

Análise do gene PTEN por hibridização *in situ* fluorescente no carcinoma de células renais

Analysis of PTEN gene by fluorescent in situ hybridization in renal cell carcinoma

EURICO CLETO RIBEIRO DE CAMPOS, TCBC-PR¹; FRANCISCO PAULO DA FONSECA²; STÊNIO DE CÁSSIO ZEQU, ACBC-SP²; GUSTAVO CARDOSO GUIMARÃES, TCBC-SP³; FERNANDO AUGUSTO SOARES⁴; ADEMAR LOPES, TCBC-SP⁵

R E S U M O

Objetivo: avaliar a frequência de deleção do gene PTEN no carcinoma de células renais e o impacto da deleção nas taxas de sobrevida global e livre de doença. **Métodos:** foram analisados 110 pacientes portadores de carcinoma de células renais submetidos à nefrectomia radical ou parcial entre os anos de 1980 e 2007. Em 53 casos foi possível a análise do gene PTEN pelo método de hibridização *in situ* fluorescente através da técnica de "tissue microarray". Para a análise estatística, os pacientes foram classificados em dois grupos, de acordo com a presença ou ausência de deleção. **Resultados:** o tempo médio de seguimento foi de 41,9 meses. Deleção hemizigótica foi identificada em 18 pacientes (33,9%), ao passo que deleção homozigótica esteve presente em três (5,6%). Em aproximadamente 40% dos casos analisados havia deleção. Monossomia e trissomia foram detectadas, respectivamente, em nove (17%) e dois pacientes (3,8%). Em 21 pacientes (39,6%), a análise por hibridização *in situ* do gene PTEN foi normal. Não houve diferenças estatisticamente significativas nas taxas de sobrevida global ($p=0,468$) e livre de doença ($p=0,344$) entre os pacientes portadores ou não de deleção. Foram fatores independentes para a sobrevida global: estágio clínico TNM, sintomatologia ao diagnóstico, alto grau de Fuhrmann performance status (Ecog) e recorrência tumoral. A livre de doença foi influenciada unicamente pelo estágio clínico TNM. **Conclusão:** deleção do gene PTEN no CCR foi detectada com frequência de aproximadamente 40% e sua presença não foi determinante de menores taxas de sobrevida, permanecendo os fatores prognósticos tradicionais como determinantes da evolução dos pacientes.

Descritores: Deleção de genes. PTEN Fosfo-hidrolase. Hibridização *in situ* fluorescente. Carcinoma de células renais. Taxa de sobrevida.

INTRODUÇÃO

O carcinoma de células renais (CCR) classifica-se entre as dez neoplasias mais frequentes nos EUA¹. Apesar do aumento no diagnóstico de tumores renais cada vez menores e assintomáticos, cerca de 30% dos pacientes apresentam metástases ao diagnóstico e outros 30% irão desenvolver metástases durante o curso da doença, mesmo com ela localizada¹⁻⁴.

Fatores biomoleculares têm sido estudados para auxiliar no estadiamento clínico e patológico, identificando diferentes genes e proteínas capazes de prever o risco de progressão ou morte pela doença e identificar os pacientes que possam ter melhor resposta a tratamentos baseados nestas alterações moleculares presentes³.

Entre os genes estudados destaca-se o PTEN (*phosphatase with tensin homology deleted in chromosome 10*) que é um gene supressor tumoral localizado no cromossomo 10q23 e que pode ser inativado em decorrên-

cia de mutações e deleções em diversas neoplasias sólidas². No CCR, a presença de deleção ou mutação do PTEN, assim como a hipoexpressão imunohistoquímica, associam-se ao fenótipo invasivo e metastático da neoplasia^{2,4-8}.

O objetivo deste estudo é analisar o gene PTEN através de *tissue microarray* (TMA) pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente, determinando a frequência de deleção, e o impacto da deleção nas taxas de sobrevida global e sobrevida livre de doença (SLD).

MÉTODOS

Foram avaliados retrospectivamente 53 pacientes portadores de carcinoma de células renais, metastáticos ou não ao diagnóstico, e submetidos a tratamento cirúrgico exclusivo da neoplasia renal, entre 1980 e 2007. A pesquisa de hibridização *in situ* fluorescente do gene PTEN foi realizada inicialmente em 110 pacientes que constavam

Trabalho realizado no Departamento de Anatomia Patológica e Núcleo de Urologia do Hospital A. C. Camargo Cancer Center – São Paulo – Brasil.

