

Joana Virgínia Pinto Valejo de Magalhães Vieira

Diagnóstico diferencial de tumores
renais por análise genómica de
biópsias aspirativas

Orientador: Prof. Doutor Manuel António Rodrigues Teixeira

Porto

2008

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

Agradecimientos

Agradecimentos

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

Ao Prof. Doutor Rui Henrique, cuja colaboração e orientação foram fundamentais para a realização desta dissertação.

À Prof. Doutora Carmen Jerónimo, à Dra. Vera Costa, à Dra. Maria José Soares e à Dra. Bárbara Mesquita, pelo apoio e disponibilidade.

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

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

Ao Dr. Jorge Oliveira pela colaboração e disponibilidade.

Aos colegas do Serviço de Genética, que de uma forma ou de outra contribuíram para a minha formação profissional, assim como para a realização deste trabalho, muito obrigada.

Um agradecimento especial à Dra. Cecília Correia e à Dra. Paula Gomes pela disponibilidade com que me acolheram.

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

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

À Lurdes, ao Ricardo e à Susana, pela disponibilidade, estímulo, compreensão e por todos os conselhos...

Aos meus pais e aos pais do Sérgio, pelo constante incentivo, apoio, paciência, amizade e compreensão demonstrados em todos os momentos... **Muito obrigada!**

Ao Sérgio, por todo o incentivo, apoio, compreensão e muita...muita... paciência...Um obrigada, simplesmente por **TUDO!!!**

Índice

Índice

Abreviaturas e símbolos	13
Resumo	19
Summary	25
Introdução	31
1 – Epidemiologia do cancro do rim	33
2 – Factores de risco	34
2.1 – Cancro do rim hereditário	34
2.2 – Cancro do rim esporádico	34
3 – Base genética do cancro	36
4 – Características clínico-patológicas e genéticas	38
4.1 – Cancro do rim hereditário	40
4.2 – Neoplasias de células renais esporádicas	42
4.2.1 – Neoplasias renais benignas	42
4.2.2 – Neoplasias renais malignas	44
5 – Prognóstico	50
6 – Tratamento e alvos moleculares	51
7 – Principais problemas de diagnóstico diferencial	53
7.1 – Carcinoma cromóforo vs oncocitoma	53
7.2 – Carcinoma cromóforo vs carcinoma de células claras	55
7.3 – Carcinoma de células claras vs carcinoma papilar	55
7.4 – Adenoma vs carcinoma papilar	56
7.5 – Diagnóstico diferencial em biópsias renais	56
Objectivos	57

Material e Métodos	61
1 – Material biológico	63
2 – Métodos	63
2.1 – Extração e quantificação de DNA	63
2.2 – Hibridação genómica comparativa (CGH)	63
2.3 – Interpretação dos resultados	67
2.4 – Análise de agregação hierárquica	68
Resultados	69
1 – Diagnóstico genético de tumores do rim	71
2 – Comparação entre o diagnóstico genético e histopatológico	78
3 – Análise de agregação hierárquica	82
4 – Padrão de alterações cromossómicas por tipo de tumor renal	84
5 – Heterogeneidade genética intratumoral	86
Discussão	89
1 – Considerações metodológicas	91
2 – Diagnóstico genético em biópsia aspirativa de tumores do rim	92
3 – Padrão de alterações genéticas em tumores de células renais	96
3.1 – Carcinoma de células claras	96
3.2 – Carcinoma cromóforo	97
3.3 – Carcinoma papilar	98
3.4 – Oncocitoma	99
4 – Heterogeneidade genética intratumoral	101
Conclusão	103
Referências bibliográficas	107

Abreviaturas e símbolos

Abreviaturas e símbolos

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
amp	<i>Amplification</i>
<i>ASPL</i>	<i>Alveolar soft part sarcoma gene</i>
<i>BACs</i>	<i>Bacterial artificial chromosomes</i>
<i>BHD</i>	<i>Birt-Hogg-Dubé gene</i>
BHD	Síndrome Birt-Hogg-Dubé
<i>CCND1</i>	<i>Cyclin D1 gene</i>
CCR	Carcinoma de Células Renais
CCRcc	Carcinoma de Células Renais de células claras
CCRcr	Carcinoma de Células Renais cromóforo
CCRp	Carcinoma de Células Renais papilar
<i>CDC25</i>	<i>Cell division cycle 25 gene</i>
<i>CDC25C</i>	<i>Cell division cycle 25C gene</i>
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i>
cm	Centímetros
<i>CSF1R</i>	<i>Colony stimulating factor 1 receptor gene</i>
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
dim	Diminished
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>DRR1</i>	<i>Downregulated in renal cell carcinoma gene</i>
dUTPs	Desoxiuridina 5'trifosfato
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
enh	<i>Enhanced</i>

