stage, Size, Grade, Necrosis) visando melhor acurácia. A adição de marcadores moleculares tem melhorado a acurácia, mas nenhum deles ainda consegue prever e individualizar respostas sobre quem irá desenvolver metástases (Lane e Kattan, 2008).

Para pacientes com doença já metastática, o modelo prognóstico mais utilizado até hoje foi o proposto por Motzer em 1997. Neste estudo com 670 pacientes com CCR metastáticos, cinco características adversas foram utilizadas com marcador de pior resposta: escala de Karnofsky <80, intervalo menor que 1 ano entre o diagnóstico e o tratamento sistêmico, hipercalcemia, anemia e LDH elevado. Se o paciente não apresenta nenhum destes fatores, a sobrevida chega a 30 meses. Se apresentar três ou mais fatores, a sobrevida não chega a 5 meses (Motzer *et al.*, 1999).

Com relação aos marcadores moleculares temos alguns representantes. Um dos mais estudados foi a anidrase carbônica IX que é uma proteína transmembrana usada como marcador de hipóxia. Ela está frequentemente elevada em tumores com a mutação do gene VHL. Os estudos mostraram ser marcador independente de pior prognóstico (Atkins *et al.*, 2005), porém trabalhos mais recentes não conseguiram repetir sua acurácia. Seu papel como marcador de resposta terapêutica aos agentes anti-VEGF não conseguiu ser estabelecido (Dornbusch *et al.*, 2013). O VEGF deveria também ser um marcador acurado para estabelecer resposta já que atua em sua própria via sinalizadora. Porém, existe discrepância importante nos resultados quando utilizamos a

dosagem do VEGF sérico ou seu receptor VEGF-r. Há estudos mostrando que uma dosagem elevada de VEGF antes da terapia significa pior prognóstico e outros mostrando que se este marcador estivesse elevado teria melhor resposta à terapia anti-VEGF. Os achados conflitantes parecem ser uma consequência direta da inconsistência técnica nos métodos de detecção do VEGF (Paule e Brion, 2010).

Devido ao seu papel central na gênese do CCR, o estado funcional do gene VHL tem sido estudado como potencial marcador de prognóstico. Porém, novamente não foi comprovado que os pacientes que apresentam um gene herdado e outro mutado na comparação da forma selvagem (dois mutados sem herança prévia) apresentam melhor prognóstico com relação à sobrevida global e câncer específica (Choueiri, 2008).

Outro fator estudado são os polimorfismos gênicos. Em estudo utilizando como terapia o Sunitinib, foram utilizados alguns polimorfismos gênicos codificadores das proteínas CYP3A5, NR1/3, E ABCB1 como melhor resposta terapêutica (Van Der Veldt *et al.*, 2011). Três polimorfismos no gene da IL-8 e HIF1ALFA e cinco no gene do HIF mostraram associação levemente positiva com sobrevida global e câncer específica em terapia com Pazopanib (Xu *et al.*, 2011). Outro estudo testou 27 tipos de polimorfismos em 13 genes de pacientes tratados com Pazopanib e Sunitinib. Eles encontram que apenas os polimorfismos no gene IL-8 foram relacionados a pior prognóstico (Xu *et al.*, 2015).

Resumidamente podemos dizer que os estudos atuais não conseguem prever resposta clínica, tampouco individualizar prognósticos. Com a descoberta do gene VHL e a subsequente avalanche de drogas bloqueando esta via, a grande maioria dos estudos de marcadores foca exclusivamente nesta via de ação. O estudo de Gerlinger em 2012 demonstrou que o tumor renal é extremamente heterogêneo. As mutações gênicas da lesão primária às vezes não são as mesmas da lesão metastática e tampouco

podem ser totalmente estudadas com apenas uma biópsia (Gerlinger *et al.*, 2012).

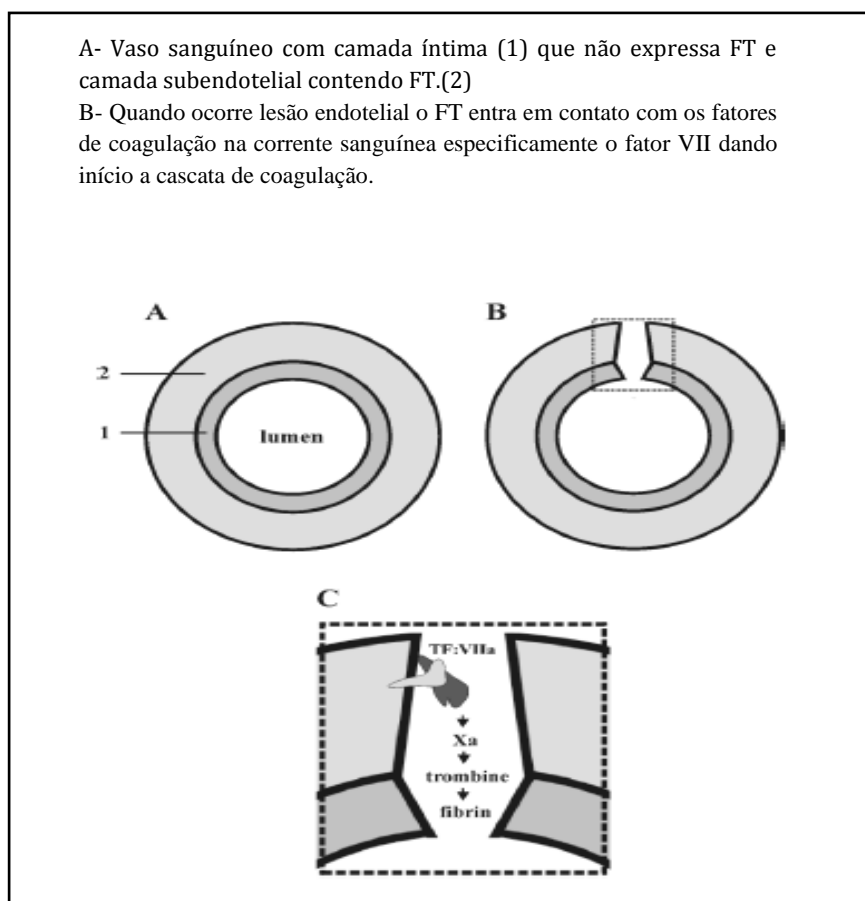
O presente estudo se propõe investigar uma via alternativa de progressão tumoral ao VHL, sem relação com o VEGF, HIFs e anidrase carbônica. Todos estes são marcadores de hipóxia tecidual já provaram não serem eficazes nem ao diagnóstico, nem ao predizer resposta. Nossa proposta estudará uma via de progressão tumoral relacionada à lesão endotelial.

O Fator Tecidual e sua relação com neoplasias

A associação entre fenômenos tromboembólicos e neoplasias remonta ao século XIX com os relatos de tromboflebite em tumores de pâncreas descritos inicialmente por Armand Trousseau em 1865, dando nome à Síndrome de Trousseau (neoplasia associada a fenômeno tromboembólico) (Anand e Brat, 2012). Desde então a idéia de que o Fator Tecidual (FT) está envolvido no desenvolvimento do câncer através de proliferação celular, sobrevivência celular, angiogênese e transição epitelial-mesenquimal (EMT) e metástase vêm gradualmente sendo aceita. Atualmente, sabemos que o câncer por si só aumenta em quatro vezes o risco de trombose, enquanto que a realização de tratamentos quimioterápicos aumenta em seis vezes estes riscos com relação à população geral (Heit, 2005). Desde o início, diversas moléculas foram estudadas e sugeridas como prováveis causas dos fenômenos tromboembólicos: IL1- β , TNF- α e IL6 e o FT (Bick, 2003). O FT é uma glicoproteína transmembrana com 47kDa conhecida como tromboplastina, fator III, CD142 ou também *full-length* TF (flTF) composta por 219 aminoácidos no domínio extracelular, 24 resíduos de aminoácidos na região da membrana e 28 aminoácidos no domínio citoplasmático, sendo codificada pelo gene F3 localizado no 1p22-p21. O FT é essencial para iniciar a via extrínseca da cascata da coagulação quando ocorre a lesão endotelial, determinando aumento da proliferação e

migração celular. Em circunstâncias normais o FT é expresso somente em células extravasculares, como os fibroblastos subendoteliais dos órgãos internos, principalmente no cérebro, coração, rim e placenta (Spicer *et al.*, 1987). Estudos conduzidos em camundongos mostraram que a inibição do FT, ou ainda níveis baixos circulantes correlacionam-se com sangramentos em alguns tecidos, notadamente cérebro e coração (Mackman *et al.*, 2007). Quando ocorre uma lesão endotelial o FT é liberado na corrente sanguínea e entra em contato inicialmente com o Fator VII circulante formando um complexo FT-FVII-a, que por sua vez é co-fator para ativação do Fator X em X-a. O Fator X-a irá converter a protrombina em trombina. A trombina ativa as plaquetas e converte fibrinogênio em fibrina, essencial para a estabilização do coágulo. Este tem sido considerado o início da cascata de coagulação (Versteeg *et al.*, 2001). A Figura 2 representa o papel da via extrínseca na cascata da coagulação.

Figura 2 - Papel do FT na coagulação sanguínea. Modificado de Versteeg e colaboradores em Molecular Medicine 2004; 10: 7.



Estudos genéticos conseguiram mostrar que as células neoplásicas expressam alta quantidade de FT devido a alterações em genes responsáveis pela regulação do ciclo celular como o k-RAS e o p-53. Nesse estudo realizado com células de carcinoma colorretal os autores demonstraram que as células inicialmente perdem a função reguladora do gene p-53, com subsequente ativação das vias sinalizadoras MAPK e PI3-Kinase, levando a um aumento na expressão de FT pelas células neoplásicas (Yu *et al.*, 2005). Experimentos realizados *in vivo* confirmam modificações no p53 com

consequente aumento na expressão do FT. A grande maioria do FT não está na circulação sanguínea, apenas uma pequena fração denominada micropartículas de FT (MP's) (Morel *et al.*, 2006). Em indivíduos saudáveis, estas MP's estão em pequena quantidade. Dvorak e colaboradores mostraram que as células tumorais liberam grande quantidade destas MP na circulação sanguínea, e que estas MP ativariam a cascata de coagulação de maneira mais intensa, aumentando os fenômenos tromboembólicos (Dvorak *et al.*, 1983). Estudo realizado em camundongos inoculados com câncer pancreático humano encontrou correlação positiva entre os níveis de FT circulantes e atividade do complexo trombina, um marcador de ativação da cascata de coagulação (Wang *et al.*, 2012). Assim, os resultados sugerem que os tumores são parcela fundamental para produção do FT circulante, que por sua vez determina um estado de hipercoagulabilidade, aumentando a incidência de tromboembolismo (Tesselaar *et al.*, 2007).