1. Professor Adjunto de Cirurgia Geral da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG); 2. Médico Titular do Núcleo de Urologia do Hospital A. C. Camargo Cancer Center; 3. Chefe do Núcleo de Urologia do Hospital A. C. Camargo Cancer Center; 4. Diretor do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo Cancer Center; 5. Vice-presidente do Hospital A. C. Camargo Cancer Center.

no TMA; porém, somente em 53 amostras (48,2%) foi possível analisar a reação proposta. Diferentes fatores, como a presença de artefatos na lâmina obtida do TMA ou a insuficiência celular, foram determinantes para que não ocorresse a reação proposta.

A classificação de Fuhrman *et al.*⁹ foi utilizada, sendo que tumores graus I e II foram considerados como tumores de baixo grau e os graus III e IV como de alto grau. Para definição do subtipo histológico, foi utilizada a classificação da Organização Mundial da Saúde¹⁰. Os pacientes foram analisados em dois grupos: estágio I e II (doença localizada) versus III e IV (doença localmente avançada ou metastática) de acordo com o TNM 2004¹¹. As taxas de sobrevida foram calculadas pela técnica de Kaplan-Meier e as comparações entre elas pelo teste do Log Rank. Para a análise múltipla das sobrevidas foi empregado o modelo de riscos proporcionais de Cox. Para a análise da SLD, pacientes portadores de metástases ao diagnóstico ou com margens cirúrgicas positivas, foram excluídos do estudo.

Tissue microarray (TMA)

Os 53 tumores designados por seus números de registro de laudo anatomopatológico correspondentes, previamente selecionados e classificados, foram incluídos na construção de um bloco-receptor de parafina de TMA (Beecher Instruments, Silver Spring, MD), a partir de amostras colhidas do bloco-doador original, com agulha de 1mm de diâmetro (TMArrayer punch MP10-1,0mm), após a prévia escolha e marcação de área representativa da neoplasia, a partir da lâmina de hematoxilina e eosina original.

Foram realizadas punções em duplicata (dois fragmentos de cada caso) do bloco de parafina doador e do receptor, contendo assim, duas áreas diferentes da neoplasia em cada caso. Cortes histológicos com 3 a 4 μ de espessura do bloco de parafina receptor também foram efetuados, até todo o seu desgaste, obtendo-se um total de 110 lâminas numeradas sequencialmente a partir de 01. Para representar de maneira mais significativa a heterogeneidade tumoral, foram utilizadas mais de uma lâmina com amostras em duplicada.

Hibridização *in situ* fluorescente

A pesquisa de alterações estruturais ou em relação ao número de cromossomos ocupando o *locus* foi realizada mediante reações de hibridização *in situ* fluorescente através de um probe de 368kb com afinidade específica para a região 10q23 do cromossomo 10, contendo sequências que identificam as porções 5' e 3' do gene PTEN. O gene PTEN foi considerado normal pela presença de dois sinais vermelhos (10q23/PTEN *locus*) e dois sinais verdes (CEP 10).

A presença de deleção hemizigótica foi definida quando um dos alelos estava alterado parcial ou completamente, estando o gene selvagem presente, ou seja, quando havia mais de 24% do tumor contendo somente um

locus do gene PTEN e pela presença do sinal no controle. A deleção homozigótica foi definida na leitura das lâminas, quando estavam ausentes os *locus* do gene PTEN e estava presente o sinal do grupo controle em mais de 30% das células.

Em relação ao número, definiu-se trissomia quando além da presença dos dois cromossomos e seus respectivos alelos, havia um cromossomo a mais, ou seja, durante leitura havia mais de 15% do tumor contendo três *locus* PTEN e pela presença de três sinais no controle. A monossomia foi definida, quando estava presente apenas um cromossomo ocupando o *locus* 10 e havia à leitura mais de 23% de tumor contendo um sinal no *locus* PTEN e pela presença de um sinal no controle.

