

Maria José Filipe da Silva Soares

Relevância biológica e clínica das alterações do número de cópias  
e da expressão do gene *CSF1R* nos carcinomas renais

Orientador: Prof. Doutor Manuel António Rodrigues Teixeira

Porto  
2007



DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE  
MESTRE APRESENTADA AO INSTITUTO DE  
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR E À  
*THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY*



## **AGRADECIMENTOS**



## **Agradecimentos**

Ao Prof. Doutor Manuel Teixeira, Director do Serviço de Genética e do Centro de Investigação do IPO-Porto, responsável pela orientação desta dissertação, obrigada por toda a disponibilidade, rigor científico, apoio e compreensão demonstrados em todos os momentos.

Ao Prof. Doutor Rui Henrique, Director do Serviço de Anatomia Patológica do IPO-Porto, cuja colaboração foi fundamental para a realização desta tese.

À Doutora Mafalda Pinto, ao Dr. Nuno Cerveira, à Prof. Doutora Cármen Jerónimo e à Dra. Joana Vieira, obrigada pelo apoio e disponibilidade.

Ao Prof. Doutor João Amado, Prof. Doutor Carlos Lopes e restante comissão coordenadora, assim como a todos os docentes do Mestrado em Oncologia e à D. Maria do Céu, pelo empenho demonstrado.

Ao Dr. Laranja Pontes, Director do IPO-Porto, e seus antecessores, pelo apoio concedido ao Mestrado em Oncologia.

Ao Dr. Jorge Oliveira, à Dra. Mariana Afonso e Dra. Ana Teresa Martins pela colaboração e disponibilidade.

Aos colegas do Serviço de Genética, que de uma forma ou de outra contribuíram para a minha formação profissional e que me apoiaram durante a realização deste trabalho, obrigada por todo o apoio.

À Liga Portuguesa Contra o Cancro, pelo apoio financeiro prestado.

Ao IPO-Porto, onde foi realizado o trabalho conducente a esta tese.

À Manela, por todo o apoio, pela cumplicidade e porque para além de ser uma boa amiga foi também uma excelente colega de mestrado.

À Bárbara, pela PACIÊNCIA, pela compreensão e estímulo, pelos sábios conselhos e, acima de tudo, pela grande amizade demonstrada. Obrigada por tudo...

À Lurdes, à Anita, à Susana e à Vera, pela disponibilidade, pelo estímulo e compreensão, pela boa disposição e, principalmente, por toda a amizade.

À minha família, e principalmente à minha mãe, por todo o apoio, paciência, incentivo e amizade demonstrados em todos os momentos. Obrigada, simplesmente por TUDO!!!

## ÍNDICE



---

---

## Índice

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	13
SUMÁRIO .....	21
SUMMARY .....	25
INTRODUÇÃO .....	29
1 – Epidemiologia do cancro do rim .....	31
1.1 – Incidência e mortalidade .....	31
1.2 – Factores de risco.....	33
1.2.1 – Factores ambientais.....	33
1.2.2 – História familiar .....	33
2 – Características clínico-patológicas .....	35
2.1 – Classificação de Heidelberg.....	37
2.2 – Estadiamento e prognóstico .....	39
3 – Biologia molecular do CCR .....	40
4 – Tratamento.....	44
4.1 – Cirurgia .....	45
4.2 – Radioterapia .....	45
4.3 – Terapia biológica.....	45
4.3.1 – Terapia dirigida com malato de sunitinib (SUTENT®) .....	46
5 – O gene CSF1R.....	48
OBJECTIVOS.....	51
MATERIAL E MÉTODOS .....	55

---

---

1 – Material biológico.....	57
2 – Métodos .....	59
2.1 – Extração de ácidos nucleicos.....	59
2.2 – RT-PCR Quantitativo.....	60
2.3 – Hibridação fluorescente in situ (FISH) .....	61
2.4 – Imunohistoquímica.....	62
2.5 – Pesquisa de mutações no gene CSF1R.....	63
2.5.1 – Reacção em cadeia da polimerase (PCR) .....	64
2.5.2 – Sequenciação automática.....	65
2.6 – Análise estatística.....	66
RESULTADOS.....	67
1 – Expressão do gene CSF1R por RT-PCR quantitativo.....	69
2 – Número de cópias do gene CSF1R por FISH.....	72
3 – Expressão proteica do CSF1R por imunohistoquímica.....	74
4 – Pesquisa de mutações no gene CSF1R.....	77
DISCUSSÃO .....	81
1 – Expressão do gene CSF1R em tumores das células renais.....	83
2 – Relação entre o número de cópias e a expressão do gene CSF1R .....	85
3 – Mutações no gene CSF1R .....	86
CONCLUSÃO .....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

---

---

## **ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**



## Abreviaturas e símbolos

3' UTR	- 3' <i>untranslated region</i>
ABC	- Complexo avidina-biotina
AJCC	- <i>American Joint Committee on Cancer</i>
<i>BHD</i>	- Gene <i>Birt-Hogg-Dubé</i>
BHD	- Síndrome de Birt-Hogg-Dubé
bp	- Pares de bases
BSA	- Albumina sérica bovina
c.*12C>T	- Substituição de uma citosina por uma timina 12 nucleótidos <i>downstream</i> do codão <i>stop</i> (3' UTR)
c.908T>C	- Substituição de uma timina por uma citosina na posição 908 da região codificante do DNA
c.2799T>C	- Substituição de uma timina por uma citosina na posição 2799 da região codificante do DNA
CCR	- Carcinoma das células renais
<i>CDC25</i>	- Gene <i>cell division cycle 25</i>
<i>CDC25C</i>	- Gene <i>cell division cycle 25C</i>
cDNA	- Ácido desoxirribonucleico complementar
<i>CSF1R</i>	- Gene <i>colony-stimulating factor 1 receptor</i>
CSF1R	- Citocina <i>colony stimulating factor 1</i>
DAPI	- 4',6-diamidino-2-phenylindole

DNA	- Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	- Desoxinucleótidos
DP	- Desvio padrão
<i>EPO</i>	- Gene da eritropoietina
<i>ERBB2</i>	- Gene <i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
<i>F</i>	- <i>Primer forward</i>
F	- Feminino
<i>FGF1</i>	- Gene <i>fibroblast growth factor 1</i>
<i>FH</i>	- Gene <i>fumarate hydratase</i>
Fig.	- Figura
FISH	- Hibridação fluorescente <i>in situ</i>
FLT3	- Proteína <i>fms-related tyrosine kinase 3 receptor</i>
H <sub>2</sub> O	- Água
HGF	- Factor de crescimento dos hepatócitos
HIF-1	- Proteína <i>hypoxia-inducible factor 1</i>
<i>HPRT</i>	- Gene <i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase</i>
<i>HPRT2</i>	- Gene <i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 2</i>
<i>HRC1</i>	- Gene <i>hereditary renal cancer associated 1</i>
IFN- $\alpha$	- Interferão-alfa
Igepal	- <i>Nonionic, non-denaturing detergent</i>
IL-2	- Interleucina-2
<i>IL9</i>	- Gene <i>interleukin 9</i>
KIT	- Proteína <i>Stem-cell factor receptor</i>

M	- Masculino
M	- Molar
m/sec	- metro/segundo
<i>MET</i>	- Proto-oncogene met
mg	- Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	- Cloreto de magnésio
min	- Minuto
mL	- Mililitro
mM	- Milimolar
mTOR	- Cinase <i>mammalian target of rapamycin</i>
n	- Número de amostras
NA	- Não analisável
ND	- Não determinado
ng	- Nanograma
NMC	- Nefroma mesoblástico congénito
<i>NRC-1</i>	- Gene <i>non-papillary renal cell carcinoma 1</i>
°C	- Grau Celsius
<i>OGG1</i>	- Gene <i>8-oxoguanine DNA glycosylase</i>
p	- Braço curto do cromossoma
p.Leu303Ser	- Troca do aminoácido leucina pelo aminoácido serina na posição 303
p/v	- peso/volume
PBS	- Tampão fosfato salino
PCR	- Reacção em cadeia da polimerase

PDGFR $\alpha$	- Proteína <i>platelet-derived growth factor-alpha receptor</i>
<i>PDGFR<math>\beta</math></i>	- Gene <i>platelet-derived growth factor-beta</i>
PDGFR $\beta$	- Proteína <i>platelet-derived growth factor-beta receptor</i>
q	- Braço longo do cromossoma
R	- <i>Primer reverse</i>
RCC	- <i>Renal Cell Carcinoma</i>
RCSFIR	- Valores relativos de expressão do gene <i>CSFIR</i>
RET	- Proteína <i>ret proto-oncogene</i>
RNA	- Ácido ribonucleico
rpm	- Rotações por minuto
RT-PCR	- Reacção em cadeia da polimerase em tempo real
SSC	- <i>Saline sodium citrate</i>
Tab.	- Tabela
TNM	- Classificação de tumores malignos ( <i>Tumor, Nodes, Metastasis</i> )
TRM	- Tumor rabdoide maligno
TW	- Tumor de Wilms
u/ $\mu$ L	- unidade/microlitro
UICC	- <i>International Union Against Cancer</i>
v/v	- volume/volume
<i>VEGF</i>	- Gene <i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGF	- Proteína <i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR1	- Proteína <i>vascular endothelial growth factor 1</i>
VEGFR2	- Proteína <i>vascular endothelial growth factor 2</i>

VEGFR3 - Proteína *vascular endothelial growth factor 3*

*VHL* - Gene *Von Hippel-Lindau*

VHL - Proteína Von Hippel-Lindau

$\mu\text{L}$  - Microlitro

$\mu\text{M}$  - Micromolar



## **SUMÁRIO**



Os carcinomas do rim compreendem um grupo heterogéneo de tumores que representam cerca de 3% das neoplasias em adultos nos países ocidentais. Destes, cerca de 70-80% são carcinomas renais de células claras. Segundo a classificação de Heidelberg, caracterizam-se por perda de material genético de 3p, incluindo a região 3p25-26 onde está localizado, entre outros, o gene Von Hippel-Lindau (*VHL*). As mutações do gene supressor tumoral *VHL* são exclusivas deste tipo de tumores. Adicionalmente, a duplicação da região cromossómica 5q22qter, em especial 5q31-33, é também uma alteração citogenética frequentemente detectada neste tipo histológico. Genes relacionados com o crescimento ou proliferação celular encontram-se localizados nesta região, entre eles o gene *colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R)*, que codifica o receptor da citocina CSF1, a qual controla a produção, diferenciação e função macrofágica. Existem mutações neste gene em doenças hematológicas malignas e a sua sobre-expressão está associada com mau prognóstico em diversas neoplasias, nomeadamente nos cancros da mama e ovário. Recentemente, alguns estudos verificaram que o gene *CSF1R* é expresso em tumores das células renais, mas o seu papel na carcinogénese renal não está esclarecido.

Constituíram objectivos deste trabalho avaliar a expressão do gene *CSF1R* nos diferentes subtipos histológicos numa série consecutiva de tumores renais e respectivos tecidos normais, analisar por hibridação fluorescente *in situ* (FISH) a relação entre o número de cópias e a expressão do *CSF1R* nos carcinomas de células renais mais comuns (células claras, papilares e cromófobos) e pesquisar mutações nos exões 7 e 22 do gene *CSF1R* em carcinomas de células claras do rim.

Nos carcinomas renais de células claras, os resultados por RT-PCR quantitativo demonstram sobre-expressão do transcrito do gene *CSF1R*, que se traduz em sobre-expressão proteica detectada por imunohistoquímica em todos os tumores deste subtipo histológico. A imunorreactividade dos carcinomas do subtipo de células claras distingue-se da observada nos restantes tumores, o que sugere a utilidade da proteína CSF1R como marcador imunohistoquímico no diagnóstico diferencial. A análise do número de cópias do gene *CSF1R* por FISH revelou alterações numéricas no cromossoma 5 e ganhos relativos do número de cópias do gene *CSF1R* em relação ao controlo, que podem contribuir para, mas não explicam completamente, a sobre-expressão deste gene nos carcinomas renais das células claras. Por último, identificou-se um polimorfismo e duas mutações germinativas não descritas até à data em doentes com carcinomas renais de células claras. Os resultados aqui apresentados permitem concluir que o gene *CSF1R* desempenha um papel relevante na carcinogénese dos carcinomas renais de células claras.

## **SUMMARY**



Renal cell carcinomas (RCC) comprise a heterogeneous group of tumors that represent about 3% of all malignancies in adults in the Western countries. Of these, 70-80% are clear cell RCC. According to Heidelberg classification, these tumors are characterized by loss of genetic material from 3p, including the region 3p25-26, where the Von Hippel Lindau (*VHL*) gene is located, among others. Mutations of the *VHL* tumor suppressor gene are exclusive of these tumors. Additionally, 5q22qter duplication, especially involving 5q31-33, is a cytogenetic change often found in this histological subtype. Numerous genes related to cell growth or proliferation, such as the *colony-stimulating factor 1 receptor gene (CSF1R)*, are located in this chromosomal region. The protein encoded by the *CSF1R* gene is the receptor for colony stimulating factor 1, a cytokine which controls the production, differentiation, and function of macrophages. Mutations in this gene have been associated with myeloid malignancies and abnormally high *CSF1R* expression has been correlated with poor outcome in a variety of malignancies, including breast and ovarian cancers. Recent studies revealed that this gene is expressed in renal cell tumors, but its role in renal carcinogenesis is unclear.

The aim of this study was to evaluate *CSF1R* expression in different histological subtypes of renal cell tumors and normal tissues, to determine the relationship between *CSF1R* copy number by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and gene expression in the most common renal cell carcinomas (clear cell, papillary, and chromophobe), as well as to look for mutations in exons 7 and 22 of *CSF1R* in clear cell RCC.

Quantitative RT-PCR showed *CSF1R* over-expression in clear cell RCC, which resulted in protein over-expression detected by immunohistochemistry in all cases of this

tumor subtype. The staining pattern in clear cell RCC was clearly different from that observed in other tumors, something that suggests that CSF1R might be a useful immunohistochemical marker in differential diagnosis. *CSF1R* analysis by FISH showed whole and partial chromosomal numerical changes, indicating that copy number changes might contribute to, but do not fully explain, the *CSF1R* over-expression seen in clear cell carcinomas. Finally, one polymorphism and two novel germline mutations were identified in clear cell RCC patients. The findings hereby presented allow the conclusion that the *CSF1R* gene plays a relevant role in the carcinogenesis of clear cell RCC.

