



EXPRESSÃO DE CAIX EM CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS

ESTER DE MELO BRANDÃO; RAFAELA VIVIANE NEVES SILVA; REGIA
CAROLINE PEIXOTO LIRA

RESUMO

A pesquisa sobre biomarcadores no carcinoma de células renal (CCR) é fundamental para compreender a biologia do tumor e fornecer opções de terapia-alvo. Dentre várias moléculas promissoras, a Anidrase carbônica nove (CA9 / CAIX) é marcador de hipóxia e tem sua expressão descrita em diferentes tipos de câncer. Em CCR subtipo células claras, a alta expressão da CAIX tem sido relacionada com fenótipo menos agressivo do tumor, conferindo melhor prognóstico e resposta terapêutica. No entanto, sua aplicação na rotina diagnóstica não está consolidada, muito provavelmente, devido resultados controversos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão gênica e proteica de CA9/CAIX em CCR, associando os perfis de expressão com o prognóstico da doença, parâmetros histopatológicos, clínicos e subtipos histológicos de CCR. A metodologia incluiu a utilização da plataforma KM-Plotter para a análise da expressão gênica com dados de amostras de tumores, metástases e tecidos não neoplásicos, em mais de um banco de dados. Realizou-se imunohistoquímica para CAIX em uma coorte de CCR do HC-UFTM. Observou-se que, amostras tumorais e metastáticas apresentam expressão significativamente maior de CA9 do que amostras não neoplásicas. A baixa expressão CA9 foi associada com sobrevida global menor no subtipo CCRcc e maior sobrevida em CCRp (papilífero). Todas as amostras tiveram imunomarcagem positiva, sendo observada mais expressão nos subtipos células claras e papilífero. A expressão proteica mais elevada foi associada com graus de Fuhrman mais elevados (grau 1 *versus* 4). Não houve associação do perfil proteico com sobrevida dos pacientes. Nossos achados lançam dúvidas sobre a real importância da CAIX no prognóstico e progressão do CCR, sugerindo que a avaliação da CAIX em coortes com poucos casos de metástases pode não ser suficiente para inferir seu potencial valor como biomarcador.

Palavras-chave: Expressão; Imunohistoquímica; CA9; Biomarcador; Fuhrman.

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de células renais (CCR) é uma neoplasia maligna, que se origina em células epiteliais. É o câncer urológico mais letal e mais comum em seres humanos. Devido sua natureza assintomática, o diagnóstico é impreciso e muitas vezes acidental, quando a massa tumoral é identificada em exames de imagem de rotina (Comissão Permanente de Protocolos de Atenção à Saúde, 2019).

A carcinogênese renal tem progresso silencioso e 30% dos pacientes apresentam metástase ao diagnóstico. Além disso, 30% dos casos com doença localizada desenvolvem metástase com o tempo (Corgna *et al.*, 2007). A sobrevida em cinco anos é de apenas 12% para pacientes com metástases à distância e de 80% para aqueles com tumor localizado (Rasmussen, 2013). Um dos parâmetros histopatológicos associados com a agressividade é o grau de Fuhrman, que classifica as alterações morfológicas dos núcleos celulares em quatro graus. O grau 1 corresponde a células pequenas com núcleos redondos, uniformes e quase ou sem nucléolos; No grau 2 os núcleos são desuniformes e possuem nucléolos; No grau 3 os núcleos

são heterogêneos com nucléolos grandes e, no grau 4, os núcleos são multilobulados e apresentam aglomerados de cromatina. Além disso, baseado no tamanho do tumor, presença de linfonodos acometidos pela neoplasia e presença de metástase à distância, faz-se o estadiamento TNM da doença, importante para prever a sobrevida do paciente, sendo os estádios 1 e 2 associados com sobrevida geral em cinco anos de 80% a 90% (Erdogan; Demirel; Polat, 2004). Os tipos histológicos mais comuns são o de células claras (CCRcc), papilares (CCRp) e cromófobos (CCRcr). O subtipo células claras possui prognóstico desfavorável e compreende cerca de 80% dos diagnósticos (Yu *et al.*, 2020). O papilar corresponde de 10% a 15% dos diagnósticos e possui dois subtipos (1 e 2), sendo o tipo 1 de melhor prognóstico do que o tipo 2. O cromóforo representa 5% a 10% dos diagnósticos, com prognóstico mais favorável comparado aos subtipos anteriores (Brasil, 2023).