Para a análise estatística da sobrevida global e sobrevida livre de doença, dois grupos de pacientes foram definidos de acordo com os resultados obtidos à reação de hibridização *in situ* fluorescente. Os pacientes que demonstraram deleção hemizigótica, homozigótica ou monossomia à hibridização, foram considerados no grupo de deleção. Reação de hibridização *in situ* com achados de trissomia ou normalidade, definiram o outro grupo como sem deleção.

RESULTADOS

A média de idade foi 54,9 anos, predominando pacientes do sexo masculino (61,8%). Ao término do estudo, havia 68 pacientes (61,8) vivos e sem doença, sete (6,4%) vivos com doença, 35 óbitos (31,7%) e quatro pacientes (3,6%) perdidos de vista. A tabela 1 demonstra os principais fatores epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos dos 110 pacientes analisados.

Entre as amostras positivas para deleção, 18 (33,9%) demonstravam deleção hemizigótica e 3 (5,6%) deleção homozigótica. Em 21 amostras (39,6%) não foi encontrada deleção do PTEN. Monossomia e trissomia do gene foram detectadas em 11 amostras (20,7%), sendo nove casos de monossomia (17%) e dois de trissomia (3,8%). Entre as 53 amostras positivas para o Fish, 30 (56,6%) apresentavam deleção e 23 (43,4%) não apresentavam. A figura 1 demonstra os achados à reação de hibridização *in situ* por fluorescência.

As taxas de sobrevida global em cinco anos não foram influenciadas pela presença ou ausência de deleção, e foram respectivamente de 75,7% e 82,8% (p=0,468). Assim como a sobrevida global, não houve diferenças estatisticamente significativas quanto a presença ou ausência de deleção em relação à sobrevida livre de doença e respectivamente de 70,3% e 84,7% (p=0,344), embora se tenha observado tendência de maior sobrevida global e sobrevida livre de doença para os pacientes que não apresentaram deleção à reação de hibridização *in situ*. A figura 2 demonstra a curva de sobrevida global de acordo com hibridização *in situ* do PTEN.

Tabela 1 - Variáveis epidemiológicas, clínicas e anatomopatológicas dos 53 pacientes analisados.

Variável	Categoria	N	%
ECOG	0	84	76,4
	1 – 2	26	23,6
Metástase ao diagnóstico	Não	94	85,5
	Sim	16	14,5
Sintomatologia ao diagnóstico	Não	66	60
	Sim	44	40
Grau Fuhrman	Baixo grau	65	59,1
	Alto grau	45	40,9
EC TNM 2004	I e II	68	61,8
	III e IV	42	38,2
Recorrência tumoral	Não	79	71,8
	Sim	31	28,2

Pela análise múltipla, a sobrevida global dos pacientes foi influenciada, independentemente, pelas seguintes variáveis: estágio clínico IV (HR=7,095; p=0,011), ECOG 1 e 2 (HR=0,28; p=0,01), sintomatologia ao diagnóstico (HR=3,380; p=0,037), alto grau de Fuhrman (HR=2,421; p=0,057) e recorrência tumoral (HR=3,380; p=0,029). A sobrevida livre de doença foi influenciada unicamente pelos estádios clínicos II e III (HR=4,34 e 12,85; p=0,02 e 0,01, respectivamente).