## **INTRODUÇÃO**

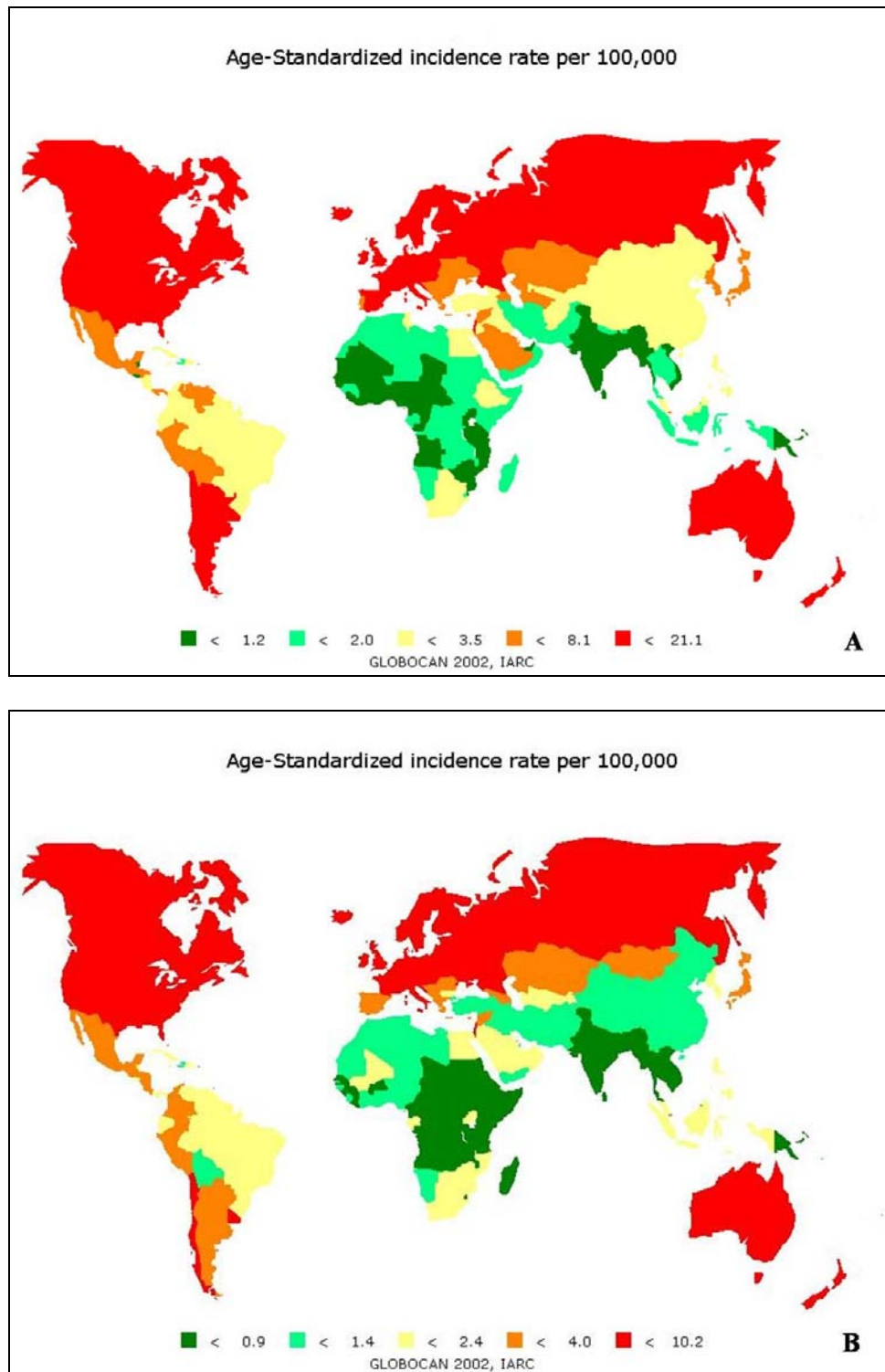


## **1 – Epidemiologia do cancro do rim**

### **1.1 – Incidência e mortalidade**

As neoplasias do rim compreendem um grupo heterogéneo de tumores que no seu conjunto representam cerca de 3% das neoplasias em adultos nos países ocidentais. Raramente afectam indivíduos com menos de 50 anos e são duas vezes mais frequentes nos homens do que nas mulheres (1). Os carcinomas de células renais (CCR) têm origem no córtex renal e são responsáveis por 80-85% dos tumores primários do rim. As taxas de incidência mais elevadas verificam-se, em geral, nos países industrializados (Fig. 1). Entre os países com maior incidência encontram-se a República Checa, Estónia e Eslováquia. As taxas de incidência mais baixas verificam-se nos países em via de desenvolvimento, com excepção de alguns países da América do Sul, como o Uruguai, onde em 1995 se observou uma das mais elevadas taxas de incidência desta neoplasia a nível mundial (2). Em Portugal, a taxa de incidência de CCR em 2002 foi de  $2,7/10^5$  habitantes nas mulheres e de  $6,5/10^5$  habitantes nos homens (2).

As taxas de mortalidade mais elevadas verificam-se nos países mais desenvolvidos ( $2,1/10^5$  habitantes nas mulheres e  $4,6/10^5$  habitantes nos homens), sendo mais baixa nos países em via de desenvolvimento ( $0,7/10^5$  habitantes nas mulheres e  $1,2/10^5$  habitantes nos homens), com excepção de alguns países do continente sul-americano (2).



**Figura 1** – Taxas de incidência do cancro do rim padronizadas (ajustada à idade). A: Homens; B: Mulheres. Adaptado de Ferlay *et al* (2).

## **1.2 – Factores de risco**

### **1.2.1 – Factores ambientais**

O consumo de tabaco está directamente relacionado com o aparecimento desta neoplasia e é responsável por cerca de 39% dos casos de carcinoma renal nos homens. A exposição a arsénio, quer durante processos industriais, quer através de água para consumo, aumenta o risco de desenvolver um carcinoma renal em 30%. Outros compostos químicos parecem estar relacionados com o aparecimento desta neoplasia, mas ainda não foi estabelecida uma associação directa. Estes incluem os asbestos, cádmio, alguns solventes orgânicos, pesticidas e toxinas fúngicas. A obesidade e o abuso de medicamentos analgésicos e diuréticos são também factores de risco para esta neoplasia (3; 4).

### **1.2.2 – História familiar**

Apesar da maioria dos casos de CCR serem classificados como esporádicos, cerca de 1-4% ocorre em indivíduos com predisposição hereditária, e os genes alterados podem ser os mesmos que estão envolvidos nas formas esporádicas (5).

Nas últimas décadas vários estudos resultaram na identificação de sete síndromes hereditárias que incluem carcinomas renais (Tab. 1), em cinco das quais foram já identificados os genes associados (6).

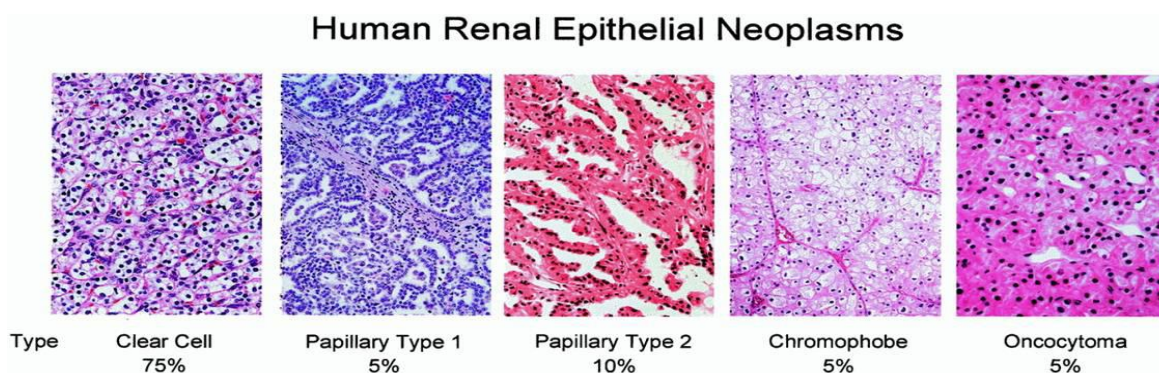
**Tabela 1** – Síndromes hereditárias associadas a neoplasias das células renais.

Síndrome	Gene	Localização	Manifestação clínica no rim
Síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL)	<i>VHL</i>	3p25	Carcinoma renal das células claras (sólido e/ou cístico, múltiplo e bilateral)
Carcinoma do rim papilar hereditário	proto-oncogene <i>met (MET)</i>	7q31	Carcinoma papilar do rim tipo 1 (sólido, múltiplo e bilateral)
Cancro de células renais/leiomiomatose hereditário	<i>fumarate hydratase (FH)</i>	1q42-43	Carcinoma papilar do rim tipo 2, carcinoma do ducto colector (unifocal, agressivo)
Síndrome de Birt-Hogg-Dubé (BHD)	<i>Birt-Hogg-Dubé (BHD)</i>	17p11.2	Carcinoma híbrido das células renais-oncocítico, carcinoma cromóforo do rim, carcinoma renal das células claras, oncocitoma (múltiplo, bilateral)
Hipertiroidismo-tumor da mandíbula	<i>(HPRT2)</i> <i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 2</i>	1q25-32	Tumores mistos epitelial/estromal, carcinoma papilar do rim (quistos)
Translocação constitucional do cromossoma 3	Desconhecido	-	Carcinoma renal das células claras (múltiplo, bilateral)
Carcinoma papilar da tiróide familiar	Desconhecido	-	Carcinoma papilar do rim, oncocitoma

## 2 – Características clínico-patológicas

O cancro de células renais é caracterizado pela ausência de sintomas específicos em estádios precoces da doença que, juntamente com as limitações dos testes de rastreio disponíveis, fazem com que a maioria dos doentes se encontrem em estádios avançados da doença no momento do diagnóstico. Os sintomas e sinais mais frequentes são hematuria, lombalgia, febre e hipertensão arterial. Podem ainda surgir sinais inespecíficos, como perda de apetite e diminuição de peso (7). Apesar dos tumores renais surgirem em todas as idades, alguns são mais frequentemente observados em adultos e outros apenas em jovens.

Os tumores do rim são classificados histologicamente como carcinomas de células renais (CCR), adenomas, oncocitomas, nefroblastomas ou tumores de Wilms (TW), nefromas mesoblásticos congénitos (NMC), sarcomas de células claras, tumores rabdóides malignos (TRM) e carcinomas transicionais (Fig. 2) (8).



**Figura 2** – Exemplos de tumores do rim com diferentes tipos de histologia. Adaptado de Linehan *et al* (9).

Os CCRs são classificados em diferentes subtipos tendo como base características histológicas, nomeadamente padrão de crescimento (papilar ou não-papilar) e tipo de célula (clara, granular, glomerular e fusocelular) (8).

Os carcinomas renais de células claras apresentam arquitetura celular variada, com padrão sólido, alveolar e acinoso, sendo este último o mais comum. Os carcinomas contêm tipicamente uma rede regular de vasos sanguíneos pequenos e de parede fina, uma característica de diagnóstico útil para estes tumores. No padrão alveolar não existem lúmens aparentes e no padrão acinoso surge um espaço luminal central e circular preenchido com fluido seroso ligeiramente acidófilo ou com eritrócitos. As estruturas alveolares e acinosas podem dilatar, resultando em padrões microcísticos e macrocísticos. Raramente, os carcinomas renais de células claras têm um padrão tubular distinto, assim como raramente uma arquitetura pseudopapilar. O citoplasma está frequentemente preenchido com lípidos e glicogénio, os quais são dissolvidos nos processos histológicos rotineiros, resultando num citoplasma claro rodeado por uma membrana celular distinta (3).

O CCR papilar é caracterizado por células epiteliais malignas que formam proporções variáveis de papilas e túbulos. Foram descritos dois tipos morfológicos de CCR papilar. Os tumores do tipo I apresentam papilas cobertas por células pequenas com citoplasma escasso, rearranjado numa camada simples da membrana basal das papilas. Os tumores do tipo II apresentam, frequentemente, células de grau nuclear superior com citoplasma eosinofílico e núcleos pseudoestratificados nos *cores* papilares. Os tumores do tipo I são frequentemente multifocais. Os CCRs papilares caracterizam-se ainda por infiltração linfocitária e macrofágica com tendência a necrose (3; 4).

O carcinoma renal cromóforo é caracterizado por células de citoplasma transparente, ligeiramente reticulado com membranas celulares proeminentes. Estas células estão frequentemente misturadas com células mais pequenas de citoplasma eosinofílico granular. Algumas células são binucleadas com núcleos geralmente pequenos. Halos perinucleares são frequentes. Uma outra característica usada no diagnóstico diferencial é a reacção de coloração citoplasmática com o corante de ferro de Hale (3; 4).

O protótipo do carcinoma dos ductos colectores tem um padrão de crescimento tubular ou tubopapilar no qual glândulas irregulares anguladas infiltram o parênquima renal e estão associadas com o estroma desmoplástico. Podem ser observadas algumas papilas invaginadas e alterações microcísticas. Padrões sólidos, em forma de cordões e de características sarcomatóides podem ser encontrados (3).

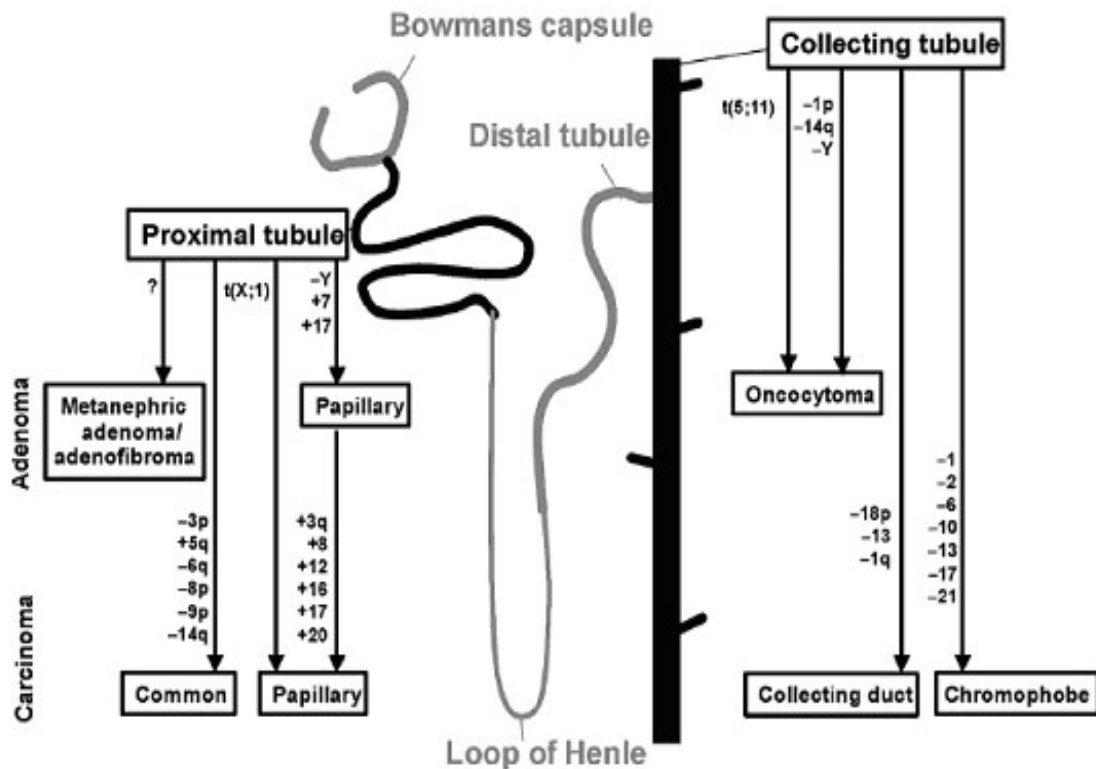
Os oncocitomas são considerados tumores benignos ou tumores *borderline*. Estes tumores são caracterizados histologicamente pela presença de células oncocíticas, que aparentam ser de origem epitelial com características eosinofílica e granular, tendo, geralmente, fraco potencial de metastização (3; 8). Não existe reacção de coloração difusa do citoplasma com ferro coloidal de Hale nos oncocitomas.