O CCRcc é caracterizado pela inativação bialélica do gene von Hippel Lindau (VHL), em mais de 80% dos casos. Quando se tem inativação do *VHL*, este não reconhece HIF-1, que por sua vez, não é degradado e transloca para o núcleo. No núcleo, o HIF-1 induz a transcrição de múltiplos genes, promovendo o crescimento e sobrevivência celular. Dentre os genes regulados pelo fator induzível por hipóxia 1 (HIF-1), destaca-se a anidrase carbônica nove (CA9), que codifica a proteína CAIX, marcador clássico de hipóxia tumoral (Takacova *et al.*, 2012). A CAIX é membro de uma família da anidrases carbônicas, e atua no transporte transmembrana de CO₂ e na regulação do pH intracelular e extracelular. Sua expressão proteica já foi descrita em câncer de pulmão, gástrico, mama, colo do útero e CCR, dentre outros (Courcier *et al.*, 2020). Em CCRcc, estudos sugerem que a alta expressão da CAIX está relacionada com fenótipo menos agressivo do tumor, conferindo melhor prognóstico e resposta terapêutica, enquanto sua baixa expressão sugere fenótipo mais agressivo. Considerando a inativação do *VHL* nos casos de CCRcc, espera-se que a desregulação na expressão da CAIX ocorra independente da hipóxia tumoral (Takacova, *et al.*, 2012). No entanto, a CAIX não é biomarcador consolidado no diagnóstico histopatológico de CCR, nem tem sido investigada nos demais subtipos tumorais.

Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a expressão gênica e proteica da anidrase carbônica 9, associando o padrão de expressão com fatores prognósticos e de agressividade tumoral.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido no setor de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas e Naturais (ICBN) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Foram realizadas análises *in silico* da expressão da *CA9*, utilizando bancos de dados da plataforma KM-Plotter (<https://kmplot.com/analysis/>). A expressão gênica foi avaliada de acordo com características histopatológicas e sobrevida dos pacientes. Utilizou-se a base de dados da GEO (Bartha; Györfy, 2021) com 277 tecidos renais não neoplásicos (NN), 556 tumores e 58 tumores metastáticos. Diferenças entre NN e tecidos tumorais (117 NN *versus* 535 CCRcc; 77 NN *versus* 289 CCRp; 69 NN *versus* 65 CCRcr), bem como sobrevida geral (SG) e livre de recidiva foram avaliadas na base de dados Pan-cancer RNAseq do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), (Nagy Á *et al.*, 2021).

Realizou-se imunohistoquímica para CAIX em uma coorte local de CCR (n=117) do Hospital das Clínicas (HC) da UFTM. Amostras representativas dos tumores foram utilizadas para confecção de blocos de *Tissue Microarray* (TMA), com dois fragmentos tumorais de cada caso. O controle positivo foi um caso CCRcc. Como controle negativo, realizou-se a substituição do anticorpo primário por solução de albumina bovina a 4%. A imunomarcação foi analisada pelo método semi-quantitativo. Para intensidade de marcação, pontuou-se 0 = negativo; 1 = fraco; 2 = moderado; 3 = forte. Para quantidade de células positivas foi definido 0 = negativo; 1 = <10%; 2 = 10-50%; 3 = 51-80%; 4 = >80%. O escore de expressão foi definido

pela multiplicação entre os valores de intensidade e porcentagem de células (Lin *et al.*, 2018; Eckert *et al.*, 2019). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro- UFTM- parecer nº: 4.981.821 de 17 de setembro de 2021.