EUA	Estados Unidos da América
<i>FGF1</i>	<i>Fibroblast growth factor 1 gene</i>
<i>FH</i>	<i>Fumarate hydratase gene</i>
<i>FHIT</i>	<i>Fragile histidine triad gene</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
<i>HGF</i>	<i>Hepatocyte growth factor gene</i>
HE	Hematoxilina-eosina
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor-1 protein</i>
IARC	Agência Internacional para Investigação em Cancro
IGF	<i>Insulinlike growth factor</i>
IL-2	Interleucina 2
<i>IL9</i>	<i>Interleukin 9 gene</i>
IFN- α	Interferão α
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
ish	<i>In situ hybridization</i>
LOH	<i>Loss of heterozigoty</i>
LSI	<i>Locus specific</i>
Mb	Megabases
<i>MET</i>	<i>MET proto-oncogene</i>
μ g	Micrograma
μ l	Microlitro
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
Nd	Não determinado
ng	Nanogramas
n $^{\circ}$	Número

p	Braço curto do cromossoma
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PDGFR- β	<i>Platelet-derived growth factor receptor β</i>
<i>PRCC</i>	<i>Papillary renal cell carcinoma gene</i>
q	Braço longo do cromossoma
<i>RASSF1A</i>	<i>Ras association domain family member 1 gene</i>
<i>RBI</i>	<i>Retinoblastoma gene 1</i>
Rev	<i>Reverse</i>
SSC	<i>Saline sodium citrate</i>
<i>TFE3</i>	<i>Transcription factor binding to IGHM enhancer 3 gene</i>
<i>TFE-B</i>	<i>Transcription factor EB gene</i>
TGF- α	<i>Transforming growth factor-α</i>
<i>TGFβR-II</i>	<i>Transforming growth factor, beta receptor II gene</i>
TNM	Classificação de tumores malignos (<i>Tumor, Nodes, Metastasis</i>)
UICC	<i>International Union Against Cancer</i>
VEGF	<i>Vascular endotelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endotelial growth factor receptor</i>
<i>VHL</i>	<i>Von Hippel-Lindau gene</i>
VHL	<i>Von Hippel-Lindau protein</i>

Resumo

A classificação histológica das neoplasias epiteliais do rim era tradicionalmente baseada no tipo de célula do nefrónio a partir da qual se originam (carcinomas de células claras, cromofílicos, cromóforos) e no seu padrão de crescimento (papilar, não papilar). No entanto, a sobreposição de características morfológicas origina problemas de diagnóstico diferencial num pequeno, mas significativo, número de tumores renais, mesmo em mãos de patologistas muito experientes usando peças de nefrectomia. Recentemente foi proposta a classificação de Heidelberg, baseada nas características citogenéticas das células neoplásicas.

A detecção de tumores renais cada vez mais pequenos tem dificultado a decisão sobre a indicação e a extensão da cirurgia, pela incerteza sobre a natureza maligna ou benigna destas lesões. Teoricamente, doentes com tumores benignos poderiam ser poupados a nefrectomia total se o diagnóstico pudesse ser estabelecido com segurança antes da decisão terapêutica. A possibilidade de associar uma análise genética que permita um diagnóstico correcto a uma biópsia, resultaria numa melhor avaliação diagnóstica dos tumores do rim e contribuiria para decisões terapêuticas mais fundamentadas.

Este estudo teve como objectivos principais testar a possibilidade de analisar simultaneamente todos os cromossomas por hibridação genómica comparativa (CGH) em biópsias aspirativas *ex vivo* de tumores renais, determinar o valor da análise por CGH deste tipo de amostras para realizar um diagnóstico genético correcto de tumores de células renais, avaliar a representatividade de uma biópsia aspirativa na caracterização genética por CGH dos vários tumores de células renais e avaliar a contribuição da análise genética por CGH para o diagnóstico correcto destes tumores. Foi possível realizar a análise por CGH em 62 (83%) biópsias aspirativas e em 72 (96%) fragmentos de tecido tumoral, num total de 75 casos. Recorrendo unicamente ao