Os adenomas são, tal como os oncocitomas, classificados como tumores benignos.

## **2.1 – Classificação de Heidelberg**

Com base em estudos citogenéticos surgiu a classificação de Heidelberg que subdivide os tumores de células renais em benignos ou malignos e relaciona cada subtipo com alterações genéticas características (Fig. 3) (10).

Os carcinomas renais de células claras são, segundo a classificação de Heidelberg, caracterizados, principalmente, por perda de material genético do braço curto do cromossoma 3, incluindo a região 3p25-26, onde está localizado, entre outros, o gene Von Hippel-Lindau (*VHL*). As mutações do gene supressor tumoral *VHL* são exclusivas deste tipo de tumores. Outras alterações cromossômicas como a duplicação do 5q e deleções de 6q, 8q, 9p e 14q, são relativamente comuns nos carcinomas renais de células claras. Os adenomas papilares do rim são caracterizados por trissomia dos cromossomas 7 e 17, os carcinomas papilares (que correspondem a 10-15% dos tumores das células renais) têm adicionalmente trissomia dos cromossomas 12, 16, 20 e 3q. Os carcinomas cromóforos do rim têm origem nas células do tubo colector, representam cerca 2-5% dos tumores das células renais e são caracterizados por monossomia dos cromossomas 1, 2, 6, 10, 13, 17 e 21. Por outro lado, os oncocitomas renais são tumores benignos que podem apresentar cariótipo normal, perda das regiões cromossômicas 1p e 14q, ou translocações envolvendo a região 11q13 (10). Os carcinomas renais do tubo colector apresentam alterações genéticas menos específicas.



**Figura 3** – Classificação de Heidelberg dos tumores de células renais. Adaptado de Kovacs *et al* (10).

## 2.2 – Estadiamento e prognóstico

Diversos factores de prognóstico têm sido intensamente estudados, alguns com papel já bem estabelecido, como o estágio da doença e a presença de degeneração sarcomatosa. Outros, como a presença de invasão vascular, o envolvimento da pélvis renal, o grau nuclear e o tipo celular, são descritos de forma controversa na literatura.

O estágio patológico tem sido demonstrado como o principal factor de prognóstico nos doentes com carcinoma de células renais. Os doentes com doença confinada ao rim apresentam uma sobrevida significativamente superior

comparativamente aos pacientes com tumores localmente avançados ou com disseminação à distância (3).

O sistema de estadiamento proposto por Robson, muito utilizado no passado, tem sido substituído pelo sistema TNM elaborado pela “International Union Against Cancer” (UICC) juntamente com o “American Joint Committee on Cancer” (AJCC) (11). A preferência pelo sistema TNM pode ser justificada pelo facto de, no sistema de Robson, não fazer qualquer consideração sobre o tamanho do tumor, dado importante para o prognóstico dos doentes (11; 12; 13).

Outro parâmetro que se tem mostrado de grande valia como marcador prognóstico é o grau de diferenciação da neoplasia. Diferentes sistemas de graduação têm sido utilizados, nomeadamente o sistema de graduação de Fuhrman (14). De acordo com este sistema, os tumores são classificados numa escala de 1 a 4, tendo em conta a sua similaridade em relação às células renais normais (3).

### **3 – Biologia molecular do CCR**

O processo de transformação neoplásica é um processo complexo que resulta da aquisição progressiva de lesões genéticas, as quais se vão acumulando nas células descendentes. Estas lesões têm como principais alvos três classes distintas de genes: os proto-oncogenes, os genes supressores tumorais e os genes de reparação do DNA (15).

Os oncogenes são formas alteradas de genes celulares, os proto-oncogenes, que codificam proteínas intervenientes no crescimento e diferenciação celular. Um proto-oncogene pode transformar-se em oncogene por mecanismos de mutação pontual,

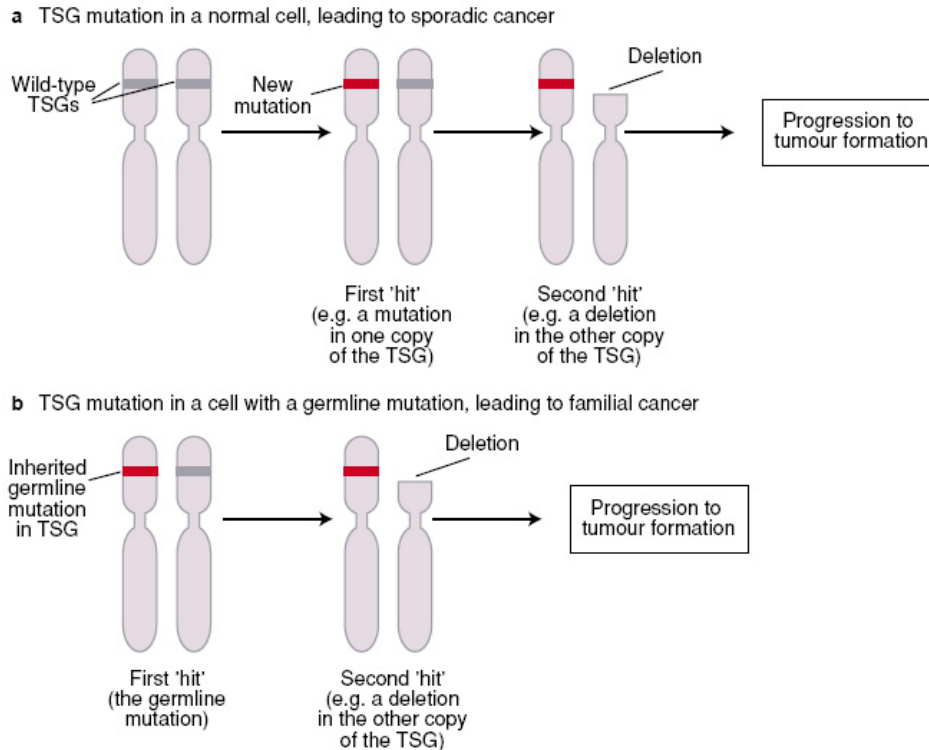
amplificação, rearranjos cromossômicos e/ou recombinações entre DNA retro-vírico e proto-oncogene, tornando-se constitutivamente activo. Ao contrário do que acontece nos genes supressores tumorais, basta um alelo alterado de um proto-oncogene para alterar o fenótipo celular (16; 17).

Os genes supressores tumorais codificam proteínas envolvidas nas vias de sinalização intracelular, permitindo à célula receber e processar sinais inibidores do crescimento ou indução da apoptose. Na maioria dos casos, para que ocorra transformação neoplásica, as mutações nos genes supressores tumorais têm de ocorrer em ambos os alelos, como explica a “teoria dos dois eventos” de Knudson. (Fig. 4) (18). Segundo este modelo, e aplicado ao retinoblastoma, serão necessários dois eventos mutagénicos para que ocorra o desenvolvimento da neoplasia. Na forma hereditária a primeira mutação surge na linhagem germinativa, enquanto que na esporádica ambas as mutações são somáticas, ocorrendo na mesma linhagem celular. Este modelo foi aplicado na generalidade das neoplasias para explicar o envolvimento dos genes supressores tumorais na sua génese.

Os genes de reparação do DNA garantem a fidelidade do código genético. A sua perda de função aumenta a probabilidade de ocorrência de mutações noutros genes, como os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais (18).

O CCR familiar de células claras tem na sua génese alterações do cromossoma 3, em particular a perda da região 3p13pter, o que sugere o envolvimento de um gene supressor tumoral como elemento chave na carcinogénese deste tipo de tumores (8). Diversos genes com actividade de supressor tumoral estão localizados nesta região, nomeadamente: *Von Hippel-Lindau (VHL)*, *hereditary renal cancer associated 1 (HRCAL)*, *non-papillary*

*renal cell carcinoma 1 (NRC-1)* e o gene *8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1)*, sendo o gene *VHL* o mais estudado.



Knudson's two-hit hypothesis for tumourigenesis involving a tumour suppressor gene (TSG)

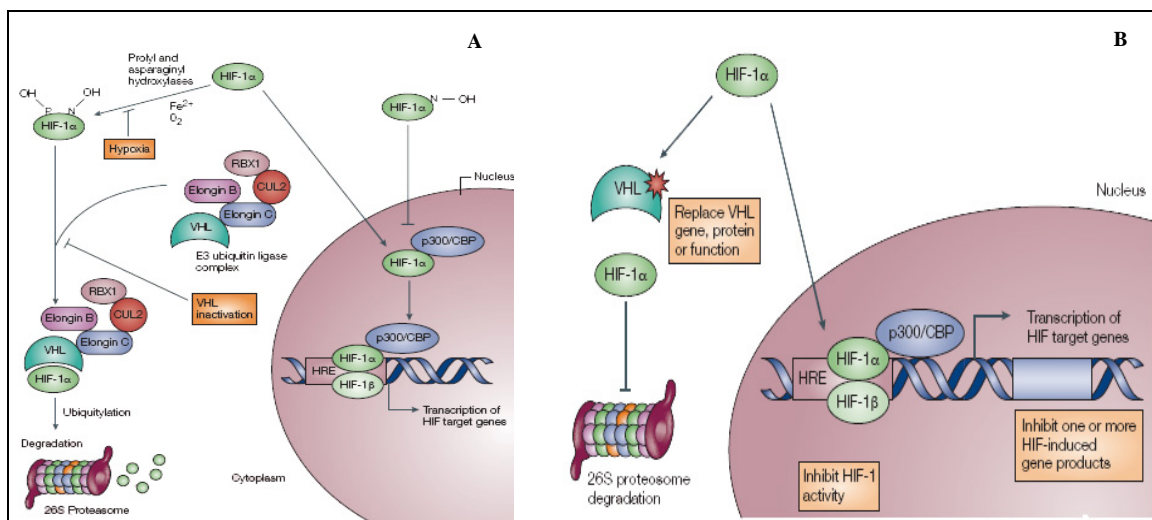
Expert Reviews in Molecular Medicine ©2001 Cambridge University Press

**Figura 4** – Teoria dos dois eventos de Knudson. Adaptada de Frances M. Richardson (19).

Diversos estudos identificaram as mutações do gene *VHL* como um evento primário na carcinogénese dos tumores renais das células claras. As mutações deste gene estão frequentemente associadas à sobre-expressão de genes como o *vascular endothelial growth factor (VEGF)* e o gene da eritropoietina (*EPO*), os quais são regulados por genes induzidos pela hipoxia, sugerindo um potencial envolvimento do *VHL* na regulação destes genes. Em condições de normoxia, o *VHL* liga-se à proteína *hypoxia-inducible*

*factor 1* (HIF-1), promovendo a sua ubiquitinação (6). A inativação de ambos os alelos do *VHL* leva à acumulação de HIF-1 e subsequente aumento da transcrição de genes que codificam diversos factores de crescimento como, por exemplo, o VEGF (Fig. 5A) (6).

Nos últimos anos diversos estudos têm sido feitos no sentido de encontrar possíveis alvos terapêuticos intervenientes nas vias de sinalização da proteína VHL (Fig. 5B) (6), (20; 21).



**Figura 5** – A: Desregulação da proteína HIF-1 pela proteína VHL. B: Possíveis alvos terapêuticos intervenientes nas vias de sinalização da proteína VHL. Adaptado de Pavlovich *et al* (6).

Outro gene cujo papel na carcinogénese renal está relativamente estabelecido é o proto-oncogene *MET* localizado no braço longo do cromossoma 7, que codifica uma proteína cinase de tirosina identificada como o receptor do factor de crescimento dos hepatócitos (HGF). A activação somática do *MET* dá-se por amplificação. Diversos estudos identificaram o proto-oncogene *MET* como responsável pelo carcinoma papilar hereditário do rim. Mutações neste gene também foram encontradas em alguns carcinomas das células renais papilares esporádicos (5; 21; 22; 23).

O gene *BHD* foi identificado como o gene responsável pela síndrome Birt-Hogg-Dubé. Trata-se de um gene supressor tumoral e está localizado no braço curto do cromossoma 17. Recentemente vários estudos têm sido feitos no sentido de identificar a função deste gene e determinar o seu papel na carcinogénese renal (5; 21; 22; 23).

A síndrome de cancro das células renais/leiomiomatose hereditário é causada por alterações no gene *FH* (fumarato-hidratase), o qual codifica uma enzima do ciclo de Krebs. Mutações neste gene levam à forma hereditária do carcinoma papilar do rim tipo II (5; 21; 22; 23).

#### **4 – Tratamento**

A abordagem terapêutica de eleição no tratamento do carcinoma renal é a cirurgia. No entanto, cerca de 30% dos doentes com carcinoma renal apresentam metástases clinicamente evidentes no momento do diagnóstico e uma elevada percentagem dos restantes pacientes desenvolvem metástases ao longo da sua evolução. Ao contrário do que acontece com outros tumores metastáticos, o carcinoma renal metastático é considerado incurável (7; 24).

#### **4.1 – Cirurgia**

A abordagem cirúrgica inicial é essencial para o correcto estadiamento da doença. Quando o cancro está localizado, a excisão cirúrgica do rim afectado e dos gânglios linfáticos proporciona uma elevada probabilidade de cura. Se o tumor invadiu a veia renal ou inclusivé a veia cava, sem metastizar, a cirurgia ainda pode ser uma favorável abordagem curativa. Na maioria dos casos, devido à elevada probabilidade de recidiva, a cirurgia deve ser seguida de imunoterapia (7; 24).

#### **4.2 – Radioterapia**

O papel da radioterapia no carcinoma renal é melhorar o controlo loco-regional da doença e deve ser utilizada como terapia complementar à cirurgia. A estratégia terapêutica multidisciplinar admite diversas sequências de tratamento. A radioterapia neoadjuvante tem como objectivo melhorar os resultados da cirurgia no que diz respeito à ressecabilidade do tumor. A radioterapia adjuvante pode promover o controlo tumoral local e evitar uma recidiva (7; 24).

#### **4.3 – Terapia biológica**

A imunoterapia utiliza a capacidade natural do organismo para combater o cancro através do sistema imunitário. As proteínas imunomoduladoras são compostos que alteram a resposta biológica do organismo a um determinado estado patológico. Fazem

parte deste grupo substâncias que actuam indirectamente mediando os efeitos antitumorais (ex.: aumentando a resposta imunológica às células neoplásicas) ou directamente nas células tumorais (ex.: substâncias que actuam na diferenciação celular).