As análises estatísticas foram realizadas nos softwares IBM®SPSS®v.20 e GraphPad Prism versão 7.0. Adotou-se valor $\alpha = 0,05$. Associações entre a expressão proteica e dados clínicos/histopatológicos foram realizadas pelos testes chi-quadrado, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Análises de sobrevida foram realizadas com curvas de Kaplan-Meier e teste log-rank. Para a expressão gênica, considerou-se o padrão de expressão alto/baixo. Já na análise da expressão proteica, o padrão de expressão positivo / negativo foi baseado no escore de expressão.

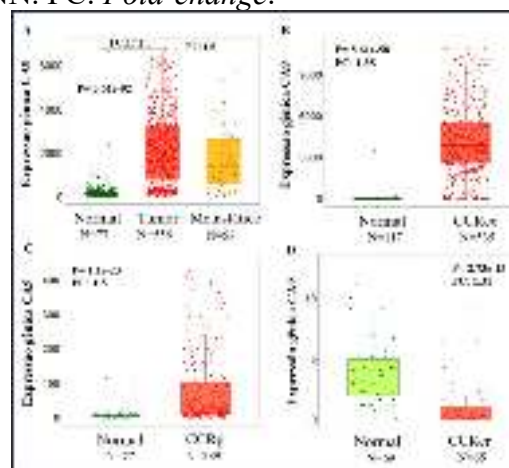
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria dos casos avaliados por imuno-histoquímica era subtipo células claras (77,9%), seguido do papilar (16,6%) e cromofóbo (4,6%). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) descrevem 16 subtipos histológicos de CCR, sendo o CCRcc, CCRp e o CCRcr correspondentes a 75-80%, 15-20% e 5% dos casos respectivamente (Lindgren *et al.*, 2018).

Apesar das terapias direcionadas à inibição das vias de angiogênese e imunoterapias terem eficácia, especialmente para CCRcc com metástases. A falta de marcadores prognósticos consolidados persiste como uma lacuna na literatura e na prática clínica. Portanto, a busca por marcadores precisos que possam prever a progressão da doença e sua resposta ao tratamento continua como desafio (Apanovich *et al.*, 2021). Neste contexto, a relação da Anidrase carbônica nove (CA9/CAIX) com a sobrevivência das células cancerígenas e sua influência na resistência ao tratamento, sugere potencial indicador prognóstico (Courcier *et al.*, 2020; Stillbroer *et al.*, 2010). A investigação em CCR é relevante porque no subtipo células claras, a expressão da CAIX pode ser desencadeada tanto pela inativação do gene supressor de tumor *VHL* quanto pela hipóxia (Stillbroer *et al.*, 2010).

Observamos expressão elevada e mais significativa do gene *CA9* nos tecidos tumorais e com metástases em comparação com tecidos normais. Tanto o CCRcc quanto o CCRp exibiram maior expressão do que os tecidos NN, sendo o CCRcc o que mais expressou, semelhante aos achados em estudo anterior, Figura 1, (Apanovich *et al.*, 2021).