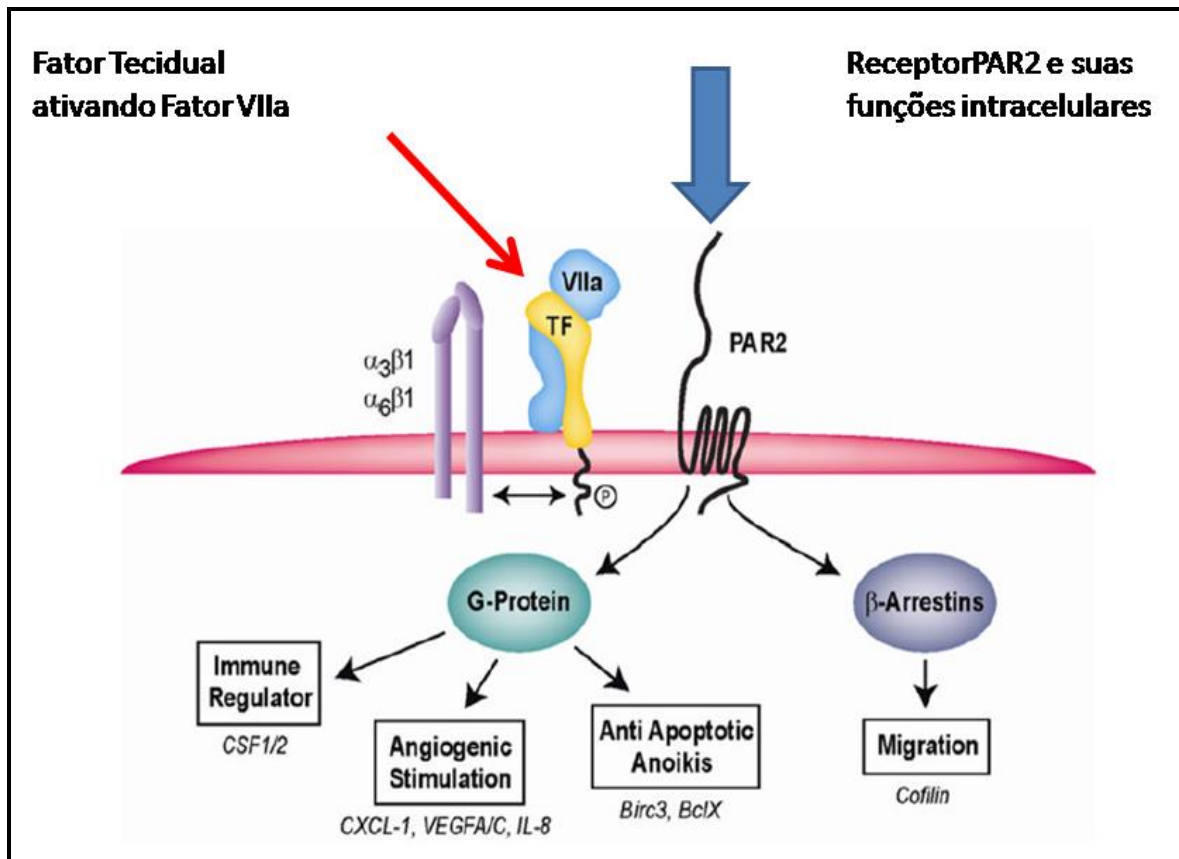
Mais recentemente, um estudo mostrou que o FT não somente estimula fenômenos tromboembólicos, mas parecem apresentar propriedades não hemostáticas essenciais para a progressão do câncer. A ligação do FT ao FVIIa formando o complexo inicial da cascata de coagulação também determina algumas alterações intracelulares, como transcrição gênica, sobrevivência celular e mudanças citoesqueléticas, necessárias para uma resposta adequada ao ambiente local. Neste sentido, uma família de receptores recebe maior destaque, os chamados PAR (do Inglês: Protease-Activated Receptors) numerados de 1 a 4 (Liu e Mueller, 2006). Estes receptores são ativados quando há quebra da terminação amino extracelular. Os receptores 1, 3 e 4 são ativados principalmente pela trombina e o PAR 2 pela plasmina. Este último recebe maior destaque por apresentar ativação principalmente com o complexo FT-FVIIa. Quando o FT se liga ao FVIIa e este ao PAR2, ocorre ativação intracelular de quinases responsáveis por fazerem um rearranjo citoesquelético e por aumentarem a sobrevivência celular. A

ativação destas quinases dá início a um programa intracelular que aumenta a síntese de proteínas pró-angiogênicas como o VEGF, Cyr61, CTGF, CXCL1 e IL8, corroborando a idéia de que o FT tem papel fundamental também na disseminação dos tumores ao aumentar a síntese destas proteínas (Ruf, 2007).

Diferentemente da estimulação do PAR2, as isoformas do FT chamam atenção para as propriedades não hemostáticas do FT. O TF-A (do Inglês: Tissue Factor A) resulta de um processamento alternativo no exon 1, e em células sadias não transformadas constitui menos de 1%, ao passo que em células neoplásicas o número de TF-A chega a 10% (Kocatürk, 2012). Outra isoforma foi identificada por Bogdanov e colaboradores em 2003, sendo nomeada *alternative-splice TF* ou *asTF* (Bogdanov *et al.*, 2003).

Normalmente o FT é processado e codificado por seis exons ao passo que o *asTF* é codificado por cinco exons. Esta alteração determina que excepcionalmente esta variante do FT seja solúvel e possa ser detectada no plasma. As isoformas do FT parecem ter papel chave principalmente em neoplasias. O fato de ser recente esta descoberta e de não dispormos de reagentes específicos subestima sua real importância (Chand *et al.*, 2006). Uma dificuldade que encontramos atualmente é não poder distinguir a expressão do FT da expressão do *asTF*. Segundo nossa busca, o único estudo realizado demonstrou que o aumento da expressão de *asTF* está associado a pior sobrevida, conduzido em carcinoma de pulmão não-pequenas células (Rollin *et al.*, 2010). Resumidamente, o complexo FT-FVIIa-PAR2 sinaliza para o citoplasma e para o núcleo da célula uma série de mecanismos que vão influenciar na sobrevida celular, motilidade celular e produção de fatores angiogênicos (Camerer *et al.*, 2000). A Figura 3 representa esquematicamente a ação do FT ativado no interior de uma célula endotelial.

Figura 3 - Sinalização intracelular FT-FVIIa-PAR2 para promover modificações celulares através do aumento de síntese de fatores pro-angiogênicos.



Modificado de Ruf et al. em *Arterioscler Vasc Thromb Biol* 2010;

A expressão do FT está aumentada em mais de 1000 vezes principalmente em neoplasias de origem epitelial como pâncreas, pulmão não-pequenas células, colorretal e mama (Van Den Berg *et al.*, 2011). Na maioria destes, houve correlação positiva entre o aumento da expressão de FT, parâmetros clínicos e patológicos tais como: número de vasos tumorais (Khorana *et al.*, 2007), índice de metástases (Sawada *et al.*, 1999), grau de diferenciação do tumor e sobrevida (Nitori *et al.*, 2005). Em estudo realizado para análise da expressão do FT em neoplasia de ovário, Han e colaboradores compararam os níveis séricos do FT em neoplasia benigna de ovário, lesões ovarianas com baixo potencial de malignidade e neoplasia maligna de ovário. Os resultados mostraram que as

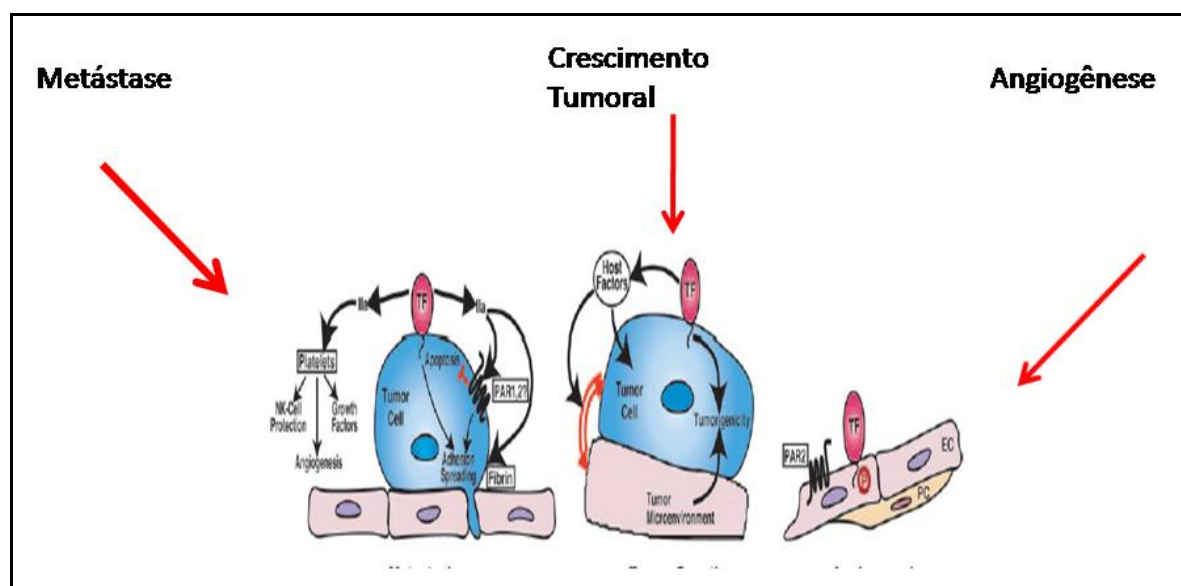
pacientes com neoplasia maligna de ovário expressaram níveis mais elevados de FT, e que esta dosagem sérica era fator prognóstico independente de mortalidade relacionada à doença (Han, L. Y. *et al.*, 2006).

Em relação a neoplasias urológicas, Forster e colaboradores publicaram em 2003 a primeira análise da expressão de FT em neoplasia renal. Foram 18 pacientes com carcinoma de células claras de rim, em que se analisou a expressão do FT em tumores a fresco pela técnica de ELISA e a quantificação do RNA mensageiro por técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Houve elevada expressão do FT no tecido sem tumor em comparação à quantidade de FT no tecido neoplásico. Também neste mesmo estudo, os autores realizaram coleta de sangue em 75 pacientes com CCR e 92 voluntários sadios emparelhados por idade. Não houve aumento de FT no soro dos pacientes com câncer na comparação com indivíduos saudáveis. Este foi o primeiro estudo de dosagem do FT em CCR, seu resultado negativo mostrou que não houve correlação dos níveis séricos do FT com qualquer desfecho clínico ou sobrevida (Forster *et al.*, 2003).

Os dados mencionados tornam válida a seguinte pergunta: como o FT pode estar relacionado ao prognóstico? Sabemos que os tumores se disseminam através do espaço intravascular dando origem às metástases hematogênicas. Células neoplásicas expressam alta taxa de FT e, por mecanismo de ativação da cascata da coagulação, estimulam o VEGF, fator responsável pela angiogênese tumoral (Kasthuri *et al.*, 2009). Zhang e colaboradores, em estudo realizado em sarcomas, mostraram que células transfectadas com FT induziram tumores mais vascularizados quando injetadas em camundongos devido a um aumento na regulação do VEGF (Zhang *et al.*, 1994). Outros estudos conduzidos em camundongos mostraram que a inibição da via FT reduziu significativamente a quantidade de metástases pulmonares quando comparados a camundongos controles (Amirkhosravi *et al.*, 2002). A Figura 4 apresenta um esquema

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

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



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

Outro ponto importante é a influência do FT no crescimento tumoral. Até o momento, segundo nossa busca, não está provado se o aumento da expressão do FT corresponderia a um aumento do tumor. Já, a inibição da via de ativação do FT em tumores colorretais conseguiu reduzir o tamanho do tumor, dado obtido de estudo recente realizado com camundongos. Neste estudo foi constatado que a resposta ocorreu *in vivo*, enquanto *in vitro* não houve redução tumoral (Yu *et al.*, 2005).

Em função desses dados, pesquisadores têm tentado bloquear de alguma forma a via do FT, tanto para diminuir a incidência de trombooses, como também para evitar a progressão tumoral. Drogas menos específicas como a varfarina (antagonista da vitamina K) e a heparina, em estudos experimentais, mostraram alguma redução na incidência de metástases, mas provavelmente sem ligação com o FT (Schulman e

Lindmarker, 2000). Através de um mecanismo de retroalimentação negativa, o aumento na quantidade de Fator Xa leva à produção de um inibidor de protease plasmático conhecido como inibidor da via do FT (TFPI). Além da inibição da via do FT, esta protease forma um composto quaternário que inativa o FT, FVIIa e FXa. A inibição da via específica do FT-VIIa-PAR2 através do anticorpo monoclonal 10H10 já mostrou redução no crescimento de tumores de mama em camundongos, e pode ter potencial terapêutico sem afetar as propriedades de coagulação necessárias do FT (Versteeg *et al.*, 2008).