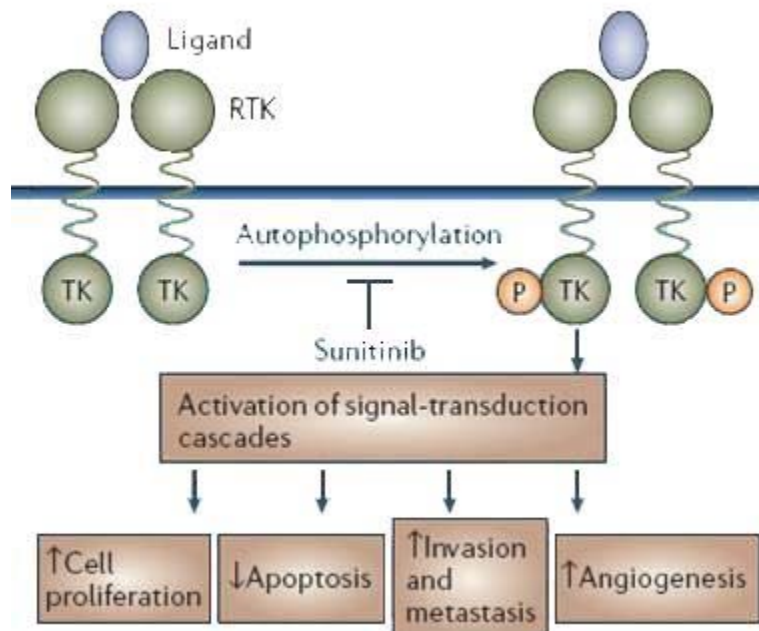
O interferão-alfa (IFN- $\alpha$ ) e a interleucina-2 (IL-2) foram, durante várias décadas, o único tratamento eficaz em os doentes com carcinoma das células renais metastático. No entanto, estes agentes apenas proporcionam um aumento modesto na sobrevivência de um número limitado de pacientes e estão associados a uma toxicidade substancial, principalmente em altas doses. O seu uso está reservado a doentes com carcinomas renais de células claras e cuja condição física seja capaz de suportar os efeitos secundários do tratamento. A combinação da IL-2 com IFN- $\alpha$  induz maior taxa de resposta (24).

A terapia com IFN- $\alpha$  e IL-2 tem vindo a ser substituída por novos agentes inibidores de componentes específicos que desempenham um papel importante nas vias de crescimento tumoral e angiogénese. Estes agentes incluem inibidores de receptores cinase de tirosina, como o sunitinib e o sorafenib, o anticorpo monoclonal bevacizumab e o temsilolimus um inibidor da cinase *mammalian target of rapamycin* (mTOR). Actualmente, o agente mais estudado tem sido o sunitinib (24; 25; 26; 27).

### **4.3.1 – Terapia dirigida com malato de sunitinib (SUTENT®)**

O malato de sunitinib inibe múltiplos receptores cinase de tirosina que estão implicados no crescimento tumoral, na angiogénese patológica e na progressão metastática do cancro (Fig. 6). O sunitinib foi identificado como inibidor do PDGFR $\alpha$  e PDGFR $\beta$ , *vascular endothelial growth factor receptors* (VEGFR1, VEGFR2 e

VEGFR3), *stem-cell factor receptor* (KIT), receptor *fms-related tyrosine kinase 3* (FLT3) e o receptor *ret proto-oncogene* (RET) (25; 28).



**Figura 6** – Inibição da actividade dos receptores de tirosina-cinase pelo sunitinib. Adaptado de Atkins *et al* (29).

Estudos recentes confirmam a eficácia do sunitinib como tratamento de segunda linha em pacientes com tumores renais das células claras metastáticos (25; 30; 31). Um estudo de fase 3 internacional, aleatório e multicêntrico, com intuito de avaliar a eficácia e segurança do sunitinib *versus* IFN- $\alpha$  em doentes tratados em primeira linha para CCR metastático, comprovou que os doentes tratados com sunitinib apresentavam sobrevivência livre de progressão superior aos submetidos a terapêutica com interferão- $\alpha$ , assim como uma taxa de resposta à terapia mais elevada (31). Neste estudo foram

avaliados 750 doentes numa proporção de 1:1 para cada ramo terapêutico. A mediana de sobrevivência livre de progressão para o grupo de tratamento com sunitinib foi de 47,3 semanas, comparativamente com 22,0 semanas para o grupo de tratamento com IFN- $\alpha$  (31).

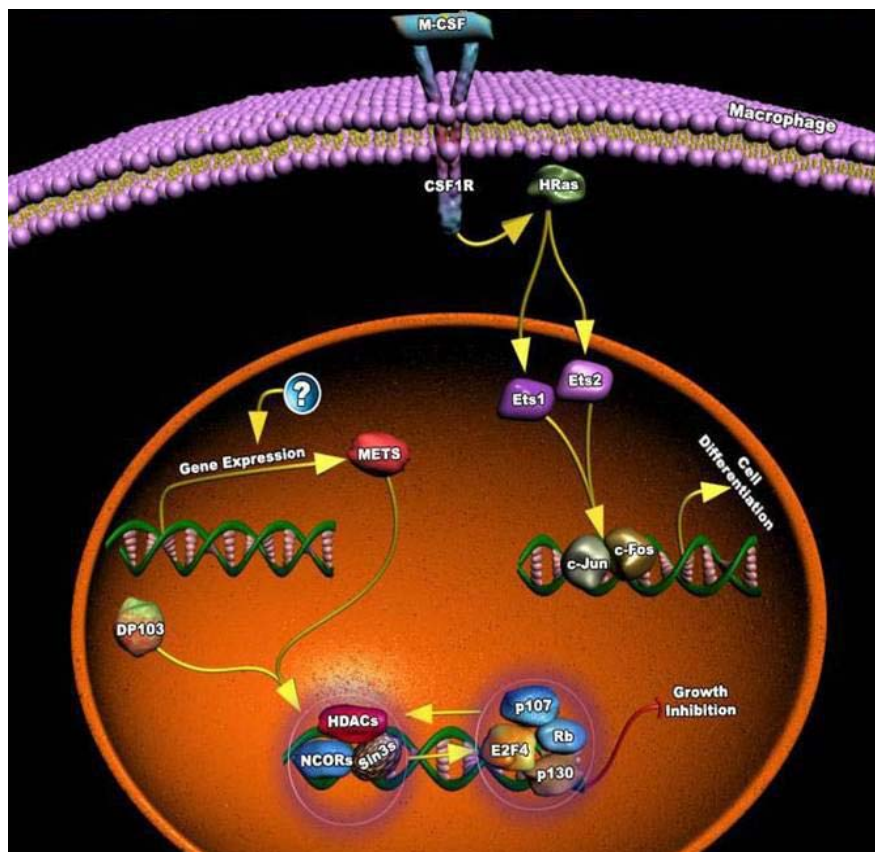
## 5 – O gene *CSF1R*

Para além da deleção de 3p, a duplicação da região cromossómica 5q21-35 é a alteração citogenética mais frequentemente encontrada nos carcinomas renais das células claras. Enquanto o gene *VHL* parece ser o gene alvo da deleção 3p, é ainda desconhecido qual o gene(s) envolvido(s) nos ganhos de 5q. Diversos genes relacionados com o crescimento ou proliferação celular encontram-se localizados nesta região, nomeadamente: *platelet-derived growth factor-beta* (*PDGFR $\beta$* ), *colony-stimulating factor 1 receptor* (*CSF1R*), *fibroblast growth factor 1* (*FGF1*), *interleukin 9* (*IL9*), *cell division cycle 25* (*CDC25*) e *cell division cycle 25C* (*CDC25C*) (32).

O gene *CSF1R*, localizado em 5q33-35, é constituído por 22 exões e codifica uma proteína cinase de tirosina (*CSF1R*) composta por 972 aminoácidos. Esta proteína está envolvida na produção, diferenciação e função dos macrófagos (Fig. 7). O grupo das cinases de tirosina é constituído por várias proteínas e está envolvido na regulação de vias de sinalização celular através da fosforilação dos resíduos de tirosina. Dividem-se em dois grupos, receptores ou não receptores, sendo o primeiro grupo constituído por um domínio transmembranar e o segundo por um domínio citoplasmático (33). Numa célula normal estas proteínas encontram-se em estado de equilíbrio alternando entre as

conformações activa e inactiva, consoante a presença de factores de crescimento estimulantes ou inibidores (33).

Mutações neste gene foram descritas em indivíduos com doenças hematológicas malignas e a sua sobre-expressão foi associada com mau prognóstico em diversas neoplasias, nomeadamente nos cancros da mama e ovário (34; 35; 36; 37; 38). Recentemente, alguns estudos mostram que o gene *CSF1R* é expresso em CCRs, mas o seu significado na carcinogénese renal não está esclarecido (34; 39; 40). Os codões 301 e 969 do gene *CSF1R*, localizados, respectivamente, nos exões 7 e 22 do gene *CSF1R*, estão potencialmente envolvidos na promoção da alteração da actividade da proteína CSF1R (36). Mutações no codão 301 parecem associadas à transformação neoplásica através da activação constitutiva do receptor cinase de tirosina (36). Deleções ou mutações no codão 969 podem conduzir à regulação positiva da sua actividade (41).



**Figura 7** – Vias de sinalização do *CSF1R*. Adaptado de [www.proteinlounge.com](http://www.proteinlounge.com) (42).



## **OBJECTIVOS**



## Objectivos

1. Avaliar a expressão do gene *CSF1R* nos diferentes subtipos histológicos de uma série consecutiva de tumores do rim e respectivos tecidos normais.
2. Analisar a relação entre o número de cópias e a expressão do gene *CSF1R* nos carcinomas de células renais mais comuns (células claras, papilares e cromófbos).
3. Pesquisar mutações nos exões 7 e 22 do gene *CSF1R* em carcinomas de células claras do rim.



## **MATERIAL E MÉTODOS**



## 1 – Material biológico

Este estudo foi realizado em 75 amostras de tumores renais recolhidas consecutivamente no IPO-Porto (Tab. 2). De acordo com a classificação histológica, os carcinomas renais eram 40 de células claras, 5 papilares e 13 cromófbos; os tumores restantes pertenciam a outros grupos histológicos. Para cada caso foram ainda obtidas amostras do respectivo tecido renal não neoplásico à distância.

**Tabela 2** – Caracterização clínico-patológica dos doentes estudados.

Amostra	Sexo	Tipo Histológico	Grau de Fuhrman	Idade de Diagnóstico
RT 126T	F	Leiomiossarcoma	-	58
RT 127T	F	Linfoma não-Hodgkin folicular	-	70
RT 128T	M	Células claras	2	57
RT 129T	F	Cromófobo	3	47
RT 130T	M	Células claras	3	72
RT 131T	M	Células claras	4	66
RT 132T	M	Células claras	2	64
RT 133T	M	Células claras	2	65
RT 134T	F	Cromófobo	3	76
RT 135T	F	Oncocitoma	-	58
RT 136T	F	Cromófobo	2	71
RT 137T	F	Células claras	2	50
RT 138T	F	Células claras	3	68
RT 139T	M	Célula clara associado a áreas de tipo célula cromófila, de padrão papilar	3	75
RT 140T	M	Células claras	2	64
RT 141T	M	Oncocitoma	-	65
RT 142T	M	Células claras	3	45
RT 143T	F	Células claras	2	63
RT 144T	M	Células claras	3	46
RT 145T	F	Oncocitoma	-	70
RT 146T	F	Oncocitoma	-	73
RT 147T	M	Papilar	3	47
RT148T	M	Oncocitoma	-	73
RT 149T	M	Carcinoma de células claras de padrão misto (tipo célula cromófila, de padrão papilar, com áreas do tipo célula clara)	2	43

<b>Amostra</b>	<b>Sexo</b>	<b>Tipo Histológico</b>	<b>Grau de Fuhrman</b>	<b>Idade de Diagnóstico</b>
RT 150T	F	Células claras	2	44
RT 151T	M	Células claras	3	53
RT 152T	M	Células claras	3	33
RT 153T	F	Cromóforo	2	73
RT 154T	M	Células claras	2	54
RT 155T	M	Células claras	3	68
RT 156T	M	Cromóforo	4	76
RT 157T	M	Células claras	2	67
RT 158T	M	Células claras	2	64
RT 159T	F	Células claras	3	53
RT 160T	F	Células claras	2	79
RT 161T	M	Células claras	2	51
RT 162T	M	Oncocitoma	-	71
RT 163T	F	Células claras	3	69
RT 164T	M	Células claras	3	60
RT 165T	M	Células claras	3	54
RT 166T	M	Células claras	3	51
RT 167T	M	Carcinoma urotelial	-	76
RT 168T	M	Células claras	2	79
RT 169T	F	Cromóforo	4	72
RT 170T	F	Células claras	3	46
RT 171T	M	Oncocitoma	-	76
RT 172T	M	Células claras	3	59
RT 173T	M	Células claras	3	69
RT 174T	M	Células claras	2	81
RT 175T	F	Cromóforo	2	50
RT 177T	M	Células claras	4	50
RT 178T	M	Oncocitoma	-	59
RT 179T	M	Papilar	3	66
RT 180T	F	Células claras	2	29
RT 181T	F	Células claras	3	69
RT 182T	M	Papilar	3	74
RT 183T	F	Cromóforo	4	43
RT 184T	M	Carcinoma urotelial papilar	-	64
RT 185T	M	Angiomiolipoma	-	74
RT 186T	F	Células claras	3	56
RT 187T	M	Papilar	3	56
RT 188T	M	Células claras	4	82
RT 189T	F	Carcinoma urotelial papilar	-	66
RT 190T	F	Células claras	3	66
RT 191T	M	Células claras	3	55
RT 192T	M	Cromóforo	4	51
RT 193T	F	Cromóforo	2	59
RT 194T	M	Cromóforo	4	72
RT 195T	F	Cromóforo	4	36

---

---

Amostra	Sexo	Tipo Histológico	Grau de Fuhrman	Idade de Diagnóstico
RT 196T	F	Cromóforo	2	60
RT 197T	F	Carcinoma de células renais cístico multilocular	-	72
RT 198T	M	Papilar	3	70
RT 199T	M	Células claras	2	55
RT 200T	F	Células claras	3	57
RT 201T	M	Células claras	3	74

Cada amostra para análise molecular foi colhida por um anátomo-patologista do referido centro e imediatamente congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O restante material foi embebido em parafina para análise histopatológica e FISH.

## 2 – Métodos

### 2.1 – Extração de ácidos nucleicos

DNA foi extraído pelo método de fenol/clorofórmio descrito por Pearson *et al* (43), utilizando solução de proteinase-K (20mg/mL). A concentração do DNA extraído de cada amostra foi determinada por medição espectrofotométrica num aparelho NanoDrop (ND-1000).