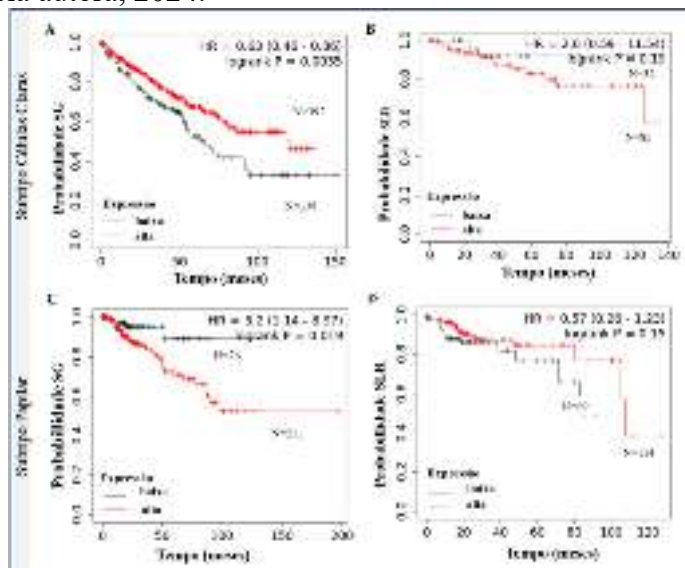
Figura 1. Expressão gênica de *CA9* em amostras tumorais, não neoplásicas (NN) e metastáticas. A) Observou-se maior expressão no Tumor, seguido pelas amostras com metástase. B) Expressão elevada nos tumores CCRcc comparados ao NN. C) Maior expressão no tumor subtipo CCRp em relação aos tecidos NN. D) CCRcr expressa menos *CA9* em comparação com tecidos NN. FC: *Fold-change*.



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

De maneira interessante, a baixa expressão de *CA9* teve associação com menor sobrevida global dos pacientes nos subtipos CCRcc (Figura 2A). O que se mostrou de maneira oposta para o CCRp (Figura 2C). A expressão de *CA9* não caracterizou diferenças na sobrevida livre de recorrência (Figuras 2B e 2D).

Figura 2. A) Associação entre baixa expressão de *CA9* e menor sobrevida global (SG) no CCRcc. B) Sobrevida livre de recorrência (SLR) no subtipo CCRcc. C) Alta expressão de *CA9* associada a menor SG no CCRp. D) Ausência de associação entre SLR e expressão de *CA9* no CCRp. HR: *hazard ratio*. SG: Sobrevida global. SLR: Sobrevida livre de recorrência. Fonte: Elaborada pela autora, 2024.



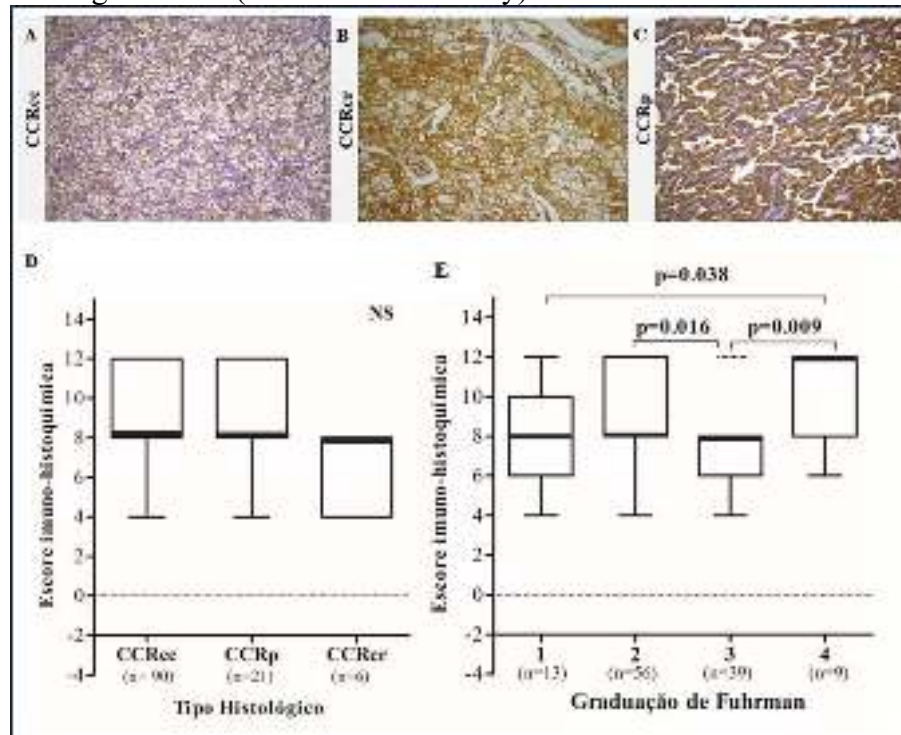
A imunomarcção para CAIX foi positiva em todas as amostras (Figura 3A-C). Semelhante ao perfil da expressão gênica, o subtipo CCRcr teve menor expressão comparado aos demais (não significativo, Figura 3D). Um estudo realizado com vários subtipos de CCR (n=1809) também identificou expressão predominante da CAIX no CCRcc e escores negativos para maioria dos CCRcr (Büschek *et al.*, 2018). No entanto, este mesmo estudo relatou ausência de expressão, na maioria dos casos CCRp, em contraste com nossos resultados. Esses dados ressaltam a importância de investigar a expressão de CAIX e seus diferentes perfis de expressão nos subtipos de CCR, a fim de explorar seu potencial como biomarcador (Büschek *et al.*, 2018).