Atualmente, algumas novas drogas estão sob investigação em estudos clínicos. O ALT-386 é um anticorpo inibidor do FT e o PCI-27483, uma pequena molécula inibidora da via FT-FVIIa-PAR2. Ambos são estudos que ainda estão em fase de recrutamento de pacientes em tumores de mama, sólidos epiteliais e pancreáticos respectivamente (Wong, 2012). Os resultados destes dois estudos podem introduzir novas modalidades de tratamento de neoplasias e trombooses relacionadas, definitivamente colocando o FT como marcador de prognóstico e alvo terapêutico de primeira linha.

Em pesquisa realizada pelo nosso grupo foi constatado que a expressão imuno-histoquímica do FT foi o principal fator prognóstico de recorrência e de óbito em nefroblastomas (Maciel *et al.*, 2009). Posteriormente, comprovou-se associação positiva em relação à expressão imuno-histoquímica do FT e pior prognóstico em carcinoma de células claras de rim. Interessantemente, a expressão imuno-histoquímica aumentada do FT (>10mm²) foi o principal fator prognóstico de recorrência e óbito em carcinoma de células claras de rim, superando inclusive os já bem estabelecidos fatores de risco como o grau de Fuhrmann, estadiamento TNM e o escore SSIGN. A expressão imuno-histoquímica do FT foi fator preditivo de mortalidade inclusive na análise multivariada (Silva *et al.*, 2014). Neste sentido parece provável ser o FT um marcador importante para

o prognóstico de neoplasias renais.

Polimorfismo genético do FT

Dentro de uma espécie os cromossomos são bastante similares entre si, mas em determinados locais do cromossomo (*loci*) pode haver variabilidade na sequência do DNA. Se a variação encontrada for maior que 1% na população, este gene é polimórfico. Os polimorfismos podem atuar como marcadores genéticos já que são transmitidos associados a outros genes localizados na região cromossômica próximo a eles (*linkage*) (Balasubramanian *et al.*, 2004). Com relação ao FT alguns estudos foram realizados para pesquisar o polimorfismo no FT. A maioria dos estudos de polimorfismo no FT foram realizados em doenças vasculares e respiratórias; nenhum realizado em neoplasias conforme nossa busca.

Um dos polimorfismos mais estudados foi encontrado na região promotora do gene do TF (Arnaud *et al.*, 2000). A mutação A-603G tem sido uma das mais estudadas. Por estar localizada na região promotora, existe uma amplificação importante na expressão do RNAm do FT e, conseqüente aumento no nível sérico do TF (Reny *et al.*, 2004). Esta variabilidade genética em estudo realizado em pacientes com Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) determinou um pior prognóstico do ponto de vista cardiovascular e um aumento na incidência de fenômenos tromboembólicos (Ott *et al.*, 2004). Também em estudo realizado em população japonesa, Isada e colaboradores mostraram que este polimorfismo estava associado a um aumento na incidência de asma inicial em pacientes adultos (Isada *et al.*, 2010). Outro estudo correlacionou este mesmo polimorfismo com doença vascular-aterosclerose. Gertow e colaboradores pesquisaram este mesmo polimorfismo e avaliaram a espessura da parede da íntima da artéria carótida de pacientes em programa preventivo de doenças cardiovasculares. A espessura da artéria

foi estatisticamente maior em pacientes com o polimorfismo A-603G. Desta forma podemos inferir que pacientes portadores desta mutação estão em risco de desenvolver mais doença aterosclerótica (Gertow *et al.*, 2009). Já Mälarstig e colaboradores pesquisaram outro polimorfismo em pacientes com IAM. Neste estudo foi investigado o polimorfismo no íntron 2 do gene do FT com a mutação 5466 A>G. Os pacientes com a mutação apresentaram três vezes mais risco de morte cardiovascular quando comparados aos controles sem a mutação (Mälarstig *et al.*, 2005).

A importância dos polimorfismos genéticos com relação às neoplasias renais pode ser exemplificada pelo estudo do polimorfismo do gene do VEGF. Neste estudo, o polimorfismo -460 está associado a um aumento do risco de desenvolver CCR e sugere que pacientes com histórico familiar e em alto risco de desenvolver o câncer renal façam a triagem inicial (Bruyère *et al.*, 2010). Segundo os dados publicados deste estudo, os pesquisadores não realizaram ecografia nos pacientes controles para excluir neoplasia renal, bem como não foram dosados níveis séricos de VEGF.

Dosagem sérica do Fator Tecidual

Em indivíduos saudáveis circula na corrente sanguínea entre 27-172 pg/mL de FT, sendo a grande maioria ligada às micropartículas celulares do FT (do Inglês: MP-TF) (Key, 2010). Estas MP-TF são membranas vesiculares resultantes da eliminação de células apoptóticas, células ativadas ou células cancerosas (Amin *et al.*, 2007). Os níveis de FT podem ser dosados através de ensaios baseados na atividade do FT ou na presença do antígeno. A atividade do FT foi medida mostrando-se um método fidedigno, pois basea-se na medida do antígeno tanto na forma inativa como ativa (Key e Mackman, 2010).

As MP-FT presentes em pacientes com neoplasias são aparentemente

derivadas do próprio tumor e seus níveis são drasticamente reduzidos após ressecção tumoral (Zwicker *et al.*, 2009). O estudo de Thaler e colaboradores em pacientes com neoplasia de pâncreas mostrou que os níveis séricos de MP-FT se correlacionam com estágio clínico. A dosagem da atividade do MP-TF também correlacionou com o aumento da expressão imuno-histoquímica do FT no tumor, sugerindo que similar relação da dosagem sérica do MP-FT pode ser estabelecida em outros tumores (Thaler *et al.*, 2012). Os achados de Han e colaboradores comprovam que há correlação entre os níveis séricos do FT e neoplasias de ovário. Nesse trabalho, o FT foi dosado através de teste de ELISA no pré-operatório de 144 pacientes com suspeita de tumor ovariano. Posteriormente verificou-se que dos 144, 98 eram pacientes com tumores malignos de ovário, 30 com tumores com baixo potencial de malignidade e 16 tumores benignos. Os níveis séricos de FT acima de 190pg/mL foram marcadores independentes de pior prognóstico com aumento da mortalidade câncer específica. Concluem que a dosagem sérica por ELISA do FT pode ser uma ferramenta diagnóstica importante para os pacientes com neoplasia de ovário (Han, L. Y. *et al.*, 2006). Neste sentido torna-se válido a mesma investigação em CCCr.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar a concentração sérica do FT, em pacientes com carcinoma de células claras de rim.

Objetivos Específicos

Em pacientes com carcinoma de células claras de rim (CCCr) submetidos a cirurgia no HSL- PUCRS:

- Quantificar os níveis séricos do FT nos pacientes com CCCr no pré e pós-operatório;
- Comparar a dosagem pré-operatória dos pacientes com CCCr com pacientes controles sem CCCr
- Verificar a correlação entre a concentração sérica do FT com outros fatores prognósticos reconhecidos de neoplasia renal.

Pacientes e Métodos

Pacientes

Foram convidados a participar do estudo pacientes com câncer de células renais atendidos nos Ambulatórios de Uro-oncologia e de Urologia Geral do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade do Rio Grande do Sul (HSL/PUCRS) no período compreendido entre setembro de 2014 e junho de 2016. Neste mesmo período pacientes submetidos a outros procedimentos urológicos como, por exemplo, ressecção endoscópica de próstata, ureterolitíase, cistos renais benignos, nefrectomia por exclusão renal entre outros foram também incluídos como pacientes controles.

Amostra

Os dados foram coletados de acordo com protocolo de pesquisa (Anexo 2). Os pacientes foram acompanhados seguindo a sugestão das diretrizes da Sociedade Brasileira de Urologia (Ornellas, 2012) e acompanhados seguindo cronograma definido pela Sociedade Brasileira de Urologia (SBU).

Delineamento

Estudo transversal contemporâneo.

Critérios

Foram incluídos no estudo pacientes com CcCr que aceitaram participar e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo1).

Foram excluídos pacientes com história de neoplasia prévia, amostras

patológicas inadequadas para o processamento e análises laboratoriais, bem como registros incompletos, falta de seguimento ambulatorial.

Variáveis

As variáveis analisadas no estudo foram as seguintes:

Idade, sexo, HAS, estadiamento clínico pré-operatório (TNM-2010), classificação de Fuhrmann, presença de necrose na amostra, dosagem sorológica do FT pré-operatório e após pelo menos quatro semanas da nefrectomia, níveis séricos de FT em controles.

Coleta, armazenamento e análises laboratoriais

As concentrações plasmáticas do FT foram quantificadas por método de ELISA, utilizando o kit Human Coagulation Factor III/Tissue Factor Immunoassay - Quantikine®ELISA (Catalog Number DCF300) adquirido da R&D (California – EUA). Amostras de 5 mL de sangue foram coletadas, em tubos contendo EDTA, imediatamente antes da cirurgia e após decorrido um período mínimo de 30 dias. Em até 30 minutos após a coleta, o plasma foi separado por centrifugação a 1000 x g por 15 minutos. Aspirado, o plasma foi transferido para tubos de 600 uL e estocadas em freezer à temperatura de -80°C. Quando concluída a coleção de amostras, a dosagem foi iniciada, seguindo-se as orientações do fabricante do kit. Nas placas de poliestireno contendo 96 poços com anticorpo monoclonal específico para o fator III de coagulação, foram pipetadas a curva padrão (concentrações 7,8 a 500 pg/mL) e as amostras. Após 2 horas de incubação a temperatura ambiente em constante agitação, as placas foram aspiradas e lavadas por 3 vezes com solução de lavagem. Os mesmos procedimentos foram repetidos para a adição do conjugado. A adição do substrato teve incubação por 30 minutos sem

agitação e protegida da luz. Ao seu final foram adicionados 50 uL de solução de ácido sulfúrico a fim de suspender a reação. A densidade ótica das amostras foi obtida pela leitura da placa em espectrofotômetro Zenyth 340® (*Made in Austria*), com filtro de 450nm com correção de comprimento de onda de 570 nm. As concentrações de FT das amostras foram calculadas com relação a leitura dos padrões e a correlação entre os pontos da curva padrão ($r^2=0,9963$). Ao final o resultado foi multiplicado por 2 devido a diluição das amostras recomendada pelo fabricante R&D®. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

Análise Estatística

As variáveis contínuas foram descritas como médias e desvios-padrão. Para dados assimétricos utilizamos medianas e intervalos mínimo-máximo. Os dados categóricos foram expressos utilizando contagens e percentagens. Utilizou-se o teste t de Student para comparação de variáveis contínuas e o teste exato de Fisher para a comparação de variáveis com dados categóricos. Utilizou-se uma regressão linear para identificar a associação potencial da redução do TF sérico com o tamanho do tumor como com outras variáveis quantitativas. Os valores foram expressos como r (coeficiente de Pearson) e b (coeficiente angular). Para a associação de variáveis categóricas foi utilizada a análise de covariância com valores negativos e desvio padrão. O programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, v. 22.0) foi utilizado para análise de dados. O protocolo do estudo foi revisado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do hospital universitário, protocolo número 33687414.5.0000.5336 (Apêndice 1) , e todos os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido quando incluídos no estudo (Apêndice 2).

Resultados

Os resultados obtidos estão apresentados a seguir em duas versões: a primeira apresenta o artigo em inglês submetido ao periódico International Brazilian Journal of Urology (Int Braz J Urol), revista indexada no PUBMED, já incluindo as respostas aos revisores destacadas em negrito. A segunda parte, em português consta da apresentação dos dados para o corpo da presente tese.