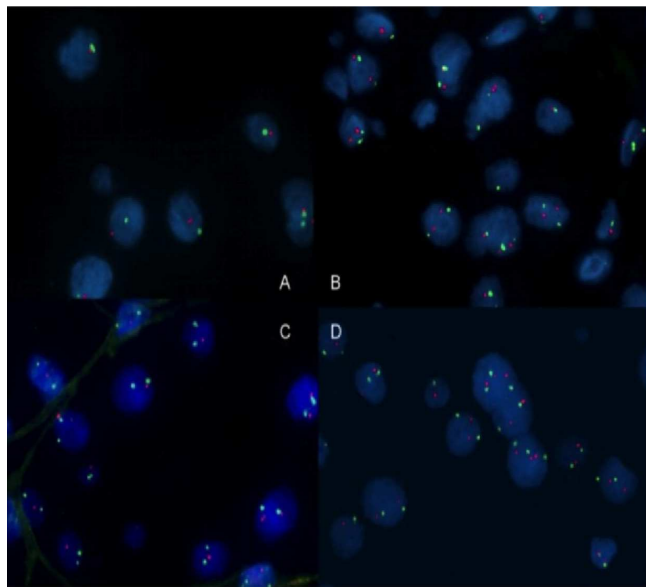


Figura 1 - A) Monossomia do cromossomo 10 identificada pela presença de um sinal vermelho (10q23/*PTEN* locus) e um sinal verde (CEP 10); B) representação normal do gene *PTEN* pela presença de dois sinais vermelhos (10q23/*PTEN* locus) e dois sinais verdes (CEP 10); C) representação de deleção hemizigótica pela presença de um sinal vermelho (10q23/*PTEN* locus) e dois sinais verdes (10q23/*PTEN* locus); D) trissomia do cromossomo 10, representada pela presença de três sinais vermelhos (10q23/*PTEN* locus) e três sinais verdes (CEP 10).

DISCUSSÃO

Apesar do uso rotineiro de critérios clínicos e anatomopatológicos na avaliação do prognóstico de pacientes portadores de CCR, muitos desenvolvem metástases durante o seguimento, demonstrando a necessidade de se identificar novos fatores capazes de melhor prever a evolução destes pacientes^{1,3}.

O gene *PTEN/MMCA1* está localizado no cromossomo 10q23, atuando no controle da migração, proliferação e apoptose celular, agindo por mecanismo de "down regulation" do PI3K (phosphatidylinositol 3-OH kinase) e da proteína Akt. No CCR, a hipoxpressão imunohistoquímica do *PTEN* tem sido associada aos tumores de alto grau e a menores taxas de sobrevida^{1,7}.

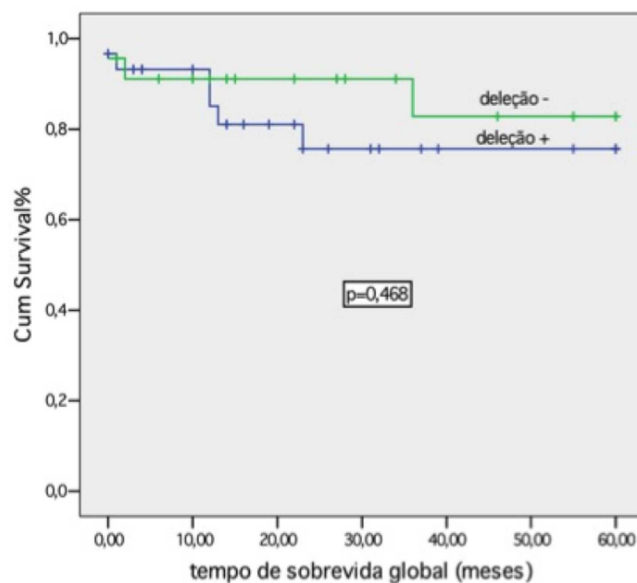


Figura 2 - Curva de sobrevida global de acordo com hibridização *in situ* do *PTEN*.

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente permite a avaliação de genes mediante a adição de sondas específicas marcadas com material fluorescente, identificando alterações numéricas (ganhos ou perdas cromossômicas, ampliações, deleções) ou alterações estruturais (translocação), demonstrando superioridade a outras técnicas por não sofrer influência da heterogeneidade tumoral.

Como limitações da técnica, fatores como insuficiência celular, concentração da sonda, lavagem pós-hibridização e origem do material emblocado em parafina¹², podem interferir na análise dos resultados, e interferiram nas reações de hibridização no presente estudo, causando a exclusão de 57 casos, a partir de casuística inicial de 110 casos.

Há poucos estudos na literatura analisando o status do gene PTEN quanto há alterações genômicas e detectadas por hibridização *in situ*. A metodologia empregada pelos estudos diferem entre si, assim como as casuísticas são reduzidas. Neste estudo, foi utilizada a mesma metodologia proposta por Korshunov *et al.*¹³ e Ventura *et al.*¹⁴, utilizando-se de valores de corte superiores para deleção homocigótica, para demonstrar com precisão os casos em que o gene estava realmente ausente a hibridização *in situ* fluorescente.

Monossomia do PTEN foi encontrada com frequência de 17% e superior à descrita na literatura, cuja frequência chega a 5%¹⁵. Para Speicher *et al.*¹⁶, a monossomia no PTEN é um evento raro no subtipo de células claras, mas podendo ser detectada em até 40% casos no subtipo cromóforo. Assim, a inclusão de subtipos diferentes do carcinoma de células claras renais no estudo pode justificar a maior frequência encontrada. Na metodologia, o emprego de um valor de cut-off mais elevado e de 23% para a detecção de monossomia, permitiu a detecção de casos que realmente apresentavam

monossomia, evitando assim a ocorrência de casos falso-positivos.