Contrário ao esperado, identificamos associação significativa entre expressão da CAIX e grau de Fuhrman, indicando mediana de expressão maior no grau 4, o que sugere comportamento mais agressivo (Figura 3E). Estudo anterior relatou alta expressão proteica da CAIX em graus de Fuhrman menores, estádios mais baixos do tumor, ausência de metástases e maior tempo de SLR em CCRcc. Para o CCRp, o mesmo estudo identificou alta expressão associada com menor SLR (Büschek *et al.*, 2018). Outro estudo com 321 CCRcc, concluiu que a presença de metástases e baixos níveis de CAIX estavam relacionados com desfecho desfavorável da doença, demonstrando associação significativa com menor sobrevida, grau de Fuhrman, tamanho tumoral e comprometimento de linfonodos (Bui *et al.*, 2003). Não pudemos estabelecer relação clara entre a expressão proteica e os demais parâmetros clínico-histopatológicos, talvez pelo baixo número de casos com metástase (9,2%) e envolvimento dos gânglios linfáticos (4,6%), o que compromete as comparações entre grupos.

Observamos ainda que a expressão baixa/moderada de CAIX sugeriu menor sobrevida global em todos os subtipos de CCR, comparada à forte expressão (Figura 4). Apesar desse achado demonstrar perfil oposto do observado na análise *in silico*, a falta de significância

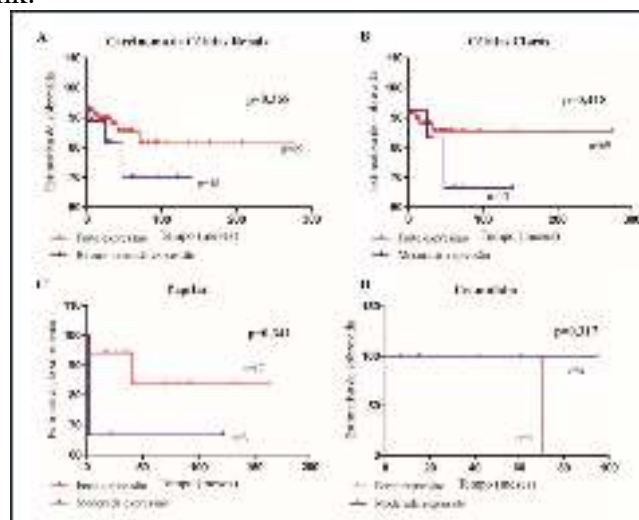
impossibilita elaborar conclusões.

Figura 3. Expressão proteica de CAIX. A) Intensidade fraca em caso representativo de CCRcc B) Intensidade moderada em caso representativo de CCRcr. C) Intensidade forte em caso representativo de CCRp. D) Perfil de expressão nos subtipos de CCR (NS=não significativo, teste Kruskal-Wallis). E) Associação significativa com grau de Fuhrman, sendo mais expressa nos graus 2 e 4 (Teste Mann-Whitney).