Serum Tissue Factor as a biomarker for Renal Clear Cell Carcinoma

Running head: tissue factor as a biomarker in kidney cancer

Abbreviations and Acronyms

TF = tissue factor

RCC = renal cell carcinoma

ELISA = enzyme linked immunosorbent assay

Key Words: Kidney neoplasms, thromboplastin, biomarkers

INTRODUCTION

Clear cell renal cell carcinoma (RCC) corresponds to 85% of all renal malignancies, with an estimated 66.000 new cases in the U.S. in 2016(1). In 2012, there were about 142.000 deaths due to kidney neoplasms, representing the 16th most common cause of cancer specific mortality(2). In spite of the significant increase in the diagnosis of incidental RCCs, the expected reduction in mortality rates did not occur, since roughly 30% of the patients with RCCs are already metastatic at presentation(3). In fact, mortality rates of renal malignancies have increased in underdeveloped and in developing countries in recent years(4).

The search for new diagnostic and prognostic biomarkers in clear cell RCC has evolved slowly over the years. Many tissue biomarkers have been studied, with mixed results as either prognostic or predictive tools: carbonic anhydrase IX, B7-H1, survivin, PD-1, Epcam/ksa, IGF-1, VEGF, EphA2, and Skp2(5-13). More recently, some genes were associated with the presence of CCR. Among these, the most frequently mutated were: PBRM1, that is part of the chromatin remodeling complex, BAP1 and SETd2, which are histones also relevant to this process (14). So far, no serum biomarker has proven clinically useful in clear cell RCC.

Tissue factor (TF) is a transmembrane protein responsible for triggering the extrinsic coagulation pathway(15). An increased TF expression was correlated with worse outcomes in various tumors from organs such as pancreas, ovary, lung, breast, prostate, colon and central nervous system(16). Serum TF levels were tested as possible tumor markers in ovarian and pancreatic cancers, with promising results(17, 18). We have previously reported that an increased immunohistochemical expression of TF in Wilms tumors(19) and in clear cell RCC

(20) was an adverse prognostic factor, correlated with decreased overall and cancer-specific survival. The present study aims to determine whether serum levels of TF are useful as biomarkers in clear cell RCC.

MATERIALS AND METHODS

A prospective study was carried out in patients with renal tumors candidates for either radical or partial nephrectomy at a university hospital. From August 2014 to July 2016, 43 patients were included in the study, and were tested preoperatively for TF. Of these, 11 patients who did not present with the diagnosis of clear cell RCC in the pathologic exam (08 benign lesions, 02 chromophobic carcinomas, 01 papillary carcinoma) were excluded. In 32 patients with confirmed diagnosis of clear cell RCC, a second blood collection for TF was performed after at least four weeks from the date of surgery. Additionally, we tested for TF in the preoperative setting the serum of 16 controls who were operated with diverse diagnosis. This heterogeneous group was composed by patients with prostate cancer (1), benign renal cysts (2), oncocytoma (1), benign prostatic hyperplasia (7), non-functional kidneys (2), ureteral stones (2), and renal stone (1). Controls were operated by the same Urology team, and showed no evidence of RCC in imaging exams of the upper urinary tract and in pathology reports. Postoperative samples were lost in two patients with clear cell RCC, who were excluded from the study. Our final study group thus consisted of 30 patients with clear cell RCC and 16 controls with other diseases. The clinical and pathologic variables studied included: age at diagnosis, gender, presence of arterial hypertension, history of smoking, Fuhrman's grade, TNM stage (2010), presence of tumor necrosis, size of the renal lesion, preoperative and postoperative serum levels of TF.

TF- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Serum concentrations of FT were quantified by ELISA using the Human Coagulation Factor III / Tissue Factor Immunoassay - Quantikine[®] ELISA kit (Catalog Number DCF300) purchased from R & D (California - USA). Samples of 5 mL of blood were collected in tubes containing EDTA before and after at least four weeks of surgery. Within 30 minutes after collection, serum was separated by centrifugation at 1000 x g for 15 minutes. Aspirated, the serum was transferred to 600 uL tubes and stored in a freezer at -80 ° C. When the sample collection was complete, testing was initiated, following the manufacturer's protocol. In the 96-well polystyrene plates with monoclonal antibody specific for coagulation factor III, the standard curve (concentrations 7.8 to 500 pg / mL) and the samples were added. After 2 hours of incubation at room temperature, the plates were aspirated and washed 3 times. The same procedures were repeated for addition of the conjugate. Addition of the substrate was incubated for 30 minutes without shaking and protected from light. At its end 50 ul of sulfuric acid solution was added to suspend the reaction. The optical density of the samples was obtained by reading the plate in Zenyth[®] 340R (Made in Austria) spectrophotometer with a 450nm filter with 570 nm wavelength correction. Tissue factor concentrations of the samples were calculated with respect to the reading of the standards and the correlation between the points of the standard curve ($r^2 = 0.9963$). At the end the result was multiplied by 2 due to the dilution of the samples recommended by the R & D manufacturer. The tests were performed at the Laboratory of Nephrology of the Biomedical Research Institute of PUCRS.

Statistical Analysis and Ethics

Continuous variables were described as means and standard deviations. For asymmetric data we used medians and minimum-maximum intervals. Categorical data were expressed using counts and percentages. We used Student's t-test for the comparison of continuous variables and Fisher's exact test for the comparison of variables with categorical data. A linear regression was used to identify the potential association of the reduction of serum TF with tumor size as with other quantitative variables. The values were expressed as r (Pearson's coefficient) and b (angular coefficient). For the association of categorical variables, covariance analysis with negative values and standard deviation was used. The Statistical Package for Social Sciences program (SPSS, v. 22.0) was used for data analysis. The study protocol was reviewed and approved by the research ethics committee of the university hospital, protocol number 33687414.5.0000.5336, and all patients signed a free informed consent form when included in the study.

RESULTS

The clinical and pathologic variables are shown in Table 1. There was a predominance of men in the sample ($n = 18$, 60.1%), and the mean age was 58.8 years (31-91 years). Mean tumor size was 5.53 cm (0.4-19.0 cm). Regarding Fuhrman's classification, 4 (13.3%) patients were grade 1, 20 (66.6%) were grade 2, 6 (20%) were grade 3, and 0 (0.0%) were grade 4. The pathologic stage was TNM I in 22 (73.3%); TNM II in 02 (6.6%), TNM III in three (10%), and

TNM IV in three (10%). There were no statistically significant differences between groups regarding age, sex and hypertension.

Table 1 – Patients characteristics.

Characteristics	CCR	CONTROLS	P
	n= 30	n = 16	
Age, years	61.1 ± 10.1	57.5 ± 12.9	0.950 ^[a]
Male sex, n (%)	18 (60.0)	12 (75.0)	0.257 ^[b]
Tumour size, cm	5.52 ± 2.5	-	-
Hypertension	17(56.6)	4(25.0)	0.060
Fuhrman grade, n (%)			-
1	4 (13.3)	-	
2	20(66.6)	-	
3	6 (20.0)	-	
4	0 (0.0)	-	
TNM stage, n (%)			-
I	22 (73.3)	-	
II	2 (6.6)	-	
III	3 (10.0)	-	
IV	3 (10.0)	-	

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

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

The mean pre-operative serum TF in patients with RCC was 66.8 pg/ml whereas in healthy patients it was 28.4pg/ml (p <0.001). Figure 1 shows a box-plot representation of the mean and median values of TF in serum, both in renal cancer and in controls.

Figure 1. Serum TF in Controls and in Clear Cell RCC

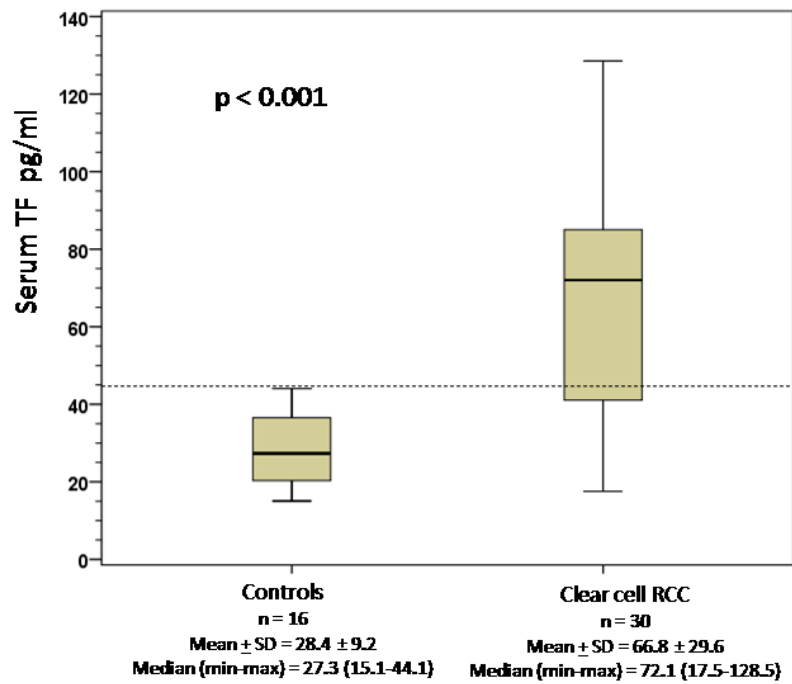
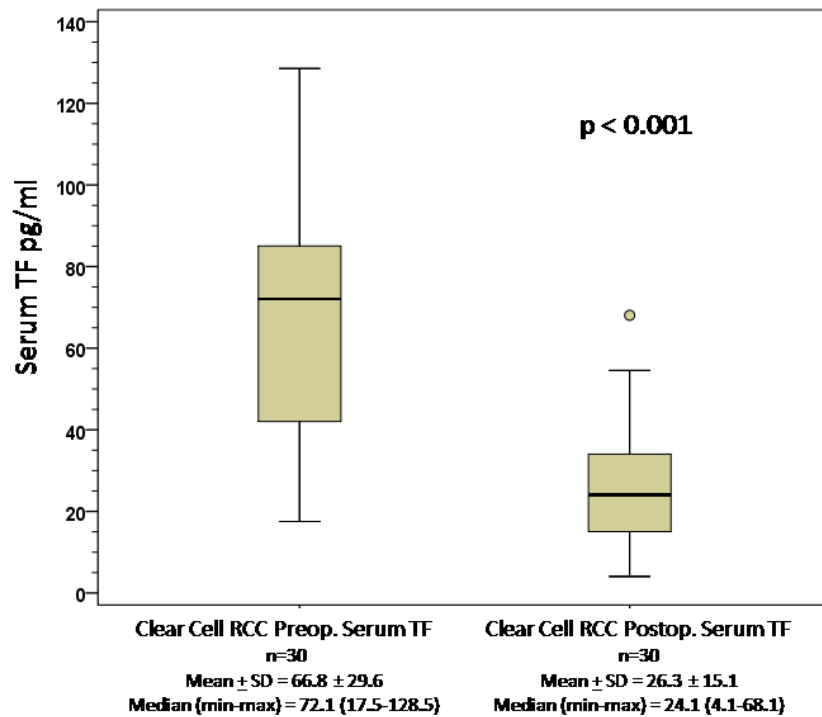


Figure 2 shows postoperative serum levels of TF in patients with clear cell RCC, whose mean was 26.3 pg/ml. All patients with clear cell RCC presented with a reduction in serum TF levels after at least four weeks from surgery. The mean reduction in postoperative TF was 41.6 pg/ml (p value, 0.001).

Figure 2. Preoperative and Postoperative serum TF.



To determine which factors are involved in the postoperative reduction of TF, we performed a linear regression for continuous variables using the tumor size data and a covariance analysis for the TNM, presence of necrosis, and Fuhrman grade (table 2). Tumor size was the only variable that in linear regression showed statistical significance with a value b (Pearson coefficient) of -382 and an angular coefficient (linear regression) of -4.72. This means that with each 1cm increase in tumor diameter we have a reduction of approximately 4.7 TF units in pg/ml ($p = 0.037$). The value of preoperative TF was also correlated with the size of the tumor at diagnosis. The Pearson test also confirmed a positive correlation with $p = 0.03$ and an angular coefficient of -388.