Para a extração de RNA utilizou-se o *FastRNA Green Kit* (Qbiogene, Carlsbad, CA). As amostras foram processadas no homogeneizador *FastPrep FP120 Instrument* (Qbiogene, Carlsbad, CA), durante 40 segundos a uma velocidade de 4,5 m/sec.

## 2.2 – RT-PCR Quantitativo

Para a realização da reacção de transcrição reversa sintetizou-se cDNA com o *kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

Para a amplificação do gene *CSF1R* e do gene de referência *hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT)* foram adquiridos *primers* e sondas TaqMan® comercialmente disponíveis (Applied Biosystems, Foster City, CA). A reacção foi efectuada num aparelho TaqMan® ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA).

A solução de cDNA obtida foi dividida em duas alíquotas de igual concentração e a análise dos dois genes (*CSF1R* e *HPRT*) foi realizada em triplicado, num volume final de 20µL, contendo 1µM de cada primer, 0,25µM de sonda, 1µL de TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 9µL de cDNA. Controlos negativos com H<sub>2</sub>O bidestilada foram usados em todas as reacções.

As condições de RT-PCR quantitativo foram as seguintes: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, seguido de 50 ciclos a 95°C durante 15 segundos e emparelhamento (*annealing*) a 60°C durante 1 min.

Em cada análise foram ainda incluídas diluições em série de um controlo positivo, de forma a construir uma curva de calibração.

Para determinar o nível de expressão do gene *CSF1R*, o valor médio de expressão em cada amostra (analisada em triplicado) foi dividido pelo valor médio de expressão do gene de referência para as mesmas amostras. Este valor foi então dividido pelo valor

médio de expressão do gene alvo nos tecidos normais, normalizado com o valor médio de expressão do gene de referência nos mesmos casos, obtendo assim os valores relativos de expressão do gene de alvo (*RCSF1R*) para cada amostra (44). O valor limite normalizado a partir do qual se considerou sobre-expressão do *CSF1R* foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: Média<sub>NORMAIS</sub> + 3\*DP<sub>NORMAIS</sub> (DP: desvio padrão).

### **2.3 – Hibridação fluorescente in situ (FISH)**

A análise por FISH foi efectuada em cortes de parafina com 5µm de espessura, colados em lâmina revestida com Poli-L-Lisina (Sigma Chemical Co.).

Após a desparafinação (duas passagens por xilol seguidas por duas passagens em etanol a 100%), a lâmina foi imersa numa solução de 2XSSC, durante 3 min à temperatura ambiente, seguida de duas passagens em solução 2XSSC durante 2 min à temperatura ambiente. A digestão foi realizada numa solução de pepsina a 6mg/mL, durante 20 min a 37°C. No final, a amostra foi desidratada, por lavagens de concentração crescente de soluções de etanol (70, 96 e 100%), e adicionou-se a sonda *LSI 5q33-34 (CSF1R) /D5S721, D5S23* (Vysis) [mistura de sondas que inclui LSI CSF1R Spectrum Orange (150Kb) e LSI D5S721, D5S23 Spectrum Green (450Kb)] à zona de hibridação. A amostra e a sonda foram co-desnaturadas a 80°C durante 8 min e incubadas a 37°C durante 18h, de forma a promover a hibridação. Após a reacção de hibridação, procedeu-se a três lavagens em solução de 2XSSC, sendo a primeira e a última realizadas com 0,1% de Igepal (Sigma), à temperatura ambiente e a segunda com 0,5% de Igepal, a 73°C

durante 5 min. Por fim, foram adicionados 10 $\mu$ L de solução contrastante 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) e conservou-se a lâmina ao abrigo da luz.

O limite da percentagem de células a partir do qual se considerou o número de cópias do gene *CSF1R* anómalo foi calculado com base nos resultados de cinco amostras de tecido renal normal, utilizando a fórmula  $\beta$  inverse do Microsoft Excel (45).

As amostras avaliadas por esta técnica foram os carcinomas renais das células claras, cromóforos e papilares, perfazendo um total de 58 amostras.

## 2.4 – Imunohistoquímica

Para a análise imunohistoquímica da proteína CSF1R nos carcinomas de células renais usaram-se cortes com 5 $\mu$ m de espessura, colados em lâminas revestidas com Poli-L-Lisina (Sigma Chemical Co.).

A expressão da proteína foi avaliada através do método da avidina-biotina (Vectastain Universal, Elite ABC Kit). Após a desparafinação e hidratação, inibiram-se as peroxidases endógenas por incubação das lâminas numa solução de 0,3% de peróxido de hidrogénio (E. MERCK, D-6100), a 5% em metanol, durante 20 min. O peróxido de hidrogénio em excesso foi removido numa lavagem em solução Tween/PBS (PBS: tampão fosfato salino) 0,1% e a imunoreactividade não específica eliminada por incubação das lâminas em soro normal de cavalo, diluído a 1:100 em tampão PBS com 10% de albumina sérica bovina (BSA), durante 30 min, em câmara húmida. O soro normal em excesso foi removido e as lâminas incubadas com o anticorpo policlonal de

coelho (c-Fms/CSF-1R: sc-692; Santa Cruz Biotechnology), diluído a 1:200 em tampão PBS com 10% de BSA, a 4°C durante a noite.

Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram novamente imersas em duas lavagens com solução Tween/PBS 0,1% e incubadas à temperatura ambiente, durante 30 min, com o anticorpo secundário (2µL de soro normal + 2µL de anticorpo biotilado/100µL PBS-BSA 10%). Posteriormente, as lâminas foram lavadas em solução PBS e incubadas durante 30 min, à temperatura ambiente, com o complexo avidina-biotina (ABC) (2µL de reagente A+ 2µL de reagente B/100µL PBS-BSA 10%). A revelação foi realizada por incubação das lâminas numa solução de 0,5 % peróxido de hidrogénio em PBS-BSA 1%, com 0,025g de 3,3-diaminobenzidina tetrahidroclorida (D-5367005 SIGMA), durante 7 min, ao abrigo da luz. A imunocoloração foi contrastada com hematoxilina (Harris modified Hematoxylin Fisher #Sh30-4D). Após a desidratação procedeu-se à montagem das lâminas com “Entellan” (E. Merck).

A análise imunohistoquímica dos casos envolveu a utilização de controlos positivos, isto é, cortes de tecido de placenta e de carcinoma renal das células claras, os quais apresentavam imunoreactividade intensa para a proteína em estudo. Os controlos negativos foram estabelecidos pela substituição do anticorpo primário por BSA a 5% em PBS.

## **2.5 – Pesquisa de mutações no gene CSF1R**

A pesquisa de mutações no gene *CSF1R* foi efectuada nas 40 amostras de carcinomas renais de células claras.

### 2.5.1 – Reacção em cadeia da polimerase (PCR)

Para a reacção de PCR usaram-se *primers* descritos por F. M. Abu-Duhier *et al* (46) específicos para os exões 7 e 22 do gene *CSF1R* (Tab. 3), onde estão descritas mutações em indivíduos com doenças hematológicas malignas.

**Tabela 3** – Sequências dos primers utilizados para amplificação dos exões 7 e 22 do gene *CSF1R*.

Exão	Primer	Sequência	Fragmento (bp)
7	7F	5'-GGTGGATGACAAAATGGAC-3'	331
	7R	5'-CTTGCTGAAGCATACCCCAT-3'	
22	22F	5'-GAGAGAGCGGGTGAGTGG-3'	382
	22R	5'-GCCGAGCTGTTGAGTGAAAT-3'	

A reacção de amplificação ocorreu num volume total de 30µL de uma solução contendo: 3µL de *buffer* 10X (FERMENTAS), 2,5µL de MgCl<sub>2</sub> (FERMENTAS; [25mM]), 0,4µL de dNTPs (FERMENTAS; [10 mM]), 1,5µL de cada *primer* ([10µM]), 0,2µL de *Taq DNA polimerase* (FERMENTAS; [5u/µL]), 30 a 50ng de DNA genómico e água destilada até perfazer o volume.

Num termociclador Perkin-Elmer *Gene-Amp PCR System 9700*, as amostras foram desnaturadas a 95°C durante 1 min, sujeitas a 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, emparelhamento (*annealing*) a 57°C durante 30 segundos, extensão a 72°C durante 1 min e, por fim, um ciclo de extensão final a 62°C durante 20 min.

A presença de produto de PCR foi verificada através de electroforese em gel de agarose a 2% (p/v) corado com brometo de etídeo.

Os produtos de PCR foram purificados com o *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Pharmacia Biotech) com o intuito de remover sais, enzimas, nucleótidos e *primers* não incorporados. As amostras foram purificadas de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante e eluídas com H<sub>2</sub>O destilada.

Para quantificação, os produtos foram sujeitos a electroforese em gel de agarose a 2% (p/v) corado com brometo de etídeo.

### **2.5.2 – Sequenciação automática**

Os produtos purificados foram sequenciados num sequenciador automático ABI PRISM 310<sup>TM</sup> *Genetic Analyser* (Perkin-Elmer). Esta técnica baseia-se no método de didesoxi ou de Sanger (Sanger, 1981). Para a reacção de marcação das cadeias de DNA usaram-se 30 a 90ng de DNA, 4μL de *Terminator Reaction Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,7μL de *primer* e H<sub>2</sub>O destilada até perfazer o volume de 20μL. Esta reacção ocorreu num termociclador Perkin-Elmer *Gene-Amp PCR System 9700*, e consistiu em 30 ciclos de desnaturação a 96°C durante 10 segundos, *annealing* a 52°C durante 5 segundos e extensão a 60°C durante 4 min.

Com o objectivo de retirar o excesso de desoxinucleótidos não marcados, didesoxinucleótidos marcados e *primers* não incorporados, num tubo de microcentrífuga adicionou-se 50μL de etanol 96% (v/v), 2μL de acetato de sódio 3M e todo o produto de PCR. Agitaram-se os tubos num vórtex e incubaram-se 30 min a -20°C. De seguida, as

amostras foram centrifugadas a 14000rpm durante 30 min, a 4°C, e desprezou-se o sobrenadante. De seguida, lavou-se o precipitado com 250µL de etanol 70% (v/v) e deixou-se secar à temperatura ambiente. Ressuspendeu-se o precipitado em formamida desionizada (Applied Biosystems, Foster City, CA) e, após desnaturação a 95°C durante 5 min, colocaram-se as amostras no sequenciador automático.

## **2.6 – Análise estatística**

O estudo estatístico foi efectuado com o programa *SPSS for Windows* (versão 15.0) utilizando os testes adequados.

## **RESULTADOS**



## 1 – Expressão do gene *CSF1R* por RT-PCR quantitativo

A quantificação da expressão do gene *CSF1R* foi efectuada numa série de 75 amostras de tumores renais e respectivo tecido renal normal (Tab. 4).

**Tabela 4** – Resultados das análises por RT-PCR quantitativo, FISH e imunohistóquímica dos tumores renais e respectivos tecidos normais.

	AMOSTRA	RCSF1R Tecido neoplásico	RCSF1R Tecido adjacente normal	FISH Tecido neoplásico	IMUNO Tecido neoplásico
Células Claras	RT 128	18,60	0,22	Normal	Positiva
	RT 130	27,61	14,76	$(3^a+3^b)^c/4+4$	Positiva
	RT 131	16,15	0,17	Normal	Positiva
	RT 132	3,34	0,36	2+3/4+6	Positiva
	RT 133	4,52	1,31	Normal	Positiva
	RT 137	1,78	0,37	2+3	Positiva
	RT 138	9,05	0,36	Normal	Positiva
	RT 140	13,24	0,44	Normal	Positiva
	RT 142	4,66	0,40	2+4	Positiva
	RT 143	1,11	2,60	2+3/3+3/4+4	Positiva
	RT 144	18,92	0,39	Normal	Positiva
	RT 150	3,19	0,44	4+4/3+3	Positiva
	RT 151	4,53	0,63	4+4/5+5/3+3	Positiva
	RT 152	3,49	NA	2+3/3+3/2+4/4+4	Positiva
	RT 154	31,58	2,26	2+3/4+6	Positiva
	RT 155	11,75	0,42	3+3/4+4/6+6	Positiva
	RT 157	9,08	2,77	3+3/2+3	Positiva
	RT 158	20,07	1,28	3+3/2+3	Positiva
	RT 159	8,82	1,60	4+4/2+3	Positiva
	RT 160	5,24	1,07	Normal	Positiva
	RT 161	5,96	1,19	3+3/4+4	Positiva
	RT 163	2,66	0,16	Normal	Positiva
	RT 164	13,74	0,12	3+3	Positiva
	RT 165	5,50	0,20	Normal	Positiva
	RT 166	6,92	0,17	3+4/3+3/2+4/2+3	Positiva
	RT 168	10,89	0,51	Normal	Positiva
	RT 170	5,97	NA	2+3/3+3	Positiva
	RT 172	12,00	0,40	Normal	Positiva
	RT 173	7,36	NA	4+4/3+3	Positiva
	RT 174	1,54	0,20	3+3	Positiva
	RT 177	18,39	0,22	Normal	Positiva
	RT 180	NA	0,11	Normal	Positiva
	RT 181	1,93	0,48	4+4/3+3	Positiva
RT 186	14,02	NA	NA	Positiva	
RT 188	10,10	1,71	Normal	Positiva	

	AMOSTRA	RCSFIR Tecido neoplásico	RCSFIR Tecido adjacente normal	FISH Tecido neoplásico	IMUNO Tecido neoplásico
	RT 190	35,03	2,58	3+3/4+4	Positiva
	RT 191	19,64	0,16	3+3/5+5/4+4/6+6	Positiva
	RT 199	4,24	0,31	Normal	Positiva
	RT 200	11,66	0,14	3+3	Positiva
	RT 201	5,20	0,42	Normal	Positiva
Cromófobos	RT 129	0,11	0,05	4+4	Negativa
	RT 134	0,21	3,04	4+4/8+8	Negativa
	RT 136	0,15	0,11	1+1	Negativa
	RT 153	0,08	NA	4+4/3+3	Negativa
	RT 156	2,51	0,33	3+3/4+4/6+6	Negativa
	RT 169	10,50	0,14	Normal	Negativa
	RT 175	0,32	0,06	Normal	Negativa
	RT 183	0,57	0,72	NA	Negativa
	RT 192	0,01	0,07	3+3/4+4/6+6	Negativa
	RT 193	1,07	0,67	Normal	Negativa
	RT 194	0,04	0,12	4+4	Focal
	RT 195	NA	NA	NA	Focal
	RT 196	NA	NA	Normal	Negativa
Papilares	RT 147	72,03	NA	Normal	Positiva <sup>d</sup>
	RT 179	NA	0,08	Normal	Negativa
	RT 182	1,16	0,30	Normal	Negativa
	RT 187	7,04	NA	Normal	Focal
	RT 198	2,58	0,31	Normal	Positiva <sup>d</sup>
Oncocitomas	RT 135	0,04	0,33	ND	ND
	RT 141	1,93	0,89	ND	ND
	RT 145	0,03	0,76	ND	ND
	RT 146	NA	NA	ND	ND
	RT148	NA	NA	ND	ND
	RT 162	0,23	0,05	ND	ND
	RT 171	0,03	0,12	ND	ND
	RT 178	0,79	0,20	ND	ND
Outros	RT 126	0,67	3,67	ND	ND
	RT 127	13,76	1,11	ND	ND
	RT 139	2,67	0,23	ND	ND
	RT 149	NA	0,08	ND	ND
	RT 167	1,58	7,40	ND	ND
	RT 184	0,58	0,39	ND	ND
	RT 185	4,53	1,78	ND	ND
	RT 189	1,29	2,07	ND	ND
	RT 197	NA	0,47	ND	ND

<sup>a</sup> Número de cópias da região 5p15.2 (LSI D5S23, D5S721)

<sup>b</sup> Número de cópias da região 5q33q34 (LSI *CSF1R*)

<sup>c</sup> Subpopulação celular mais representativa indicada em primeiro

<sup>d</sup> Positividade membranar e citoplasmática

NA – não analisável.