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Figura 4. Curvas de sobrevida geral de acordo com a expressão proteica de CAIX nos principais tipos histológicos de CCR. A) Todos os subtipos de CCR B) CCRcc. C) CCRp. D) CCRcr. Teste Log-rank.



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Estudos semelhantes também não identificaram associações entre prognóstico e expressão proteica da CAIX por expressão proteica (Zerati *et al.*, 2013; Ingels *et al.*, 2017). É

possível considerar a hipótese de que o baixo número de pacientes que foram à óbito (13,7%) e a predominância de casos sem metástases (87,8%) foram as principais limitações.

4 CONCLUSÃO

Esses achados lançam dúvidas sobre a real importância da CAIX no prognóstico e progressão do CCR. Com base nos resultados apresentados e em estudos similares, sugere-se que a avaliação da CAIX em pacientes sem metástases pode não ser suficiente para inferir seu potencial valor. Portanto, são necessárias investigações mais abrangentes, com diferentes subtipos histológicos, uma vez que a maioria dos estudos se concentra no CCRcc. No entanto, os resultados do CCRp são intrigantes e merecem atenção específica. Em futuras perspectivas, esperamos correlacionar o CAIX com outros biomarcadores de agressividade tumoral, a exemplo da vimentina, componente essencial para transição epitélio-mesenquimal.

REFERÊNCIAS

- APANOVICH, N.; APANOVICH, P. MANSORUNOV, D.; KUZEVANOVA, A.; MATVEEV, V.; KARPUKHIN, A. The Choice of Candidates in Survival Markers Based on Coordinated Gene Expression in Renal Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 615787, 11 maio 2021.
- BARTHA, Á.; GYÖRFFY, B. TNMplot.com: A Web Tool for the Comparison of Gene Expression in Normal, Tumor and Metastatic Tissues. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 5, p. 1–12, 1 mar. 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Especializada à Saúde. Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Carcinoma de Células Renais. **Brasília: Ministério da Saúde**, 2023. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/ptbr/midias/protocolos/ddt/20221109/ddt_carcinoma_celulas_renais.pdf. Acesso em: 1 de jul. 2024.
- BUI, M. H. T.; SELIGSON, D.; HAN, K.; PANTUCK A.; DOREY F.; HUANG Y.; HORVATH, S.; LEIBOVICH, B.; CHOPRA, S.; LIAO, S.; STANBRIDGE, E.; LERMAN M.; PALOTIE A.; FIGLIN, R.; BELLDEGRUN, A. **Carbonic Anhydrase IX Is an Independent Predictor of Survival in Advanced Renal Clear Cell Carcinoma: Implications for Prognosis and Therapy**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://aacrjournals.org/clincancerres/article-pdf/9/2/802/2087301/df0203000802.pdf>>.
- BÜSCHECK, F.; FRAUNE, C.; SIMON, R.; KLUTH, M.; HUBE-MAGG, C.; MÖLLER KOOP, C.; SHADANPOUR, D.; BANNENBERG, C.; EICHELBERG, C.; HÖFLMAYER, D.; CLAUDITZ T.; WITTMER, C.; WILCZAK W.; SAUTER, G.; FISCH, M.; RINK, M.; EICHENAUER T. Aberrant expression of membranous carbonic anhydrase IX (CAIX) is associated with unfavorable disease course in papillary and clear cell renal cell carcinoma. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 36, n. 12, p. 531.e19 531.e25, 1 dez. 2018.
- COMISSÃO PERMANENTE DE PROTOCOLOS DE ATENÇÃO À SAÚDE. Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal (SES-DF). Subsecretaria de Atenção Integral à Saúde. Protocolo de Câncer Renal. **Portaria SES/DF nº 1045 de 20.12.2019, publicada no DODF nº 247 de 30.12.2019**.
- CORGNA, E; BETTI M.; GOTTA, G.; ROILA, F.; MULDER, P. Renal cancer. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 64, n. 3, p. 247–262, dez. 2007.