Table 2- Association between the decrease in serum TF levels and selected prognostic factors

Characteristics	n	Statistics	p
<i>Tumor size, cm</i>	30	r = -0.382 b = -4.73	0.03
<i>Necrosis</i>			
Absent	24	-37.8±6.7	0.20
Present	6	-56.8±11.6	
<i>Fuhrman grade</i>			
1	4	-68.9±11.0	0.07
≥ 2	26	-37.4±6.3	
<i>TNM stage</i>			
I	22	-38.1±7.0	0.32
≥ II	8	-51.5±31.1	

Legend: r= Pearson coefficient; b: angular coefficient (linear regression); p: statistical significance. ± Sign represents mean ± standard error.

DISCUSSION

In some malignant neoplasms, serum markers are important not only for the diagnosis of the disease but also have roles as prognostic tools and are adjuncts to patients' follow-up. So far, no serum marker has proven to be clinically useful in clear cell RCC. We have shown for the first time that in the preoperative setting, patients with clear cell RCC have serum TF levels three times higher than those of patients with other diseases. Our control group consisted of a very heterogeneous group including one patient with prostate cancer and two patients with benign renal lesions. It is interesting to note that even with a few patients in the control group presenting with benign neoplasms, the value of preoperative TF in the control group did not approach the values of patients with ccRCC. We could hypothesize that TF is a more specific endothelial marker of malignant disease, especially in more vascularized organs, like the kidney. Furthermore, we have shown a three-fold reduction in serum TF levels in the postoperative setting of patients with clear cell RCC after at least four weeks of the surgical removal of the tumor. These findings suggest that serum levels of TF may be clinically useful as markers of the presence of clear cell RCC.

The idea of testing this marker in the serum of patients with clear cell RCC was not random. We have previously studied the immunohistochemical expression of TF in tumor samples of patients with Wilms tumors and in tumor samples of patients with clear cell RCC. In the samples of patients with Wilms tumors, an increased TF expression was an independent prognostic factor of overall survival (HR 5.6; $p < 0.01$) (18). In samples of patients with clear cell RCC an increased expression of TF was also an independent predictor of overall survival (HR 4.03; $p = 0.03$) (19). Förster et al. have previously studied TF both in tissue and in

serum of patients with RCC. These authors did not find an increased expression of TF in the tumor samples of patients with RCC compared with normal tissue samples of the same kidney. Additionally, they did not find a statistically significant difference in the serum TF levels of patients with RCC and healthy volunteers(20). The reason for these discordant results remains to be explained.

We have observed a marked reduction of serum levels of TF in the postoperative setting in all our patients with clear cell RCC, with a mean reduction of 41pg/ml ($p < 0.001$). Tumor size was correlated with the reduction in serum TF levels, in such a way that for every centimeter of the primary lesion there was a mean reduction of 4.72 pg/ml in serum TF in the postoperative setting. Other prognostic variables such as TNM, Fuhrman grade, and the presence of necrosis were tested by covariance analysis, but were not significantly associated with the decrease in TF levels. Our small sample and the predominance of patients with initial disease (e.g., TNM I =73.3%; 20% of SRM's- tumors smaller than 3.5cm) may have contributed to these findings.

Serum TF has been studied in clinical research. The ELISA technique is the most common methodology of serum TF testing (American Diagnostic and R&D). These kits refer to normal levels in healthy patients values ranging from 27 to 172 pg/ml. Han et al have previously studied serum TF levels in women with ovarian benign lesions, ovarian lesions of uncertain behavior and ovarian cancer. In this study, mean serum TF levels were of 85.2 pg/ml in ovarian cancer, a value much higher of the mean 12.8 pg/ml found in patients with benign ovarian diseases ($p < 0.01$). Values higher than 190 pg/ml were correlated with a worse prognosis and cancer specific mortality (3-4 times higher; $p = 0.01$) (16). In another study,

Zwicker et al evaluated serum TF with the technique of microparticles (MP-TF) in patients with pancreatic cancer. In this study, there was a correlation between serum MP-TF levels and the risk of thromboembolism and of cancer specific mortality. In three patients, MP-TF was undetectable after the surgical removal of the pancreas (21).

Our study has several limitations. Firstly, we tested a small number of selected patients with clear cell RCC. Larger studies are needed to corroborate our findings. Secondly, since our study was prospective and follow-up is short, we do not have long-term survival or mortality data to evaluate as outcome measures. Thirdly, since cancer determines an inflammatory response, in the presence of a malignant neoplasm there is an increased production of several markers, which may not be cancer specific, but related to inflammation. In this study, we did not perform other inflammatory markers, such as C-reactive protein, Eritrocyte Sedimentation Rate (ESR) (22) or interleukyn-6 (23). This is probably going to be the subject of further research. Lastly, we did not analyze in this study the tissue expression of TF by immunohistochemistry or polymerase-chain reaction techniques in the samples of clear cell RCC.

Our findings should be validated by studies with a larger number of patients to ascertain their real clinical applicability. The usefulness of TF in serum as a marker of the presence of disease could help in more accurately evaluating small renal masses, complex cystic lesions, oncocytomas and angiomiolipomas. Serum TF determinations could also be potentially used as a follow-up tool in clear cell RCC.

CONCLUSIONS

We have shown a 3-fold reduction in the median preoperative serum levels of TF in patients with clear cell RCC after surgery. We have also shown a difference of the same magnitude in the serum levels of TF compared with those of a control group of patients with benign diseases. TF appears to be a useful serum marker for the presence of clear cell RCC. Further studies are needed to validate these findings.

REFERENCES

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* Jan;66(1):7-30.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer.* 2015;136(5):E359-E86.
3. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology.* 1999;17(8):2530-.
4. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Bray F. International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *Eur Urol.* 2015 Mar;67(3):519-30.
5. Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, Chen L, Zincke H, Blute ML, Leibovich BC, Kwon ED. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer.* 2005 Nov 15;104(10):2084-91.
6. Xie Y, Ma X, Gu L, Li H, Chen L, Li X, Gao Y, Fan Y, Zhang Y, Yao Y, Zhang X. Prognostic and Clinicopathological Significance of Survivin Expression in Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Scientific Reports.* 2016;6.
7. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, Bhatia S, Martins R, Eaton K, Chen S, Salay TM, Alaparthi S, Grosso JF, Korman AJ, Parker SM, Agrawal S, Goldberg SM, Pardoll DM, Gupta A, Wigginton JM. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med.* 2012 Jun;366(26):2455-65.
8. Seligson DB, Pantuck AJ, Liu X, Huang Y, Horvath S, Bui MH, Han KR, Correa AJ, Eeva M, Tze S, Belldegrun AS, Figlin RA. Epithelial cell adhesion molecule (KSA) expression: pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004 Apr 15;10(8):2659-69.
9. Atkins M, Regan M, McDermott D, Mier J, Stanbridge E, Youmans A, Febbo P, Upton M, Lechpammer M, Signoretti S. Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome of interleukin 2 therapy for renal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 May;11(10):3714-21.
10. Dornbusch J, Zacharis A, Meinhardt M, Erdmann K, Wolff I, Froehner M, Wirth MP, Zastrow S, Fuessel S. Analyses of potential predictive markers and survival data for a response to sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *PLoS One.* 2013;8(9):e76386.
11. Herrem CJ, Tatsumi T, Olson KS, Shirai K, Finke JH, Bukowski RM, Zhou M, Richmond AL, Derweesh I, Kinch MS, Storkus WJ. Expression of EphA2 is prognostic of disease-free interval and overall survival in surgically treated patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005 Jan 01;11(1):226-31.
12. Langner C, von Wasielewski R, Ratschek M, Rehak P, Zigeuner R. Biological significance of p27 and Skp2 expression in renal cell carcinoma. A systematic analysis of primary and metastatic tumour tissues using a tissue microarray technique. *Virchows Archiv : an international journal of pathology.* 2004 Dec;445(6):631-6.

13. Parker AS, Cheville JC, Blute ML, Igel T, Lohse CM, Cerhan JR. Pathologic T1 clear cell renal cell carcinoma: insulin-like growth factor-I receptor expression and disease-specific survival. *Cancer*. 2004 Jun 15;100(12):2577-82.
14. Spicer EK, Horton R, Bloem L, Bach R, Williams KR, Guha A, Kraus J, Lin T-C, Nemerson Y, Konigsberg WH. Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987;84(15):5148-52.
15. Kasthuri RS, Taubman MB, Mackman N. Role of tissue factor in cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Oct;27(29):4834-8.
16. Han LY, Landen CN, Kamat AA, Lopez A, Bender DP, Mueller P, Schmandt R, Gershenson DM, Sood AK. Preoperative serum tissue factor levels are an independent prognostic factor in patients with ovarian carcinoma. *Journal of clinical oncology*. 2006;24(5):755-61.
17. Thaler J, Ay C, Mackman N, Bertina RM, Kaider A, Marosi C, Key NS, Barcel DA, Scheithauer W, Kornek G, Zielinski C, Pabinger I. Microparticle-associated tissue factor activity, venous thromboembolism and mortality in pancreatic, gastric, colorectal and brain cancer patients. *J Thromb Haemost*. 2012 Jul;10(7):1363-70.
18. Maciel EO, Carvalhal GF, da Silva VD, Batista EL, Jr., Garicochea B. Increased tissue factor expression and poor nephroblastoma prognosis. *J Urol*. 2009 Oct;182(4):1594-9.
19. Silva DDO, Noronha JAP, Silva VDd, Carvalhal GF. Increased Tissue Factor Expression is an Independent Predictor of Mortality in Clear Cell Carcinoma of the Kidney. *International braz j urol*. 2014;40(4):499-506.
20. Forster Y, Meye A, Albrecht S, Kotsch M, Fussel S, Wirth MP, Schwenzer B. Tissue specific expression and serum levels of human tissue factor in patients with urological cancer. *Cancer Lett*. 2003 Apr 10;193(1):65-73.
21. Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC, Furie B. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(22):6830-40.
22. Motzer RJ, Nanus DM, Russo P, Berg WJ. Renal cell carcinoma. *Current problems in cancer*. 1997;21(4):185-232.
23. Walther MM, Johnson B, Culley D, Shah R, Weber J, Venzon D, Yang JC, Linehan WM, Rosenberg SA. Serum interleukin-6 levels in metastatic renal cell carcinoma before treatment with interleukin-2 correlates with paraneoplastic syndromes but not patient survival. *The Journal of urology*. 1998;159(3):718-22.

Continuação dos resultados: versão em português

Adicionalmente, os resultados que seguem não constaram do artigo submetido, mas foram obtidos a partir da análise dos dados. A amostra foi formada por 30 pacientes com CCCr e 16 controles sem CCCr identificada por exame de imagem. A análise inicial mostra um predomínio de homens (60,1%) com idade média de 58 anos (19-91anos). O tamanho médio dos tumores foi de 5.56cm (0,4-19,0cm). A maioria era pacientes hipertensos com 56,6% na amostra. Com relação ao estadiamento TNM 73,3% foram incluídos no estágio I, 6,6% estágio II, 10% estágio III e nenhum paciente no estágio IV. Quanto ao grau de Fuhrman predomínio de grau 2(66,6%) seguido do grau 3 com 20%, grau 1 com 13,3%. Três pacientes foram classificados com grau 4 de Fuhrman. Os dados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Características dos pacientes.