ND – não determinado.

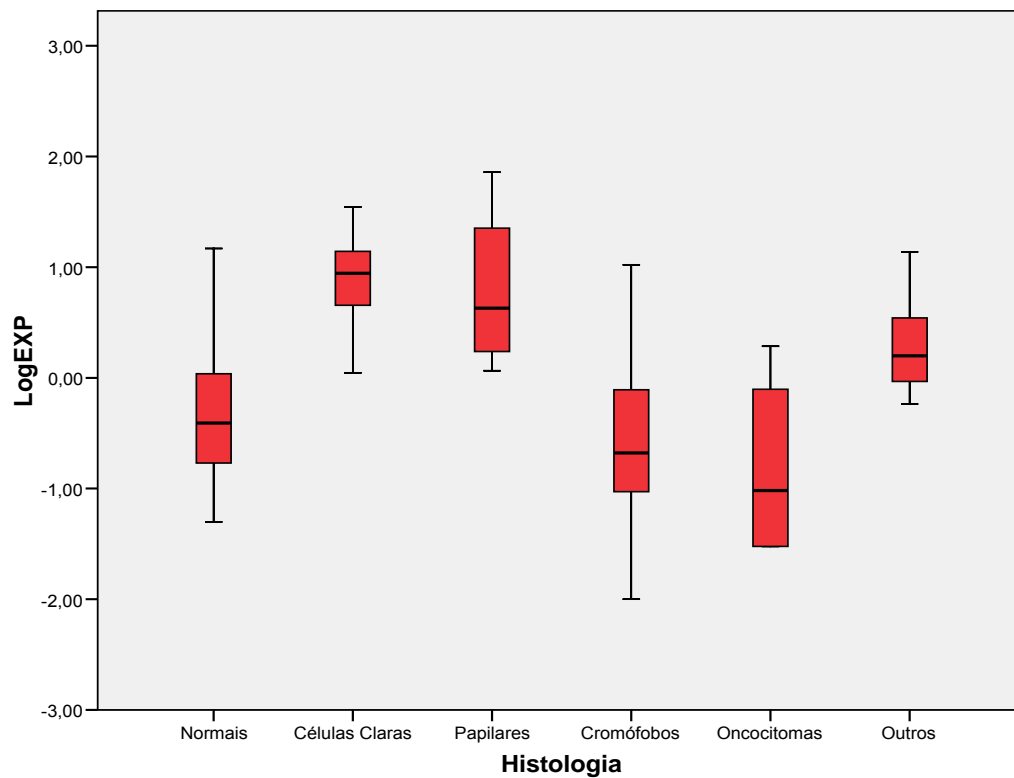
Valores de expressão (*RCSF1R*) superiores a 7,35 foram considerados valores de sobre-expressão

Os níveis de expressão relativa do gene *CSF1R* foram significativamente superiores nos tumores renais em comparação com os tecidos não neoplásicos (Mann-Whitney Test:  $p=5,26E^{-9}$ ).

Nos casos em que foi possível determinar o valor de expressão relativa do gene *CSF1R* em tecido neoplásico e respectivo tecido normal foi efectuada uma análise emparelhada, confirmando-se as diferenças significativas entre os dois grupos (Wilcoxon Signed Ranks Test:  $p=3,90E^{-8}$ ).

Para avaliar os níveis de sobre-expressão do gene *CSF1R* foram considerados os valores relativos de expressão superiores a 7,35 (Média NORMAIS + 3DP NORMAIS). Foi verificada sobre-expressão por RT-PCR em 53% de carcinomas renais de células claras, 8% de cromófobos e 20% de papilares. Nenhum dos oncocitomas apresentava sobre-expressão do *CSF1R* e apenas um dos restantes tumores renais apresentava sobre-expressão.

Analisando os grupos de tumores renais, o nível de expressão relativa do gene *CSF1R* foi significativamente superior no grupo de amostras de tumores do tipo células claras em relação à totalidade dos restantes tumores (Mann-Whitney Test:  $p=2,45E^{-7}$ ). Esta diferença não é significativa se compararmos apenas o grupo dos carcinomas de células claras com os papilares (Mann-Whitney Test:  $p=0,531$ ), provavelmente devido ao reduzido número de casos de tumores renais papilares nesta série. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os carcinomas cromófobos e os oncocitomas (Mann-Whitney Test:  $p=0,525$ ) (Fig. 8).

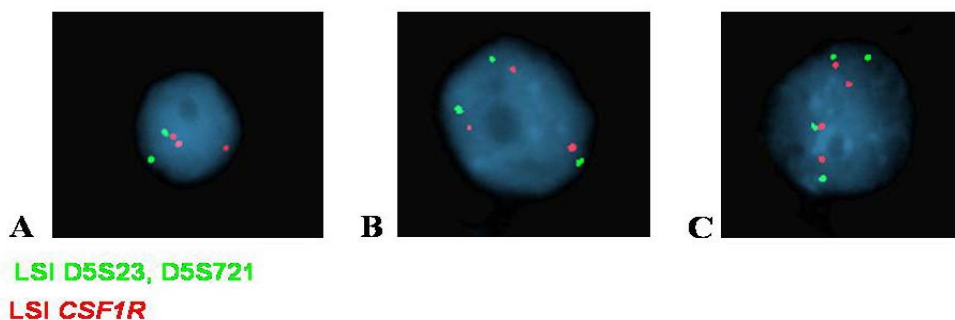


**Figura 8** – Distribuição do nível de expressão relativa do *CSF1R* nos diferentes tipos histológicos e respectivo tecido renal não neoplásico.

## 2 – Número de cópias do gene *CSF1R* por FISH

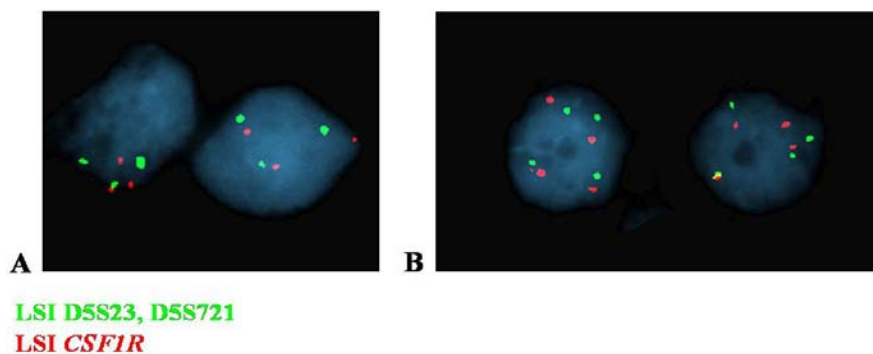
A análise por FISH foi realizada nas 58 amostras de carcinomas de células renais (células claras, papilares e cromófobos) (Tab. 4).

Das 40 amostras de carcinomas renais de células claras, 58% (23/40) apresentavam alterações cromossômicas, sendo as mais representativas 2+3 (15%; 6/40), 3+3 (25%; 10/40) ou 4+4 (13%; 13/40) (Fig. 9). Verificou-se ganho relativo do número de cópias do gene *CSF1R* em relação ao controlo em 11 carcinomas de células claras (2+3, 3+4, 2+4 ou 4+6), o que não se observou nos tumores do tipo cromóforo e papilar.



**Figura 9** – Alterações cromossômicas mais frequentemente observadas em carcinomas renais de células claras: 2+3 (A); 3+3 (B); 4+4 (C).

As alterações cromossômicas mais frequentemente observadas nos carcinomas renais cromófolos (50%; 6/13) foram alterações numéricas do tipo 4+4 e 3+3 (Fig. 10), não tendo sido detectado ganho relativo do número de cópias do gene *CSF1R* em relação ao controlo. Nos carcinomas cromófolos foi ainda observada perda de material cromossômico do cromossoma 5 (amostra RT 136T). Não foram observadas alterações cromossômicas nos carcinomas renais papilares.

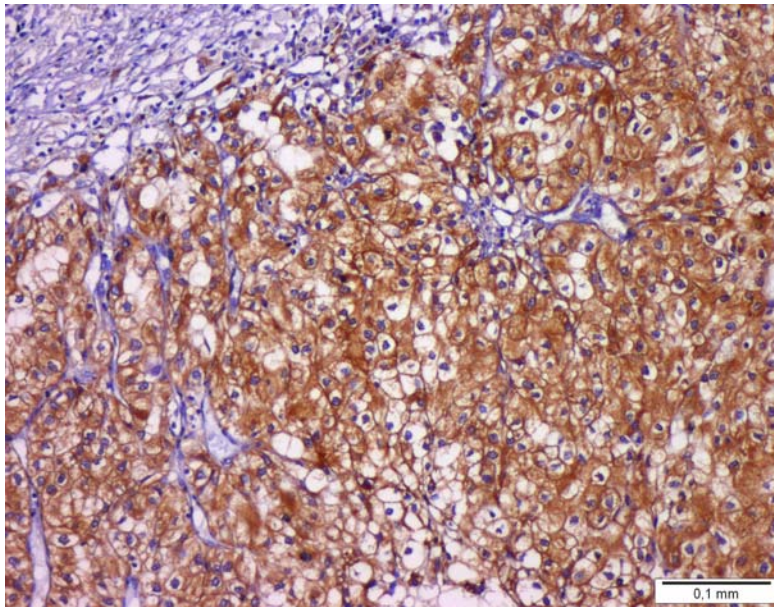


**Figura 10** – Alterações cromossômicas mais frequentemente observadas em carcinomas de células renais cromófolos: A, (3+3); B, (4+4).

### 3 – Expressão proteica do CSF1R por imunohistoquímica

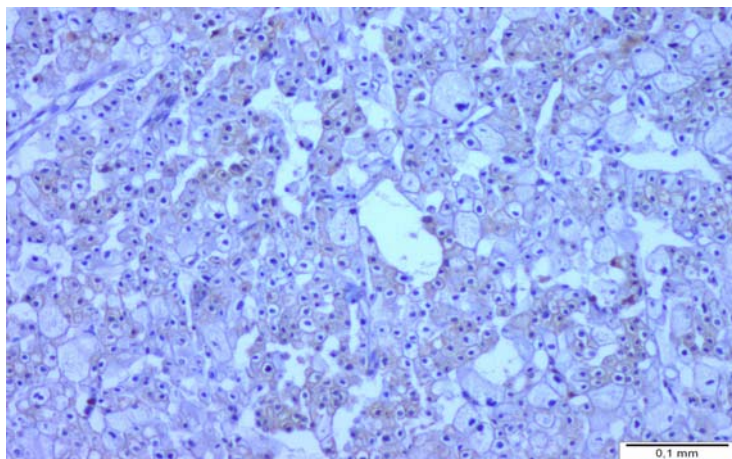
A análise por imunohistoquímica foi efectuada em 58 amostras de carcinomas de células renais e em 10 amostras de tecido renal não neoplásico.

Relativamente aos carcinomas renais de células claras analisados, todos apresentavam imunoreactividade membranar positiva (Fig. 11).



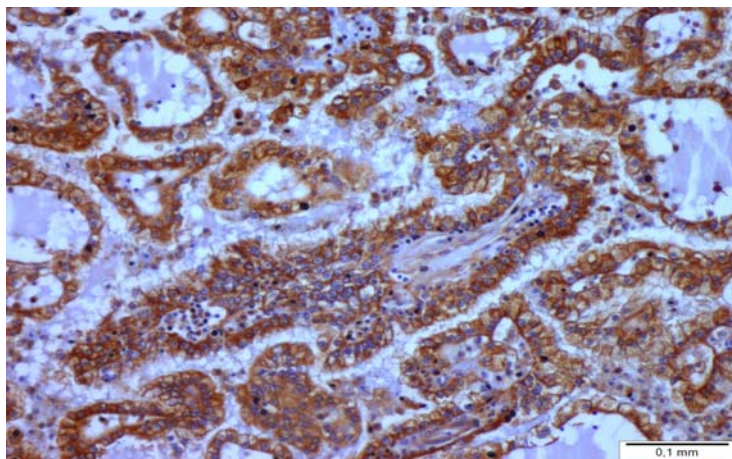
**Figura 11** – Carcinoma renal de células claras com imunoreactividade positiva membranar para a proteína CSF1R.

Das 13 amostras de carcinomas renais cromófobos analisadas, 23% (n=3) apresentavam apenas imunoreactividade focal (cerca de 25% de células com imunoreactividade positiva), sendo as restantes negativas (76%; n=10) (Fig. 12).

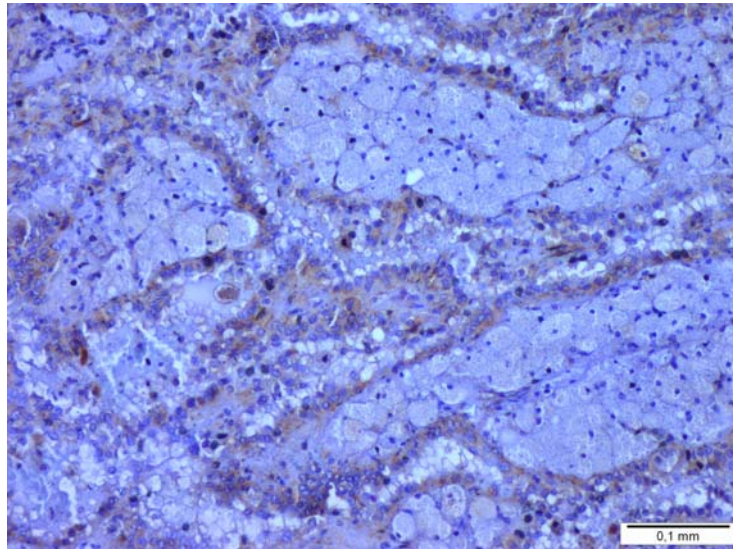


**Figura 12** – Carcinoma renal cromófono com imunoreatividade negativa para a proteína CSF1R.

Das 5 amostras de carcinomas renais papilares analisadas, duas apresentavam imunoreatividade positiva membranar e citoplasmática (Fig. 13), duas apresentavam imunoreatividade negativa (Fig. 14) e uma apresentava apenas imunoreatividade focal.