ECKERT, A. W.; HORTER, S.; BETHMANN, D.; KOTRBA, J.; KAUNE, T.; ROT, S.; BACHE, M.; BILKENROTH, U.; REICH, W.; GRETIHER, T.; WICKENHAUSER, C.; VORDERMARK, D.; TAUBERT, H.; KAPPLER, M. Investigation of the prognostic role of carbonic anhydrase 9 (CAIX) of the cellular mRNA/protein level or soluble CAIX protein in patients with oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, 2 jan. 2019.

ERDOĞAN, F.; DEMIREL, A.; POLAT, Ö. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. **International Journal of Clinical Practice**, v. 58, n. 4, p.333–336, 29 abr. 2004

INGELS, A.; HEW, M.; ALGABA, F.; BOER, O.; MOORSELAAR, R.; HORENBLAS, S.; ZONDERVAN, P.; ROSETTE, J.; PES LAGUNA, M. Vimentin over-expression and carbonic anhydrase IX under-expression are independent predictors of recurrence, specific and overall survival in non-metastatic clearcell renal carcinoma: a validation study. **World Journal of Urology**, v. 35, n. 1, p. 81–87, 1 jan. 2017.

LINDGREN, D.; SJÖLUND, J.; AXELSON, H. Tracing Renal Cell Carcinomas back to the Nephron. **Trends in Cancer**, v. 4, n. 7, p. 472–484, 1 jul. 2018. LIN, H, HUANG, B.; WANG, H.; LIU, X.; HONG, Y.; QIU, S.; ZHENG, J. MTHFD2 overexpression predicts poor prognosis in renal cell carcinoma and is associated with cell proliferation and vimentin-modulated migration and invasion. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 51, n. 2, p. 991–1000, 1 nov. 2018.

NAGY, Á.; MUNKÁCSY, G.; GYÖRFFY, B. Pancancer survival analysis of cancer hallmark genes. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 6047, 1 dez. 2021.

RASMUSSEN, F. Metastatic renal cell cancer. Cancer imaging : the official publication of the **International Cancer Imaging Society**, v. 13, n. 3, p. 374–380, 2013.

STILLEBROER, A. B.; MULDER, P.; BOERMAN, P.; OYEN, E.; OOSTERWIJK, E. Carbonic Anhydrase IX in Renal Cell Carcinoma: Implications for Prognosis, Diagnosis, and Therapy. **European Urology**, v. 58, n. 1, p. 75–83, 1 jul. 2010.

TAKACOVA, M.; BARTOSOVA, M.; SKVARKOVA, L.; ZATOVICOVA, M.; VIDLICKOVA, I.; CSADEROVA, L.; BARATHOVA, M.; BREZA, J.; BUJDAK, P.; BREZA, J.; PASTOREKOVA, S. Carbonic anhydrase IX is a clinically significant tissue and serum biomarker associated with renal cell carcinoma. **Oncology Letters**, v. 5, n. 1, p. 191–197, 1 jan. 2012.

YU, C.; YANG, L.; CAI, M.; ZHOU F.; XIAO, S.; LI, Y.; WAN, T.; CHENG, D.; WANG, L.; ZHAO, C.; HUANG, X. Down-regulation of MTHFD2 inhibits NSCLC progression by suppressing cycle-related genes. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 24, n. 2, p. 1568–1577, 1 jan. 2020.

ZERATI, M. et al. Carbonic anhydrase IX is not a predictor of outcomes in non-metastatic clear cell renal cell carcinoma - a digital analysis of tissue microarray. **International Braz J Urol**, v. 39, n. 4, p. 484–492, 2013.