Características	CCCR CONTROLES		P
	n= 30	n = 16	
Idade, anos	61,1 ± 10.1	57,5 ± 12.9	0,950 ^[a]
Sexo Masc, n (%)	18 (60,0)	12 (75,0)	0,257 ^[b]
Tamanho tumor, cm	5,52 ± 2,5	-	-
Hipertensão	17(56,6)	4(25,0)	0,060
Grau Fuhrman, n (%)			
1	4 (13,3)	-	
2	20 (66,6)	-	
3	6 (20,0)	-	
4	0 (0,0)	-	
Estadio TNM, n (%)			
I	22 (73,3)	-	
II	2 (6,6)	-	
III	3 (10,0)	-	
IV	3(10,0)	-	

Legenda: Valores são apresentados como media ± desvio padrão ou porcentagem(%).

TNM: Estadiamento do inglês *Tumor Nodes Metastasis* (TNM) ; CCCr Carcinoma de Células Claras de Rim; p: significância estatística

[a]: teste t de Student, [b]: Teste exato de Fisher.

A dosagem média do FT sérico no pré-operatório de pacientes com neoplasia foi de 66,8±29,6 pg/ml e a mediana foi de 72,1pg/ml com mínimo em 17,5 pg/ml e máximo atingido de 128,5pg/ml. Na comparação com controles obtivemos uma média de 28,4±9,2 pg/ml com mediana em 27,3pg/ml (15,1-44,1pg/ml min-máx). A diferença foi significativa entre os grupos com p<0.001. Após pelo menos 30 dias de pós-operatório realizamos novamente a dosagem sérica. A média do valor sérico do FT nos pacientes

com tumores foi de 26,3 pg/ml, sendo que todos pacientes apresentaram alguma redução no valor sérico quando comparado à dosagem prévia a cirurgia. A média de redução no valor do FT foi de 41,6pg/ml com $p < 0,001$.

Para melhor avaliarmos esta redução do FT realizamos uma regressão linear através do coeficiente de Pearson e foi determinado que o tamanho do tumor esteve correlacionado com a redução do FT. A cada centímetro a mais no tamanho inicial da lesão houve um decréscimo de 4,72pg/ml do FT sérico ($p=0,037$). A Tabela 2 mostra outros fatores estudados que poderiam estar determinado a redução do FT, mas não atingiram correlação com significância estatística.

Tabela 2- Associação entre redução dos níveis séricos de FT e fatores prognósticos selecionados

Características	n	Estatística	p
Tamanho Tumor, cm	30	r= -0.382 b= -4.73	0.03 ^a
Necrose			
Ausente	24	-37.8±6.7	0.20 ^b
Presente	6	-56.8±11.6	
Grau Fuhrman			
1	4	-68.9±11.0	0.07 ^b
≥ 2	26	-37.4±6.3	
Estadio TNM			
I	22	-38.1±7.0	0.32 ^b
≥II	8	-51.5±31.1	

Legenda : r= coeficiente de Pearson; b= coeficiente angular a=regressão linear; b=análise de covariância; Números negativos em variáveis categóricas: quanto maior o número maior a intensidade da associação com a dosagem sérica do FT.
p: significância estatística. ± sinal representa média ± erro padrão.

Discussão

Nosso estudo tem como objetivo estudar um potencial biomarcador em neoplasias renais. Até agora, nenhum marcador séricoproveu ser clinicamente útil no carcinoma de células claras de rim. Mostramos pela primeira vez que, no contexto pré-operatório, os pacientes com CCCr têm níveis de FT no soro três vezes maiores do que aqueles de pacientes com doenças benignas. Além disso, demonstramos que ocorre uma redução de três vezes nos níveis de FT no soro no quadro pós-operatório de pacientes com CCCr após pelo menos quatro semanas da remoção cirúrgica do tumor. Estes achados sugerem que os níveis séricos de FT podem ser clinicamente úteis como marcadores da presença de CCCr.

A idéia de testar esse marcador no soro de pacientes com CCCr não foi aleatória. Estudamos previamente a expressão imunohistoquímica de FT em amostras tumorais de pacientes com tumores de Wilms e em amostras tumorais de pacientes com CCCr. Nas amostras de pacientes com tumores de Wilms, a expressão aumentada de FT foi um fator prognóstico independente de sobrevida global (HR 5,6; $p < 0,01$) (Maciel, 2009). Em amostras de pacientes com carcinoma de células claras, a expressão aumentada de FT também foi um preditor independente da sobrevida global (HR 4,03; $p = 0,03$) (Silva, 2014). Förster et al. já estudaram o FT tanto no tecido quanto no soro de pacientes com CCR. Os autores não encontraram diferença na expressão de FT nas amostras tumorais de pacientes com CCR em comparação com amostras de tecido normal do mesmo rim. Além disso, não encontraram diferença estatística significativa nos níveis séricos de FT de pacientes com CCR comparado a indivíduos saudáveis (Forster, 2003). A razão para estes resultados discordantes ainda não foi explicada.

Observamos uma redução acentuada dos níveis séricos de FT no pós-

operatório em todos os nossos pacientes com carcinoma de células claras, com redução média de 41pg / ml ($p < 0,001$). O tamanho do tumor esteve correlacionado com a redução dos níveis séricos de FT, de tal forma que, para cada centímetro da lesão primária, houve uma redução média de 4,72 pg / ml no FT no soro no pós-operatório. Outras variáveis prognósticas como TNM, grau de Fuhrman e presença de necrose foram testadas para correlação com a queda do FT por análise de covariância, mas não tiveram significância estatística. Os números mostraram valores negativos expressivos com uma tendência de correlação positiva com estes fatores. A amostra reduzida de pacientes e a predominância de pacientes com doença inicial (por exemplo, TNM I = 73,3%) podem ter contribuído para esses achados.

A dosagem sérica do FT já foi realizada em diversas pesquisas clínicas. A técnica ELISA é a metodologia mais comum de teste de FT no soro (American Diagnostic and R & D). Um dos problemas nestes testes de ELISA é que a variação sérica em indivíduos saudáveis é bem grande. Nestes kits, os níveis normais em pessoas saudáveis podem variar de 27 a 172 pg/ml. Key e Mackmann em seus trabalhos descreve em indivíduos saudáveis uma média de 27 pg/ml.(Key, 2010). Já Albrecht et al, em estudo com dois anticorpos monoclonais chegou ao valor médio de FT sérico de 172 pg/ml em indivíduos saudáveis. (Albrecht, 1996). Han et al já estudaram níveis séricos de FT em mulheres com lesões ovarianas benignas, lesões ovarianas de comportamento incerto e câncer de ovário. Neste estudo, os níveis séricos médios de TF foram de 85,2 pg / ml no câncer de ovário, um valor muito maior do que a média de 12,8 pg / ml encontrado em pacientes com doenças ovarianas benignas ($p < 0,01$). Valores superiores a 190 pg / ml foram correlacionados com pior prognóstico e mortalidade específica do câncer (3-4 vezes maior, $p = 0,01$) (Han, 2006). Em outro estudo, Zwicker et al avaliaram o FT sérico com a técnica de micropartículas (MP-TF) em pacientes com câncer de pâncreas. Neste

estudo, houve correlação entre os níveis séricos de MP-TF eo risco de tromboembolismo e de mortalidade específica de câncer. Em três pacientes, o MP-TF foi indetectável após a remoção cirúrgica do pâncreas (Zwicker, 2009).

Nosso estudo tem várias limitações. Em primeiro lugar, testamos um pequeno número de doentes seleccionados com carcinoma de células claras. Estudos maiores são necessários para corroborar nossos achados. Em segundo lugar, uma vez que o nosso estudo foi prospectivo eo seguimento é curto, não temos dados de sobrevida ou mortalidade a longo prazo para avaliar como medidas de resultado. Este será provavelmente o tema de mais pesquisas. Por fim, não analisamos neste estudo a expressão tecidual de FT por técnicas de imunohistoquímica ou de reação em cadeia da polimerase nas amostras de carcinoma de células claras.

Nossos resultados devem ser validados por estudos com um maior número de pacientes para verificar sua aplicabilidade clínica real. No entanto, acreditamos que este é um estudo gerador de hipóteses que pode levar a descobertas clinicamente úteis. A utilidade da FT no soro como marcador da presença de doença pode auxiliar na avaliação mais precisa de pequenas massas renais, lesões císticas complexas, oncocitomas e angiomiolipomas. As determinações do FT no soro também podem ser potencialmente utilizadas como uma ferramenta de seguimento no CCCr.

Conclusões

O FT dosado no período pré-operatório de pacientes com CCCr comparado com pacientes sem CCCr foi estatisticamente significativo mais alto nos pacientes com neoplasia (66,8pg/ml *versus* 28,4pg/ml) com $p < 0,001$. Uma diferença média três vezes maior. Outro achado é que houve uma redução significativa do FT sérico no pós-operatório dos pacientes com CCCr. Uma redução média de 41pg/ml com $p < 0,001$.

A variável em estudo que esteve mais correlacionado com esta queda do FT no pós-operatório foi o tamanho do tumor, obtido após uma regressão linear com $p = 0,037$.

Nosso trabalho conclui que o FT pode ser utilizado como biomarcador em CCCr.

Bibliografia

ABDULKADIR, S. A., G. F. CARVALHAL, et al. Tissue factor expression and angiogenesis in human prostate carcinoma. **Human pathology**, v.31, n.4, p.443-447. 2000.

AMIN, C.; MACKMAN, N.; KEY, N. S. Microparticles and cancer. **Pathophysiology of haemostasis and thrombosis**, v. 36, n. 3-4, p. 177-183, 2007. ISSN 1424-8840.

AMIRKHOSRAVI, A. et al. Tissue factor pathway inhibitor reduces experimental lung metastasis of B16 melanoma. **Thromb Haemost**, v. 87, n. 6, p. 930-6, Jun 2002. ISSN 0340-6245 (Print)

0340-6245 (Linking). Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12083498](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12083498)>.

ANAND, M.; BRAT, D. J. Oncogenic regulation of tissue factor and thrombosis in cancer. **Thromb Res**, v. 129 Suppl 1, p. S46-9, Apr 2012. ISSN 1879-2472. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22682132>>.

ARNAUD, E. et al. Polymorphisms in the 5' regulatory region of the tissue factor gene and the risk of myocardial infarction and venous thromboembolism: the ECTIM and PATHROS studies. Etude Cas-Témoins de l'Infarctus du Myocarde. Paris Thrombosis case-control Study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, n. 3, p. 892-8, Mar 2000. ISSN 1079-5642. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10712418>>.

ATKINS, M. et al. Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome of interleukin 2 therapy for renal cancer. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 10, p. 3714-21, May 2005. ISSN 1078-0432. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15897568>>.

ATKINSON, B. J. et al. Clinical outcomes for patients with metastatic renal cell carcinoma treated with alternative sunitinib schedules. **J Urol**, v. 191, n. 3, p. 611-8, Mar 2014. ISSN 1527-3792. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24018239>>.

BALASUBRAMANIAN, S. et al. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 30, n. 6, p. 593-601, 2004. ISSN 0748-7983.

BICK, R. L. Cancer-associated thrombosis. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 2, p. 109-110, 2003. ISSN 0028-4793.

BLOM, J. H. et al. Radical nephrectomy with and without lymph-node dissection: final

results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) randomized phase 3 trial 30881. **Eur Urol**, v. 55, n. 1, p. 28-34, Jan 2009. ISSN 1873-7560. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18848382>>.

BOGDANOV, V. Y. et al. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. **Nat Med**, v. 9, n. 4, p. 458-62, Apr 2003. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12652293>.

BRAHMER, J. R. et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. **N Engl J Med**, v. 366, n. 26, p. 2455-65, Jun 2012. ISSN 1533-4406. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22658128>>.

BRUYÈRE, F. et al. VEGF polymorphisms are associated with an increasing risk of developing renal cell carcinoma. **The Journal of urology**, v. 184, n. 4, p. 1273-1278, 2010. ISSN 0022-5347.

CALLE, E. E.; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 8, p. 579-91, Aug 2004. ISSN 1474-175X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286738>>.

CAMERER, E.; HUANG, W.; COUGHLIN, S. R. Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 10, p. 5255-60, May 9 2000. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10805786>.