Considerando o CCR, Dal Clin *et al.*¹⁷ avaliaram através de reação de hibridização *in situ*, a frequência de trissomia do PTEN em 17 amostras de CCR provenientes de pacientes submetidos à nefrectomias. Trissomia foi encontrada em cinco pacientes (30%). Nos 53 analisados com a hibridização neste estudo, trissomia foi alteração infrequente e presente em somente dois pacientes (3,8%).

Em 41 amostras analisadas por hibridização *in situ*, Presti *et al.*¹⁸, demonstraram que as anormalidades cromossômicas no CCR são mais frequentes no cromossomo 3 e que corresponderam a 29% das amostras analisadas. Os cromossomos 8, 10 e 14q estavam alterados em 20% dos casos analisados. O impacto da deleção nas taxas de sobrevida não foi avaliado, porém, os autores demonstraram que a deleção dos genes não estava associada aos tumores de alto grau de Fuhrmann.

Em glioblastoma multiforme, deleção do PTEN foi detectada com frequência de 61% e determinante de menor sobrevida global em 44 casos¹³. Neste estudo, foi identificado aproximadamente 40% de deleção, observando-se menores taxas de sobrevida global e sobrevida livre de doença para os pacientes portadores da alteração molecular a hibridização. Considerando as dificuldades técnicas inerentes a reação de hibridização *in situ*, casuísticas maiores são necessárias para poder demonstrar com maior significância as diferenças observadas e assim o impacto negativo da presença de deleção do PTEN na evolução dos pacientes portadores de CCR.

Em conclusão, deleção do gene PTEN no CCR foi detectada com frequência de aproximadamente 40% e sua presença não foi determinante de menores taxas de sobrevida, permanecendo os fatores prognósticos tradicionais como determinantes da evolução dos pacientes.

A B S T R A C T

Objective: To evaluate the frequency of deletion of the PTEN gene in renal cell carcinoma (RCC) and its impact on the rates of overall and disease-free survival. **Methods:** We analyzed 110 patients with renal cell carcinoma who underwent radical or partial nephrectomy between 1980 and 2007. In 53 cases it was possible to analyse the PTEN gene by the method of fluorescent *in situ* hybridization using the technique of tissue microarray. For statistical analysis, patients were classified in two groups according to the presence or absence of the deletion. **Results:** The mean follow-up time was 41.9 months. Hemizygous deletion was detected in 18 patients (33.9%), while the homozygous one was present in three (5.6%). Deletion was present in approximately 40% of the analyzed cases. Monosomy and trisomy were detected in nine (17%) and two patients (3.8%), respectively. In 21 patients (39.6%) the analysis of the PTEN gene by *in situ* hybridization was normal. There were no statistically significant differences in overall ($p = 0.468$) and disease-free ($p = 0.344$) survival rates between patients with or without deletion. Factors which were independent for overall survival: TNM clinical stage, symptoms at diagnosis, high Fuhrmann grade, performance status (ECOG) and tumor recurrence. Disease-free survival was influenced only by the clinical TNM stage. **Conclusion:** Deletion of the PTEN gene in RCC was detected with a frequency of approximately 40% and its presence was not determinant of lower survival rates, the traditional prognostic factors remaining as determinants of outcome.

Key words: Gene deletion. PTEN phosphohydrolase. *In situ* hybridization, fluorescence. Carcinoma, renal cell. Survival rate.