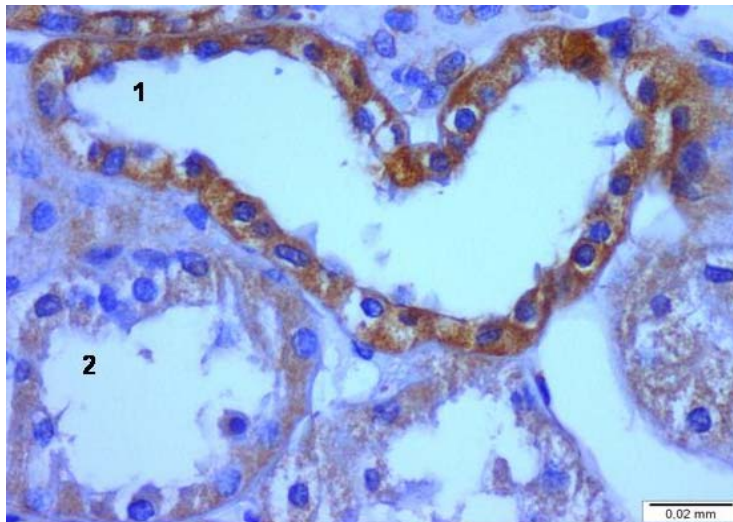


**Figura 13** – Carcinoma renal papilar com imunoreatividade positiva membranar e citoplasmática para a proteína CSF1R.

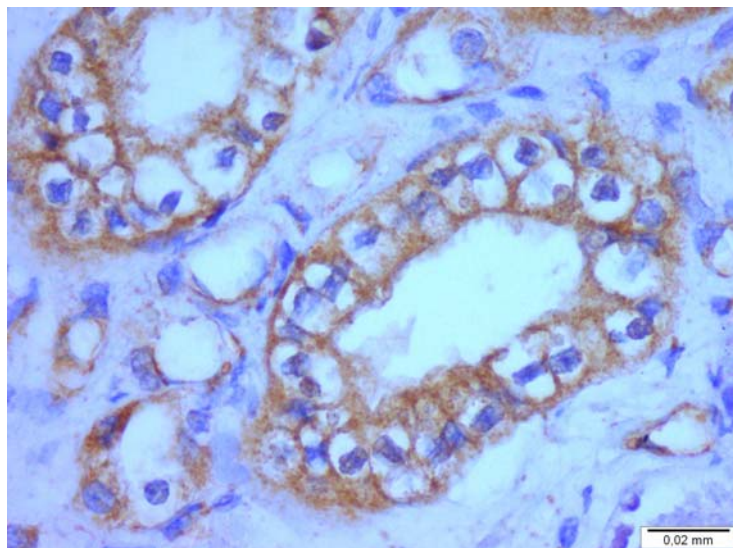


**Figura 14** – Carcinoma renal papilar com imunorreactividade negativa para a proteína CSF1R.

As 10 amostras de tecido renal não neoplásico apresentavam imunorreactividade positiva no tubo contornado distal e ductos colectores e imunorreactividade negativa nos tubos proximais (Fig. 15 e 16).



**Figura 15** – Tecido renal não neoplásico com imunorreactividade positiva para a proteína CSF1R no tubo contornado distal (1) e imunorreactividade negativa no tubo proximal (2).



**Figura 16** – Tecido renal não neoplásico com imunorreatividade positiva para a proteína CSF1R nos ductos colectores.

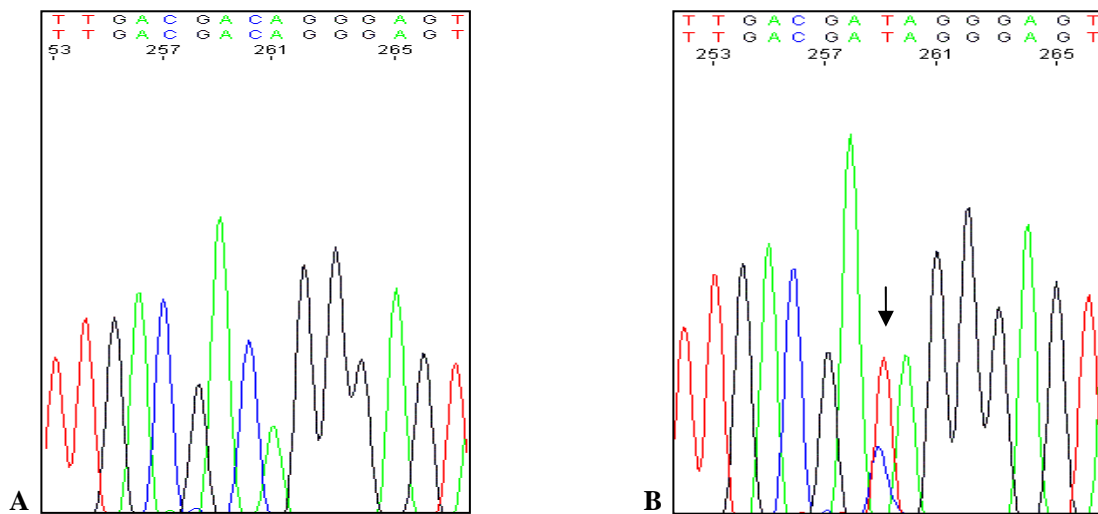
#### 4 – Pesquisa de mutações no gene *CSF1R*

Foram estudados os exões 7 e 22 do gene *CSF1R* em 40 amostras de carcinomas renais das células claras e em 100 doadores de sangue saudáveis. Detectaram-se três alterações neste gene, uma no exão 7 e duas no exão 22 (Tab. 12), em doentes com carcinoma de células claras.

**Tabela 5** – Alterações encontradas no gene *CSF1R*.

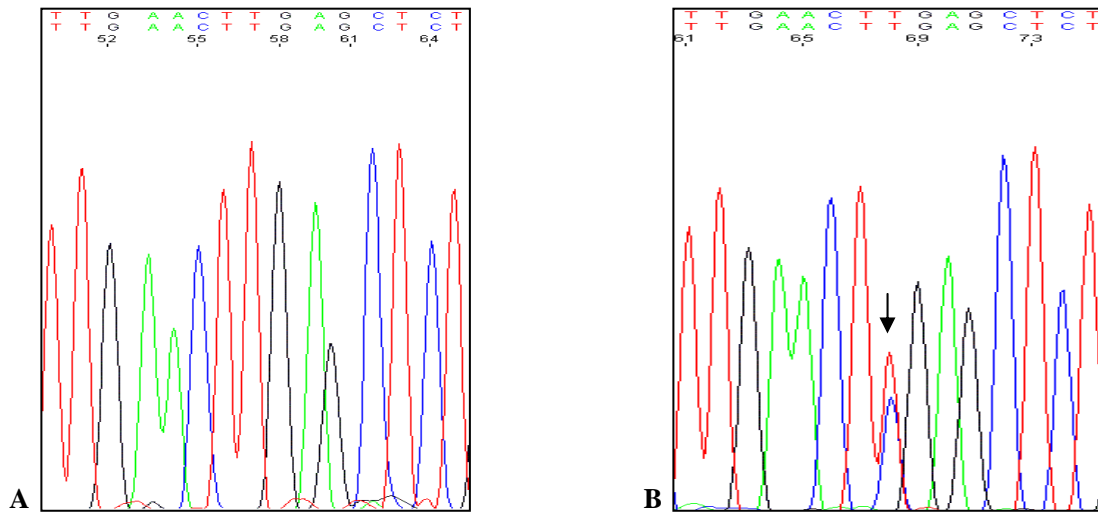
Amostra	Localização	Genótipo	Efeito
RT 142T (Fig. 17)	Exão 22	c.*12C>T	Desconhecido
RT 150T (Fig. 18)	Exão 7	c.908T>C	p.Leu303Ser
RT 154T (Fig. 19)	Exão 22	c.2799T>C	Sem efeito (mutação silenciosa)

Das alterações encontradas, uma amostra (RT 142T) apresentava uma mutação de significado desconhecido na região não-codificante do exão 22 (3' UTR) que consistia na substituição de uma citosina por uma timina 12 nucleótidos *downstream* do codão *stop* (c.\*12C>T) (Fig. 17). A mesma mutação estava presente no tecido renal não neoplásico, o que nos leva a classificá-la como mutação germinativa.



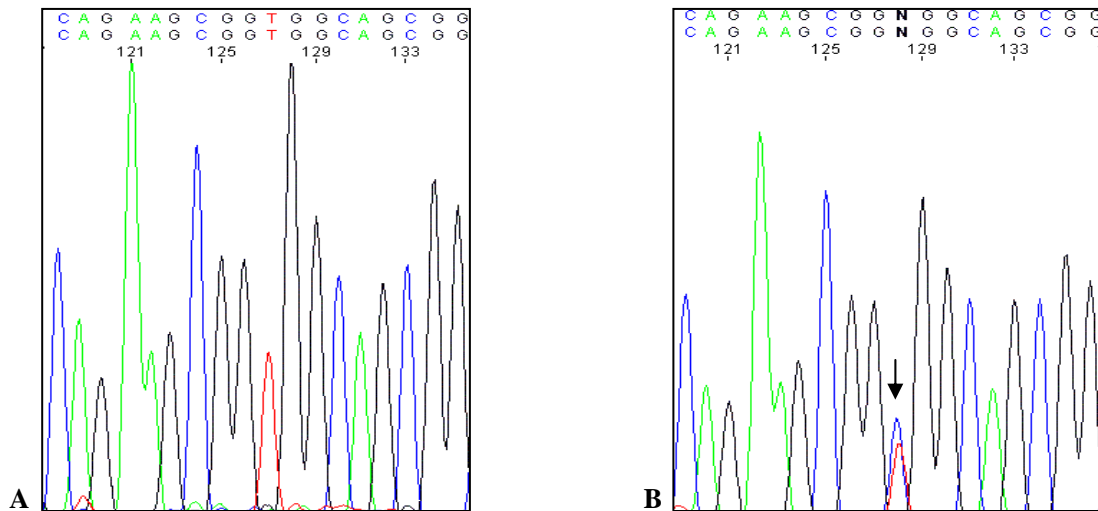
**Figura 17** – Electroforograma da sequenciação do exão 22: A, Normal; B, Amostra RT142 com a mutação c.\*12C>T.

No exão 7 foi encontrada uma mutação *missense* no codão 303 do gene *CSF1R* (c.908T>C) (Fig. 18). A mesma alteração foi descrita no codão 301 do gene *CSF1R* por Ridge *et al* (30). A mutação encontrada foi pesquisada quer no sangue periférico da doente, quer em tecido renal não neoplásico da mesma, estando presente nos dois. Foi realizado um levantamento da história familiar da doente, havendo um caso de leucemia numa irmã.



**Figura 18** – Electroforograma da sequenciação do exão 7: A, Normal; B, Amostra RT150 com a mutação c.908T>C.

Por último, foi encontrada uma mutação silenciosa não descrita (c.2799T>C) no exão 22, considerada polimorfismo por não alterar a sequência da proteína (Fig. 19) e ter sido detectada em dois de 100 dadores de sangue.



**Figura 19** – Electroforograma da sequenciação do exão 22: A, Normal; B, Amostra RT 154 com a mutação c.2799T>C.

As alterações c.\*12C>T e c.908T>C não estão descritas na literatura e não foram encontradas nos 100 dadores de sangue

**DISCUSSÃO**



## **1 – Expressão do gene *CSF1R* em tumores das células renais**

Este trabalho teve como objectivo avaliar o papel do gene *CSF1R* na carcinogénese renal. De acordo com os nossos resultados, este gene parece desempenhar um papel relevante na carcinogénese dos carcinomas renais das células claras. A nível do RNA constatou-se uma clara sobre-expressão deste gene por RT-PCR quantitativo neste subtipo de CCRs, não sendo tão significativa nos restantes subtipos histológicos de tumores do rim.

Os resultados obtidos a nível da expressão proteica por imunohistoquímica confirmam os resultados obtidos por RT-PCR quantitativo. Todos os 40 CCRs do tipo células claras analisados apresentaram elevada imunoreactividade membranar para a proteína *CSF1R*. Os restantes subtipos histológicos apresentaram, na sua grande maioria, imunoreactividade negativa ou focal. Os dois casos de CCRs papilares positivos por análise imunohistoquímica apresentaram uma marcação claramente distinta dos CCRs de células claras: enquanto os CCRs de células claras apresentaram imunoreactividade positiva membranar, os CCRs papilares evidenciavam imunoreactividade positiva membranar e citoplasmática.

A variante eosinofílica dos CCRs cromófobos é particularmente difícil de distinguir dos oncocitomas renais e da variante eosinofílica dos CCRs de células claras. Vários estudos têm sido realizados com o intuito de encontrar marcadores imunohistoquímicos eficazes no diagnóstico diferencial destes tumores. Os nossos resultados permitem-nos indicar a expressão proteica do *CSF1R* como um possível marcador imunohistoquímico no diagnóstico diferencial do CCR de células claras.

Os resultados de imunohistoquímica obtidos nos tecidos não neoplásicos salientam o papel da proteína CSF1R na carcinogénese dos carcinomas renais das células claras. Os tecidos não neoplásicos apresentavam imunoreactividade positiva no tubo contornado distal e ductos colectores, mas imunoreactividade negativa no tubo proximal, onde têm origem os carcinomas renais das células claras. Assim, a imunoreactividade negativa nas células do tubo proximal e a sobre-expressão do *CSF1R* na grande maioria dos carcinomas renais de células claras sugere que este gene é relevante para a carcinogénese deste tipo tumoral. Pelo contrário, a presença de imunoreactividade positiva para a proteína CSF1R nas células dos ductos colectores, onde têm origem os carcinomas cromófobos, pode explicar o facto de encontrarmos um pequeno número de tumores do tipo cromóforo com imunoreactividade focal para a proteína. O significado biológico da imunoreactividade positiva membranar e citoplasmática detectada em dois dos cinco carcinomas papilares é desconhecido.

A proteína CSF1R parece ter um papel importante em diversas neoplasias e o nível de expressão tem sido relacionado com a invasão tumoral e mau prognóstico. No cancro da mama existem diversos estudos realizados em modelos de rato que demonstram a importância do receptor CSF1R assim como do seu ligando na invasão tumoral e metastização (34; 35). Adicionalmente, um estudo em *microarrays* de tecido mamário contendo 301 casos nódulo-negativos e 280 casos nódulo-positivos concluiu que a expressão do *CSF1R* é indicadora de mau prognóstico no cancro da mama metastático. Este estudo demonstrou ainda que o gene *CSF1R* é mais frequentemente expresso em pacientes com envolvimento nodular e sugere o possível envolvimento do CSF1R na invasão local e metastização (47).