CHAND, H. S.; NESS, S. A.; KISIEL, W. Identification of a novel human tissue factor splice variant that is upregulated in tumor cells. **Int J Cancer**, v. 118, n. 7, p. 1713-20, Apr 1 2006. ISSN 0020-7136 (Print) 0020-7136 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16217771>.

CHEN, L. et al. The Impact of Diabetes Mellitus on Renal Cell Carcinoma Prognosis: A Meta-Analysis of Cohort Studies. **Medicine (Baltimore)**, v. 94, n. 26, p. e1055, Jul 2015. ISSN 1536-5964. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26131819>>.

CHOUËIRI, T. K. Factors associated with outcome in patients with advanced renal cell carcinoma in the era of antiangiogenic agents. **Clin Genitourin Cancer**, v. 6, n. 1, p. 15-20, Mar 2008. ISSN 1558-7673. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18501077>>.

DECASTRO, G. J.; MCKIERNAN, J. M. Epidemiology, clinical staging, and presentation of renal cell carcinoma. **Urol Clin North Am**, v. 35, n. 4, p. 581-92; vi, Nov 2008. ISSN 0094-0143. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18992612>>.

DELAHUNT, BE, JN. History of the Development of Classification of Renal Cell Neoplasia. **Clin Lab Med**. 2005;25:231-46.

DENG, F. M.; MELAMED, J. Histologic variants of renal cell carcinoma: does tumor type influence outcome? **Urol Clin North Am**, v. 39, n. 2, p. 119-32, v, May 2012. ISSN 1558-318X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22487756>>.

DORNBUSCH, J. et al. Analyses of potential predictive markers and survival data for a response to sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e76386, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24086736>>.

DVORAK, H. F. et al. Procoagulant activity associated with plasma membrane vesicles shed by cultured tumor cells. **Cancer Res**, v. 43, n. 9, p. 4434-42, Sep 1983. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6347372>.

EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. **Ann Surg Oncol**, v. 17, n. 6, p. 1471-4, Jun 2010. ISSN 1534-4681. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20180029>>.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-E386, 2015. ISSN 1097-0215.

FLANIGAN, R. C. et al. Nephrectomy followed by interferon alfa-2b compared with interferon alfa-2b alone for metastatic renal-cell cancer. **N Engl J Med**, v. 345, n. 23, p. 1655-9, Dec 2001. ISSN 0028-4793. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11759643>>.

FORSTER, Y. et al. Tissue specific expression and serum levels of human tissue factor in patients with urological cancer. **Cancer Lett**, v. 193, n. 1, p. 65-73, Apr 10 2003. ISSN 0304-3835 (Print) 0304-3835 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12691825>.

FUHRMAN, S. A.; LASKY, L. C.; LIMAS, C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. **The American journal of surgical pathology**, v. 6, n. 7, p. 655-664, 1982. ISSN 0147-5185.

FYFE, G. et al. Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. **J Clin Oncol**, v. 13, n. 3, p. 688-96, Mar 1995. ISSN 0732-183X. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7884429>>.

GERLINGER, M. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. **N Engl J Med**, v. 366, n. 10, p. 883-92, Mar 2012. ISSN 1533-4406. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22397650>>.

GERTOW, K. et al. Tissue factor gene promoter haplotype associates with carotid intima-media thickness in subjects in cardiovascular risk prevention. **Atherosclerosis**, v. 207, n. 1, p. 168-73, Nov 2009. ISSN 1879-1484. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19515372>>.

GONZALGO, M. L. et al. Molecular profiling and classification of sporadic renal cell carcinoma by quantitative methylation analysis. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 21, p. 7276-83, Nov 2004. ISSN 1078-0432. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15534102>>.

GRIGNON, D. J.; CHE, M. Clear cell renal cell carcinoma. **Clin Lab Med**, v. 25, n. 2, p. 305-16, Jun 2005. ISSN 0272-2712. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15848738>>.

GROSSMANN, R. et al. Genetic risk factors in young adults with 'cryptogenic' ischemic cerebrovascular disease. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 13, n. 7, p. 583-90, Oct 2002. ISSN 0957-5235. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12439143>>.

HAN, L. Y. et al. Preoperative serum tissue factor levels are an independent prognostic factor in patients with ovarian carcinoma. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 5, p. 755-61, Feb 10 2006. ISSN 1527-7755 (Electronic) 0732-183X (Linking). Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16380413](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16380413)>.

_____. Preoperative serum tissue factor levels are an independent prognostic factor in patients with ovarian carcinoma. **Journal of clinical oncology**, v. 24, n. 5, p. 755-761, 2006. ISSN 0732-183X.

HANSEL, D. E.; RINI, B. I. Molecular genetics of hereditary renal cancer: new genes and diagnostic and therapeutic opportunities. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 8, n. 6, p. 895-905, Jun 2008. ISSN 1744-8328. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18533799>>.

HEIT, J. A. Cancer and venous thromboembolism: scope of the problem. **Cancer control**, v. 12, p. 5, 2005. ISSN 1073-2748.

HERREM, C. J. et al. Expression of EphA2 is prognostic of disease-free interval and overall survival in surgically treated patients with renal cell carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 1, p. 226-31, Jan 01 2005. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432.

HUDES, G. R. mTOR as a target for therapy of renal cancer. **Clin Adv Hematol Oncol**, v. 5,

n. 10, p. 772-4, Oct 2007. ISSN 1543-0790. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17998894>>.

HUNT, J. D. et al. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. **Int J Cancer**, v. 114, n. 1, p. 101-8, Mar 2005. ISSN 0020-7136. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15523697>>.

ISADA, A. et al. A functional polymorphism (-603A --> G) in the tissue factor gene promoter is associated with adult-onset asthma. **J Hum Genet**, v. 55, n. 3, p. 167-74, Mar 2010. ISSN 1435-232X. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20150920>>.

JUNIOR, A.N.; FILHO, M.Z.; REIS, R.B. **Urologia fundamental - Sociedade Brasileira de Urologia**. 1ª edição. São Paulo: Planark, 2010. 422 p.

JONASCH, E.; GAO, J.; RATHMELL, W. K. Renal cell carcinoma. **BMJ**, v. 349, p. g4797, 2014. ISSN 1756-1833. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25385470>>.

KAELIN, W. G. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and clear cell renal carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 2 Pt 2, p. 680s-684s, Jan 2007. ISSN 1078-0432. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17255293>>.

KASTHURI, R. S.; TAUBMAN, M. B.; MACKMAN, N. Role of tissue factor in cancer. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 29, p. 4834-8, Oct 10 2009. ISSN 1527-7755 (Electronic) 0732-183X (Linking). Disponível em:
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19738116](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=19738116)>.

KEY, N. S.; MACKMAN, N. Tissue factor and its measurement in whole blood, plasma, and microparticles. **Semin Thromb Hemost**, v. 36, n. 8, p. 865-75, Nov 2010. ISSN 1098-9064. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21049387>>.

KHORANA, A. A. et al. Tissue factor expression, angiogenesis, and thrombosis in pancreatic cancer. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 10, p. 2870-5, May 15 2007. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432 (Linking). Disponível em:
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17504985](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17504985)>.

KIM, S. P. et al. Comparative effectiveness for survival and renal function of partial and radical nephrectomy for localized renal tumors: a systematic review and meta-analysis. **The Journal of urology**, v. 188, n. 1, p. 51-57, 2012. ISSN 0022-5347.

KOCATÜRK, B. M.; VERSTEEG, H. H. Tissue factor isoforms in cancer and coagulation: May the best isoform win. **Thrombosis Research**, v. 129, Supplement 1, n. 0, p. S69-S75, ISSN 0049-3848. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0049384812700208>>.

LANE, B. R.; KATTAN, M. W. Prognostic models and algorithms in renal cell carcinoma. **Urol Clin North Am**, v. 35, n. 4, p. 613-25; vii, Nov 2008. ISSN 0094-0143. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18992615>>.

LANGNER, C. et al. Biological significance of p27 and Skp2 expression in renal cell carcinoma. A systematic analysis of primary and metastatic tumour tissues using a tissue microarray technique. **Virchows Arch**, v. 445, n. 6, p. 631-6, Dec 2004. ISSN 0945-6317 (Print) 0945-6317.

LARSSON, S.; WOLK, A. Diabetes mellitus and incidence of kidney cancer: a meta-analysis of cohort studies. **Diabetologia**, v. 54, n. 5, p. 1013-1018, 2011. ISSN 0012-186X.

LIPWORTH, L.; TARONE, R. E.; MCLAUGHLIN, J. K. The epidemiology of renal cell carcinoma. **J Urol**, v. 176, n. 6 Pt 1, p. 2353-8, Dec 2006. ISSN 0022-5347. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17085101>>.

LIU, Y.; MUELLER, B. M. Protease-activated receptor-2 regulates vascular endothelial growth factor expression in MDA-MB-231 cells via MAPK pathways. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 344, n. 4, p. 1263-1270, 2006. ISSN 0006-291X.

LJUNGBERG, B. et al. The epidemiology of renal cell carcinoma. **Eur Urol**, v. 60, n. 4, p. 615-21, Oct 2011. ISSN 1873-7560. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21741761>>.

MACIEL, E. O. et al. Increased tissue factor expression and poor nephroblastoma prognosis. **J Urol**, v. 182, n. 4, p. 1594-9, Oct 2009. ISSN 0022-5347.

MACKMAN, N.; TILLEY, R. E.; KEY, N. S. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 8, p. 1687-93, Aug 2007. ISSN 1524-4636. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17556654>>.

MEKHAIL, T. M. et al. Validation and extension of the Memorial Sloan-Kettering prognostic factors model for survival in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 4, p. 832-41, Feb 2005. ISSN 0732-183X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15681528>>.

MOREL, O. et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 12, p. 2594-604, Dec 2006. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642 (Linking). Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16990554](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16990554)>.

MOTZER, R. J.; BANDER, N. H.; NANUS, D. M. Renal-cell carcinoma. **N Engl J Med**, v. 335, n. 12, p. 865-75, Sep 1996. ISSN 0028-4793. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8778606>>.

MOTZER, R. J. et al. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 8, p. 2530-2530, 1999. ISSN 0732-183X.

_____. Renal cell carcinoma. **Curr Probl Cancer**, v. 21, n. 4, p. 185-232, 1997 Jul-Aug 1997. ISSN 0147-0272. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9285186>>.

MUNDT, K. A.; BIRK, T.; BURCH, M. T. Critical review of the epidemiological literature on occupational exposure to perchloroethylene and cancer. **International archives of occupational and environmental health**, v. 76, n. 7, p. 473-491, 2003. ISSN 0340-0131.

MÄLARSTIG, A. et al. Genetic variations in the tissue factor gene are associated with clinical outcome in acute coronary syndrome and expression levels in human monocytes. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, n. 12, p. 2667-72, Dec 2005. ISSN 1524-4636. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16239598>>.

NARDI, A. C. et al. Epidemiologic characteristics of renal cell carcinoma in Brazil. **International braz j urol**, v. 36, n. 2, p. 151-158, 2010. ISSN 1677-5538.

NETWORK, C. G. A. R. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. **Nature**, v. 499, n. 7456, p. 43-9, Jul 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23792563>>.

NITORI, N. et al. Prognostic significance of tissue factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 7, p. 2531-9, Apr 1 2005. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15814630>.

OTT, I. et al. Tissue factor promotor polymorphism -603 A/G is associated with myocardial infarction. **Atherosclerosis**, v. 177, n. 1, p. 189-91, Nov 2004. ISSN 0021-9150. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15488883>>.

PARKER, A. S. et al. Pathologic T1 clear cell renal cell carcinoma: insulin-like growth factor-I receptor expression and disease-specific survival. **Cancer**, v. 100, n. 12, p. 2577-82, Jun 15 2004. ISSN 0008-543X (Print) 0008-543x.