REFERÊNCIAS

- Kim HL, Seligson D, Liu X, Janzen N, Bui MH, Yu H, Shi T, Beldegrun AS, Horvath S, Figlin RA. Using tumors markers to predict the survival of patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol*, 2005; 173:1496-1501.
- Visapää H, Seligson D, Huang Y, Rao JY, Beldegrun A, Horvath S, Palotie A. Ki 67, gelsolin and PTEN expression in sarcomatoid renal tumors. *Urol Research*, 2003; 30:387-9.
- Lam JS, Shvarts O, Leppert JT, Figlin RA, Beldegrun AS. Renal cell carcinoma 2005: new frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy. *J Urol*, 2005; 173:1853-62.
- Kim HL, Seligson D, Liu X, Janzen N, Bui MH, Yu H, Shi T, Figlin RA, Horvath S, Beldegrun AS. Using protein expressions survival in clear cell renal carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2004, 10:5464-71.
- Kondo K, Yao M, Kobayashi K, Ota S, Yoshida M, Kaneko S, Baba M, Sakai N, Kishida T, Kawakami S, Uemura H, Nagashima Y, Nakatani Y, Hosaka M. PTEN/MMAC1/TEP1 mutations in human primary renal cell carcinomas and renal carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 2001; 91:219-24.
- Hara S, Oya M, Mizuno R, Horiguchi A, Marumo K, Murai M. Akt activation in renal cell carcinoma: contribution of a decreased PTEN expression and the induction of apoptosis by an Akt inhibitor. *Ann Oncol* 2005; 16:928-933.
- Lee JS, Kim HS, Kim YB, Lee MC, Park CS. Expression of PTEN in renal cell carcinoma and its relation to tumor behavior and growth. *J Surg Oncol* 2003; 84:166-172.
- Teng DHF, Hu R, Lin H, Davis T, Iliev D, Frye C, Swedlund B, Hansen KL, Vinson VL, Gumpfer KL, Ellis L, El-Naggar A, Frazier M, Jasser S, Langford LA, Lee J, Mills GB, Pershouse MA, Pollack RE, Tornos C, Troncoso P, Yung WKA, Fujii G, Berson A, Bookstein R, Bolen JB, Tavtigian SV, Peter A. StecMMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines. *Cancer Res.* 1997;57:5221-5.
- Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982; 6:655-63.
- Bruder E, Passera O, Harms D, Leuschner I, Ladanyi M, Argani P, Eble JN, Struckmann K, Schraml P, Moch H. Morphologic and molecular characterization of renal cell carcinoma in children and young adults. *Am J Surg Pathol* 2004; 28:1117-32.
- Sobin LH, Wittekind C. TNM classificação de tumores malignos. Trad. de A L A Eisenberg. 6 ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004. Rim; p.200-3.
- Silva-Valenzuela MG, Almeida FC, Matissonkas-Antonio LF. In situ hybridization with non-radioactive riboprobes: principles and applications in pathology. *J Bras Patol Med Lab* 2006;42:207-213.
- Korshunov A, Sycheva R, Gorelyshev S, Golanov A. Clinical utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in nonbrainstem glioblastomas of childhood. *Mod Pathol* 2005; 18:1258-63.
- Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason DY, Siebert R. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn* 2006; 8:141-51.
- Thrash-Bingham CA, Greenberg RE, Howard S, Bruzel A, Bremer M, Goll A, Salazar H, Freed JJ, Tartof KD. Comprehensive allelotyping of human renal cell carcinomas using microsatellite DNA probes. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:2854-2858.
- Speicher MR, Schoell B, du Manoir S, Schröck E, Ried T, Cremer T, Störkel S, Kovacs A, Kovacs G. Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17 and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 1994;145:356-364.
- Dal Cin P, Aly MS, Delabie J, Ceuppens JL, Van Gool S, Van Damme B, Baert L, Van Poppel H, Van den Berghe H. Trisomy 7 and trisomy 10 characterize subpopulations of tumor-infiltrating lymphocytes in kidney tumors and the surrounding kidney tissue. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89:9744-8.
- Presti JC Jr, Moch H, Reuter VE, Cordon-Cardo C, Waldman FM. Renal cell carcinoma genetic analysis by comparative genomic hybridization and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Urol*. 1996; 156:281-5.

Recebido em 05/09/2012

Aceito para publicação em 10/11/2012

Conflito de interesse: nenhum.

Fonte de financiamento: Nenhuma.

Como citar este artigo:

Campos ECR, Fonseca FP, Zequ SC, Guimarães GC, Soares FA, Lopes A. Análise do gene *PTEN* por hibridização in situ fluorescente no carcinoma de células renais. *Rev Col Bras Cir*. [periódico na Internet] 2013;40(6). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>

Endereço para correspondência:

Eurico Cleto Ribeiro de Campos
E-mail: ecrcampos@yahoo.com.br