Diversos estudos realizados em carcinomas do ovário demonstram que níveis elevados de *CSF1R* estão relacionados com tumores de alto grau e mau prognóstico (37). Apesar do *CSF1R* ser expresso na superfície de tecidos do epitélio de ovários normais e em neoplasias benignas do ovário, apenas se observa imunorreactividade fortemente positiva nas neoplasias invasivas (37). Por outro lado, no cancro da próstata, a sobre-expressão do *CSF1R* está relacionada com alterações no crescimento e desenvolvimento da próstata normal e neoplásica (48).

## **2 – Relação entre o número de cópias e a expressão do gene *CSF1R***

Existem diversos mecanismos genéticos que podem conduzir à activação de um proto-oncogene, nomeadamente: amplificação, rearranjo genómico, desregulação da transcrição, mutações pontuais ou outras alterações na região codificante do gene ou região promotora (17; 49; 50).

Na literatura podemos encontrar vários exemplos de activação de um proto-oncogene por um mecanismo de amplificação génica. No cancro da mama, a amplificação do gene *v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (ERBB2)* está associada a maior probabilidade de recorrência e mau prognóstico (51). Igualmente, os genes que codificam os receptores cinase de tirosina KIT, PDGFR $\alpha$  e VEGFR2 estão frequentemente amplificados nos glioblastomas (52).

O nosso estudo permitiu-nos concluir que a sobre-expressão do *CSF1R* nos carcinomas renais das células claras não resulta de um mecanismo de amplificação génica, em virtude de os resultados de FISH apenas revelarem alterações numéricas no

cromossoma 5 ou ganhos relativos do número de cópias do gene *CSF1R* em relação ao controlo. Embora estas alterações numéricas do gene *CSF1R* tenham sido preferencialmente detectadas nos carcinomas de células claras e possam contribuir para o aumento da sua expressão, terá de haver outros mecanismos que expliquem a sobre-expressão a nível do RNA e a nível proteico deste gene na grande maioria dos casos deste tipo de CCR.

### **3 – Mutações no gene *CSF1R***

Pelo facto de estarem descritas mutações pontuais nos codões 301 e 969 na literatura em algumas neoplasias, analisamos os exões 7 e 22 do gene *CSF1R*. Estes codões estão potencialmente envolvidos na promoção da alteração da actividade da proteína CSF1R (36). Segundo um estudo em carcinomas hepatocelulares, as mutações no codão 301 podem estar associadas com a transformação neoplásica via activação constitutiva do receptor cinase de tirosina, enquanto que deleções ou mutações no codão 969 podem conduzir à regulação positiva da sua actividade (41).

Da nossa pesquisa resultou a identificação de um polimorfismo (c.2799T>C) e de duas mutações germinativas não descritas até à data (c.\*12C>T e c.908T>C). A mutação c.\*12C>T detectada na região não-codificante do exão 22 tem significado patológico desconhecido por não ter sido detectada em indivíduos saudáveis e não levar à alteração da sequência nucleotídica da proteína. Por outro lado, a mutação c.908T>C localizada no codão 303 do exão 7 consiste numa mutação *missense* que resulta na substituição de uma serina (aminoácido polar) por uma leucina (aminoácido apolar). Uma vez que a referida

alteração não foi detectada nos 100 indivíduos normais e resulta na troca de aminoácidos com propriedades químicas distintas, podemos classificá-la como potencialmente patogénica. O mesmo tipo de alteração tinha já sido descrita no codão 301 do exão 7 e foi classificada como potencialmente patogénica em doenças hematológicas malignas (36).

De acordo com os dados recolhidos em consulta de aconselhamento genético, a doente na qual se detectou a alteração potencialmente patogénica tem uma irmã possivelmente com leucemia. Uma vez que estas alterações no gene *CSF1R* se encontram descritas em indivíduos com doenças hematológicas malignas, não podemos excluir uma eventual associação desta mutação com a doença da familiar. No entanto, não são conhecidos outros casos de doenças hematológicas malignas na família, pelo que o seu valor preditivo é desconhecido.

A identificação de duas novas mutações também não explica a sobre-expressão do *CSF1R* na generalidade dos carcinomas renais das células claras. Análises futuras aos restantes exões serão importantes para esclarecer o papel de mutações pontuais na sobre-expressão do *CSF1R* neste subtipo histológico. Por outro lado, a expressão de um gene eucariótico é consequência da ligação e actividade de factores de transcrição (activadores e/ou repressores), que interagem directamente com as sequências reguladoras desse gene, como as regiões do promotor ou sequências estimuladoras e silenciadoras (53). Qualquer alteração nestas sequências poderia explicar a sobre-expressão do gene, sendo fundamental o seu estudo futuro para melhor compreensão dos mecanismos que originam a sobre-expressão do *CSF1R*. Alternativamente, alterações do gene *colony-stimulating factor 1 (CSF1)* podem traduzir-se na síntese de grandes quantidades de ligando que por sua vez podem indirectamente provocar a sobre-expressão do gene *CSF1R*, codificante da

proteína receptora. Serão necessários mais estudos para melhor compreender a influência das alterações deste gene na sobre-expressão do seu receptor.

**CONCLUSÃO**



Muitos progressos têm sido feitos no sentido de estabelecer os mecanismos de sinalização, biologia e consequências patológicas da desregulação dos receptores cinase de tirosina. Apesar de ainda estarmos muito longe de compreender completamente a função/disfunção destes receptores nos diversos tecidos e múltiplos processos biológicos, vários membros desta família proteica têm sido alvo de estudos, cujas conclusões têm tido grande impacto no desenvolvimento de terapias dirigidas para certas neoplasias.

Os resultados por RT-PCR quantitativo e por imunohistoquímica demonstram uma sobre-expressão do *CSF1R* nos carcinomas renais de células claras. A imunoreactividade observada nos tumores do subtipo células claras é distinta da observada nos restantes tumores, o que nos permite indicar a expressão proteica do *CSF1R* como um possível marcador imunohistoquímico no diagnóstico diferencial destes tumores. A análise do número de cópias do gene *CSF1R* por FISH revelou alterações numéricas no cromossoma 5 e ganhos relativos do número de cópias do gene *CSF1R* em relação ao controlo, que podem contribuir para, mas não explicam completamente, a sobre-expressão deste gene observada nos carcinomas renais das células claras. Por último, identificou-se um polimorfismo e duas mutações germinativas não descritas até à data no gene *CSF1R*. Os resultados aqui apresentados permitem concluir que o gene *CSF1R* desempenha um papel relevante na carcinogénese dos carcinomas renais de células claras, podendo representar um alvo terapêutico interessante nesta neoplasia.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- (1) Bodmer D, van den HW, van Groningen JJ, Eleveld MJ, Martens GJ, Weterman MA et al. Understanding familial and non-familial renal cell cancer. *Hum Mol Genet* 2002; 11(20):2489-2498.
- (2) GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC Cancerbase No. 5, version 2.0 ed. Lyon: IARCPress, 2004.
- (3) Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: IARCPress, 2004.
- (4) Nelson EC, Evans CP, Lara PN, Jr. Renal cell carcinoma: current status and emerging therapies. *Cancer Treat Rev* 2007; 33 (3): 299-313.
- (5) Kopper L, Timar J. Genomics of renal cell cancer - does it provide breakthrough? *Pathol Oncol Res* 2006; 12 (1) :5-11.
- (6) Pavlovich CP, Schmidt LS. Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer* 2004; 4 (5) :381-393.
- (7) Curti BD. Renal cell carcinoma. *JAMA* 2004; 292(1):97-100.
- (8) Meloni-Ehrig AM. Renal cancer: cytogenetic and molecular genetic aspects. *Am J Med Genet* 2002; 115(3):164-172.
- (9) Linehan WM, Walther MM, Zbar B. The genetic basis of cancer of the kidney. *J Urol* 2003; 170 (6 Pt 1): 2163-2172.

- (10) Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, Bugert P, Cooper CS, Delahunt B et al. The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol* 1997; 183 (2): 131-133.
- (11) Mueller-Lisse UG, Mueller-Lisse UL, Meindl T, Coppenrath E, Degenhart C, Graser A et al. Staging of renal cell carcinoma. *Eur Radiol* 2007; 17 (9): 2268-2277.
- (12) Robson CJ. Radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol* 1963; 89: 37-42.
- (13) Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol* 1969; 101 (3): 297-301.
- (14) Ficarra V, Martignoni G, Maffei N, Brunelli M, Novara G, Zanolla L et al. Original and reviewed nuclear grading according to the Fuhrman system: a multivariate analysis of 388 patients with conventional renal cell carcinoma. *Cancer* 2005; 103 (1): 68-75.
- (15) Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; 10 (8): 789-799.
- (16) Ponder BA. Cancer genetics. *Nature* 2001; 411 (6835): 336-341.
- (17) Balmain A, Gray J, Ponder B. The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet* 2003; 33 Suppl: 238-44.
- (18) Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68 (4):820-823.

- (19) Frances M.Richards. Knudson's two-hit hypothesis for tumourigenesis involving a tumour suppressor gene (TSG). <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>. 2001.
- (20) Mancini A, Koch A, Wilms R, Tamura T. c-Cbl associates directly with the C-terminal tail of the receptor for the macrophage colony-stimulating factor, c-Fms, and down-modulates this receptor but not the viral oncogene v-Fms. *J Biol Chem* 2002; 277 (17): 14635-14640.
- (21) Linehan WM, Pinto PA, Srinivasan R, Merino M, Choyke P, Choyke L et al. Identification of the genes for kidney cancer: opportunity for disease-specific targeted therapeutics. *Clin Cancer Res* 2007; 13 (2 Pt 2): 671s-679s.
- (22) Sudarshan S, Linehan WM. Genetic basis of cancer of the kidney. *Semin Oncol* 2006; 33 (5): 544-551.
- (23) Vira MA, Novakovic KR, Pinto PA, Linehan WM. Genetic basis of kidney cancer: a model for developing molecular-targeted therapies. *BJU Int* 2007; 99 (5 Pt B): 1223-1229.
- (24) van Spronsen DJ, de Weijer KJ, Mulders PF, De Mulder PH. Novel treatment strategies in clear-cell metastatic renal cell carcinoma. *Anticancer Drugs* 2005; 16 (7): 709-717.

- (25) Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G, Figlin RA et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24 (1): 16-24.
- (26) Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356 (2): 125-134.
- (27) Weiss RH, Lin PY. Kidney cancer: identification of novel targets for therapy. *Kidney Int* 2006; 69 (2): 224-232.
- (28) Grimaldi AM, Guida T, D'Attino R, Perrotta E, Otero M, Masala A et al. Sunitinib: bridging present and future cancer treatment. *Ann Oncol* 2007; 18 Suppl 6: vi31-4.
- (29) Atkins M, Jones CA, Kirkpatrick P. Sunitinib maleate. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(4):279-280.
- (30) Motzer RJ, Rini BI, Bukowski RM, Curti BD, George DJ, Hudes GR et al. Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JAMA* 2006; 295(21):2516-2524.
- (31) Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356 (2): 115-124.

- (32) Yang ZQ, Yoshida MA, Fukuda Y, Kurihara N, Nakamura Y, Inazawa J. Molecular cytogenetic analysis of 17 renal cancer cell lines: increased copy number at 5q31-33 in cell lines from nonpapillary carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91 (2): 156-163.
- (33) Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 2005; 353 (2): 172-187.
- (34) Kirma N, Luthra R, Jones J, Liu YG, Nair HB, Mandava U et al. Overexpression of the colony-stimulating factor (CSF-1) and/or its receptor c-fms in mammary glands of transgenic mice results in hyperplasia and tumor formation. *Cancer Res* 2004; 64 (12): 4162-4170.
- (35) Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 2001; 193 (6): 727-740.
- (36) Ridge SA, Worwood M, Oscier D, Jacobs A, Padua RA. FMS mutations in myelodysplastic, leukemic, and normal subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87 (4): 1377-1380.
- (37) Toy EP, Chambers JT, Kacinski BM, Flick MB, Chambers SK. The activated macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) receptor as a predictor of poor outcome in advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2001; 80 (2): 194-200.

- (38) Sapi E. The role of CSF-1 in normal physiology of mammary gland and breast cancer: an update. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; 229 (1): 1-11.
- (39) Strefford JC, Stasevich I, Lane TM, Lu YJ, Oliver T, Young BD. A combination of molecular cytogenetic analyses reveals complex genetic alterations in conventional renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 159 (1): 1-9.
- (40) Schuetz AN, Yin-Goen Q, Amin MB, Moreno CS, Cohen C, Hornsby CD et al. Molecular classification of renal tumors by gene expression profiling. *J Mol Diagn* 2005; 7 (2): 206-218.
- (41) Yang DH, Huang W, Cui J, Shu JC, Tang SH, Zhang WJ et al. The relationship between point mutation and abnormal expression of c-fms oncogene in hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3 (1): 86-89.
- (42) [www.proteinlounge.com](http://www.proteinlounge.com). 20-7-2007.
- (43) Pearson H, Stirling D. DNA extraction from tissue. *Methods Mol Biol* 2003; 226: 33-4.
- (44) Casas S, Nagy B, Elonen E, Aventin A, Larramendy ML, Sierra J et al. Aberrant expression of HOXA9, DEK, CBL and CSF1R in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003; 44 (11): 1935-1941.

- (45) Wolff DJ, Bagg A, Cooley LD, Dewald GW, Hirsch BA, Jacky PB et al. Guidance for fluorescence in situ hybridization testing in hematologic disorders. *J Mol Diagn* 2007; 9 (2): 134-143.
- (46) Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Care RS, Gari M, Wilson GA, Peake IR et al. Mutational analysis of class III receptor tyrosine kinases (C-KIT, C-FMS, FLT3) in idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol* 2003; 120 (3): 464-470.
- (47) Kluger HM, Dolled-Filhart M, Rodov S, Kacinski BM, Camp RL, Rimm DL. Macrophage colony-stimulating factor-1 receptor expression is associated with poor outcome in breast cancer by large cohort tissue microarray analysis. *Clin Cancer Res* 2004; 10 (1 Pt 1): 173-177.
- (48) Ide H, Seligson DB, Memarzadeh S, Xin L, Horvath S, Dubey P et al. Expression of colony-stimulating factor 1 receptor during prostate development and prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99 (22): 14404-14409.
- (49) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100 (1): 57-70.
- (50) Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002; 347 (20): 1593-1603.

- (51) Sinczak-Kuta A, Tomaszewska R, Rudnicka-Sosin L, Okon K, Stachura J. Evaluation of HER2/neu gene amplification in patients with invasive breast carcinoma. Comparison of in situ hybridization methods. *Pol J Pathol* 2007; 58 (1): 41-50.
- (52) Joensuu H, Pupa M, Sihto H, Tynninen O, Nupponen NN. Amplification of genes encoding KIT, PDGFRalpha and VEGFR2 receptor tyrosine kinases is frequent in glioblastoma multiforme. *J Pathol* 2005; 207 (2): 224-231.
- (53) Delgado MD, Leon J. Gene expression regulation and cancer. *Clin Transl Oncol* 2006; 8 (11): 780-787.