PAULE, B.; BRION, N. Efficacy of sunitinib in patients with renal cell carcinoma with bone metastases. **Anticancer Res**, v. 30, n. 12, p. 5165-8, Dec 2010. ISSN 1791-7530. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21187506>>.

PFAFFENROTH, E. C.; LINEHAN, W. M. Genetic basis for kidney cancer: opportunity for disease-specific approaches to therapy. **Expert Opin Biol Ther**, v. 8, n. 6, p. 779-90, Jun

2008. ISSN 1744-7682. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18476789>>.

RENEHAN, A. G. et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. **Lancet**, v. 371, n. 9612, p. 569-78, Feb 2008. ISSN 1474-547X. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18280327>>.

RENY, J. L. et al. The TF-603A/G gene promoter polymorphism and circulating monocyte tissue factor gene expression in healthy volunteers. **Thromb Haemost**, v. 91, n. 2, p. 248-54, Feb 2004. ISSN 0340-6245. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14961150>>.

RITCHIE, A. W.; CHISHOLM, G. D. The natural history of renal carcinoma. **Semin Oncol**, v. 10, n. 4, p. 390-400, Dec 1983. ISSN 0093-7754. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6665566>>.

ROLLIN, J.; REGINA, S.; GRUEL, Y. Tumor expression of alternatively spliced tissue factor is a prognostic marker in non-small cell lung cancer. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 8, n. 3, p. 607-610, 2010. ISSN 1538-7836.

RUF, W. Tissue factor and PAR signaling in tumor progression. **Thromb Res**, v. 120 Suppl 2, p. S7-12, 2007. ISSN 0049-3848 (Print)
0049-3848 (Linking). Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18023716>.

SAWADA, M. et al. Expression of tissue factor in non-small-cell lung cancers and its relationship to metastasis. **Br J Cancer**, v. 79, n. 3-4, p. 472-7, Feb 1999. ISSN 0007-0920 (Print)
0007-0920 (Linking). Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10027315>.

SCHMIDT, L. S.; LINEHAN, W. M. Molecular genetics and clinical features of Birt-Hogg-Dubé syndrome. **Nat Rev Urol**, v. 12, n. 10, p. 558-69, Oct 2015. ISSN 1759-4820. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26334087>>.

SCHULMAN, S.; LINDMARKER, P. Incidence of cancer after prophylaxis with warfarin against recurrent venous thromboembolism. Duration of Anticoagulation Trial. **N Engl J Med**, v. 342, n. 26, p. 1953-8, Jun 29 2000. ISSN 0028-4793 (Print)
0028-4793 (Linking). Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10874063>.

SELIGSON, D. B. et al. Epithelial cell adhesion molecule (KSA) expression: pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 8, p. 2659-69, Apr 15 2004. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 1, p. 7-30, Jan ISSN 1542-4863 (Electronic) 0007-9235 (Linking).

_____. Cancer statistics, 2016. **CA: A cancer journal for clinicians**, 2015. ISSN 1542-4863.

SILVA, D. D. O. et al. Increased Tissue Factor Expression is an Independent Predictor of Mortality in Clear Cell Carcinoma of the Kidney. **International braz j urol**, v. 40, n. 4, p. 499-506, 2014. ISSN 1677-5538.

SPICER, E. K. et al. Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 15, p. 5148-5152, 1987. ISSN 0027-8424.

TELOKEN, P. E. et al. Prognostic impact of histological subtype on surgically treated localized renal cell carcinoma. **J Urol**, v. 182, n. 5, p. 2132-6, Nov 2009. ISSN 1527-3792. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19758615>>.

TESSELAAR, M. E. et al. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? **J Thromb Haemost**, v. 5, n. 3, p. 520-7, Mar 2007. ISSN 1538-7933 (Print) 1538-7836 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17166244>.

THALER, J. et al. Microparticle-associated tissue factor activity, venous thromboembolism and mortality in pancreatic, gastric, colorectal and brain cancer patients. **J Thromb Haemost**, v. 10, n. 7, p. 1363-70, Jul 2012. ISSN 1538-7836. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22520016>>.

THOMPSON, R. H. et al. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. **Cancer**, v. 104, n. 10, p. 2084-91, Nov 15 2005. ISSN 0008-543X (Print) 0008-543x.

TICKOO, S. K.; REUTER, V. E. Differential diagnosis of renal tumors with papillary architecture. **Adv Anat Pathol**, v. 18, n. 2, p. 120-32, Mar 2011. ISSN 1533-4031. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21326010>>.

TORO, J. R. et al. Mutations in the fumarate hydratase gene cause hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer in families in North America. **Am J Hum Genet**, v. 73, n. 1, p. 95-106, Jul 2003. ISSN 0002-9297. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12772087>>.

VAN DEN BERG, Y. W. et al. The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench and bedside. **Blood**, v. 119, n. 4, p. 924-32, Jan 26 2011. ISSN 1528-0020 (Electronic)

0006-4971 (Linking). Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22065595>.

VAN DER VELDT, A. A. et al. Genetic polymorphisms associated with a prolonged progression-free survival in patients with metastatic renal cell cancer treated with sunitinib. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 3, p. 620-629, 2011. ISSN 1078-0432.

VERSTEEG, H. H.; PEPPELENBOSCH, M. P.; SPEK, C. A. The pleiotropic effects of tissue factor: a possible role for factor VIIa-induced intracellular signalling? **Thromb Haemost**, v. 86, n. 6, p. 1353-9, Dec 2001. ISSN 0340-6245 (Print)
0340-6245 (Linking). Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11776298>.

VERSTEEG, H. H. et al. Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth. **Blood**, v. 111, n. 1, p. 190-9, Jan 1 2008. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17901245>.

WANG, J. G. et al. Tumor-derived tissue factor activates coagulation and enhances thrombosis in a mouse xenograft model of human pancreatic cancer. **Blood**, v. 119, n. 23, p. 5543-52, Jun 2012. ISSN 1528-0020. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22547577>>.

WÜNSCH-FILHO, V. Insights on diagnosis, prognosis and screening of renal cell carcinoma. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 120, n. 6, p. 163-164, 2002. ISSN 1516-3180.

XIE, Y. et al. Prognostic and Clinicopathological Significance of Survivin Expression in Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Sci Rep**, v. 6, 2016.

XU, C. et al. IL8 polymorphisms and overall survival in pazopanib-or sunitinib-treated patients with renal cell carcinoma. **British journal of cancer**, v. 112, n. 7, p. 1190-1198, 2015. ISSN 0007-0920.

XU, C.-F. et al. Pazopanib efficacy in renal cell carcinoma: evidence for predictive genetic markers in angiogenesis-related and exposure-related genes. **Journal of clinical oncology**, p. JCO. 2010.32. 9110, 2011. ISSN 0732-183X.

YANG, J. C. et al. Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 16, p. 3127-3132, 2003. ISSN 0732-183X.

YU, J. L. et al. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1734-41, Feb 15 2005. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15484444>.

[ation&list_uids=15494427>](#).

ZHANG, Y. et al. Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. **J Clin Invest**, v. 94, n. 3, p. 1320-7, Sep 1994. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7521887>.

ZNAOR, A. et al. International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. **Eur Urol**, v. 67, n. 3, p. 519-30, Mar 2015. ISSN 1873-7560. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25449206>>.

ZWICKER, J. I. et al. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 22, p. 6830-6840, 2009. ISSN 1078-0432.

Apêndice 1



Porto Alegre, 07 de abril de 2014.

Senhor (a) Pesquisador(a)

A Comissão Científica da Faculdade de Medicina e do Hospital São Lucas da PUCRS aprovou o trabalho intitulado "Avaliação da concentração sérica do fator tecidual (FT) no carcinoma de células claras de rim".

O projeto, assim como todos os documentos que o acompanharam, os quais receberam a presente aprovação, devem ser submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa /PUCRS, nas mesmas versões apresentadas a esta Comissão.

Atenciosamente,


Rita Mattiello
Coordenadora da Comissão Científica
FAMED - HSL - PUCRS

Prof^a Dra Rita Mattiello
Coordenador da Comissão Científica
FAMED-HSL/PUCRS

Ao Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal
Professor orientador e responsável pelo projeto na Instituição.

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - P. 6º - 3º andar - CEP 90610-000
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3015 - Fax (51) 3320-3040
E-mail: medicina@pucrs.br
www.pucrs.br/medicina

Apêndice 2

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 783.321

fatores

prognósticos reconhecidos de neoplasia renal nos pacientes ao longo de 2 anos

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequados

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante desde o ponto de vista clínico e científico

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos apresentados:

Folha de rosto: apresentado;

Carta de conhecimento e autorização do responsável local: apresentado

Carta da Comissão Científica da FAMED: Apresentado

Orçamento financeiro: Solicitamos que o orçamento aprovado seja avaliado pelo CPC;

Currículo Lattes: Apresentado;

Projeto de pesquisa: Apresentado

Ficha de coleta de dados: apresentado;

TCLE: apresentado

Termo para utilização dos dados: apresentado

Recomendações:

Aprovar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
Bairro: Partenon CEP: 90.619-900
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 Fax: (51)3320-3345 E-mail: cep@pucrs.br

Página 04 de 05

Continuação do Parecer: 783.321

PORTO ALEGRE, 08 de Setembro de 2014

Assinado por:
Rodolfo Herberto Schneider
(Coordenador)

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Neste estudo será pesquisada a presença de uma proteína no seu sangue que parece estar associada ao desenvolvimento de tumores de rim, Além destas amostras (do seu sangue) serão coletados dados do seu prontuário (registros hospitalares) para que possamos analisar e correlacionar os achados laboratoriais da pesquisa desta com o diagnóstico que você apresentou durante a nossa avaliação,

Ao participar desta pesquisa você não terá prejuízo ou risco, uma vez que não será realizado nenhum tipo de procedimento ou exame além da coleta das amostras de sangue,este estudo não lhe proporcionará benefício imediato; entretanto, poderá ajudar em estudos futuros para a busca de melhores e novas formas de tratamentos para os pacientes com doenças do rim,

Fica assegurado a você o direito de não participar ou de retirar-se desta pesquisa a qualquer momento, sem que isso represente prejuízo ao seu atendimento médico hospitalar,também asseguramos total sigilo das informações obtidas,

Estou ciente de que caso eu tenha dúvidas relacionadas ao estudo, poderei entrar em contato com o pesquisador responsável por este estudo: Dr, Gustavo Franco Carvalhal pelo telefone (51) 99589026,para qualquer pergunta sobre meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso ligar para Comitê de Ética em Pesquisa do HSL/PUCRS (3320-3000),

Eu,

.....

„„„„„„„„„„, abaixo assinado declaro pleno conhecimento:

- do objetivo desta pesquisa;
- da utilização das amostras de sangue coletadas no HSL/PUCRS;
- que receberei respostas ou esclarecimentos a qualquer dúvida a cerca dos riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e meu tratamento individual;

- da liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuação do meu tratamento;

- que autorizo a utilização dos dados obtidos para pesquisa sem que eu seja identificado;

Que este termo é assinado em duas vias, ficando comigo uma das vias e outra com o pesquisador responsável,

De acordo,

Assinatura do paciente

Data

Assinatura do responsável

Data

Anexo 2

PROTOCOLO PESQUISA NEOPLASIA RENAL – FATOR TECIDUAL COMO MARCADOR
SOROLÓGICO

NMR: REG:

NOME: IDADE:

DATA NASC: DATA CIRURGIA: DATA ULT CONS/OBITO:

SEXO:

DOENÇAS PREGRESSAS/MEDIC:

HISTORIA FAMILIAR:

ESTADIAMENTO PRE-OP:

TAMANHO TUMOR TC OU RNM:

TNM ESTADIO:

GRAU FUHRMANN: INV LINF: INV VASC:

MARGENS:

DOSAGEM TF PREOP:

DOSAGEM TF POS OP (30DIAS):