padrão de alterações genéticas na biópsia aspirativa, foi possível estabelecer o diagnóstico genético em 42 dos 62 tumores (68%). Houve discordância entre a classificação genética e histológica em duas neoplasias renais, tendo o diagnóstico genético sido confirmado em ambos os casos após reavaliação pelo anatomopatologista. Considerando apenas os casos em que foi possível a análise por CGH na biópsia aspirativa, e tendo em conta o diagnóstico final, a análise genética diagnosticou 29 dos 31 carcinomas de células claras, 8 dos 13 carcinomas cromófobos, 4 dos 4 carcinomas papilares e 1 dos 7 oncocitomas, totalizando 42 dos 56 (75%), considerando apenas os tumores de células renais. O valor preditivo positivo e a especificidade do padrão de alterações genéticas foram 100% para os vários subtipos de tumores de células renais. O valor preditivo negativo foi de 93.9%, 90.7%, 100% e 90.2% para CCR de células claras, CCR cromófobos, CCR papilares e oncocitomas, respectivamente. Incluindo todas as amostras da série, a análise genética na biópsia aspirativa classificou correctamente 29 dos 42 (69%) carcinomas de células claras, 8 dos 13 (62%) carcinomas cromófobos, 4 dos 5 (80%) carcinomas papilares e 1 dos 8 (12.5%) oncocitomas, sendo o diagnóstico genético inconclusivo nos restantes 20 casos. A análise de CGH nos fragmentos de tecido tumoral permitiu classificar mais 8 casos para além dos 42 casos diagnosticados pela análise genética das biópsias aspirativas. A taxa de classificação dos tumores por CGH nos dois tipos de amostra em conjunto foi de 50 de 72 (69%) tumores renais ou de 50 de 66 (76%) tumores de células renais. Por subtipo histológico de tumores de células renais, a análise genética combinada dos dois tipos de amostra permitiu o diagnóstico genético de 36 dos 42 (86%) carcinomas de células claras, 8 dos 13 (62%) carcinomas cromófobos, 5 dos 5 (100%) carcinomas papilares e 1 dos 8 (12.5%) oncocitomas.

Foi encontrada heterogeneidade genética intratumoral em sete dos 62 casos em que foi possível estabelecer uma comparação (todos eles carcinomas de células claras), havendo evidência de progressão tumoral focal e de progressão clonal divergente. No entanto, o diagnóstico genético destes carcinomas não foi afectado, uma vez que a deleção de 3p foi sempre detectada em ambas as amostras.

Com os resultados obtidos, demonstramos a possibilidade de realizar um diagnóstico genético por subtipo histológico em biópsias aspirativas de tumores renais e concluimos que a associação de uma análise genética à análise morfológica contribui para uma classificação mais fidedigna dos tumores de células renais.

Summary

The histological classification of epithelial kidney neoplasias was traditionally based on the type of nephron cell from which it is originated (clear, chromophilic or chromophobe cell carcinoma) and its growth pattern (papillary, nonpapillary). Still, overlapping morphologic characteristics can make differential diagnosis difficult in a small, but significant, number of renal tumors, even to highly experienced pathologists analyzing nephrectomy specimens. The Heidelberg classification has been recently proposed and is based on the cytogenetic characteristics of neoplastic cells.

The increasing detection of small renal tumors has made more difficult the decision on the time and the extent of surgical procedures, due to uncertainty of the malignant or benign nature of some of these lesions. Patients with benign lesions could theoretically be spared total nephrectomy if the diagnosis was safely established before the treatment was decided. The possibility to associate a genetic analysis that can improve the diagnostic accuracy in biopsy sample would result in an improved evaluation of renal tumors and thus more well-informed therapeutic options.

The purpose of this study was to test the possibility of simultaneously analyze all chromosomes by comparative genomic hybridization (CGH) in *ex vivo* fine needle aspiration biopsies of kidney tumors, to determine the value of CGH analysis of these samples for the genetic diagnosis of renal cell tumors, to address the representativity of a needle aspiration biopsy for the genetic characterization of renal cell tumors, and to evaluate the contribution of CGH analysis for improving the correct diagnosis of these tumor types. Of a total of 75 cases it was possible to perform CGH analysis in 62 (83%) fine needle aspiration biopsies and in 72 (96%) tumor tissue fragments. The pattern of genetic alterations on fine needle aspiration biopsies alone allowed the genetic diagnosis of 42 out of 62 (68%) tumors. There were differences between the genetic and

histological classification in two renal neoplasias, but the genetic diagnosis was confirmed by the pathologist after a review of both cases. Considering just the cases in which CGH analysis of the fine needle aspiration biopsy was possible, and the final diagnosis after review, the genetic pattern correctly diagnosed 29 out of 31 clear cell carcinomas, 8 out of 13 chromophobe carcinomas, 4 out of 4 papillary carcinomas and 1 out of 7 oncocytomas, in a total of 42 out of 56 (75%) renal cell tumors. The positive predictive value and specificity of the pattern of genetic alterations were 100% for the different renal cell tumor subtypes. The negative predictive value was 93.9%, 90.7%, 100% and 90.2% for clear cell RCC, chromophobe RCC, papillary RCC and oncocytomas, respectively. If we consider all the samples in the series, the genetic analysis of the fine needle biopsies correctly classified 29 out of 42 (69%) clear cell carcinomas, 8 out of 13 (62%) chromophobe carcinomas, 4 out of 5 (80%) papillary carcinomas and 1 out of 8 (12.5%) oncocytomas, the genetic diagnosis being inconclusive in the remaining 20 cases. The CGH analysis of tumor tissue fragment was able to classify 8 additional cases. The overall CGH classification rate was therefore 50 out of 72 (69%) kidney tumors or 50 out of 66 (76%) renal cell tumors. The combined genetic analysis of both sample types allowed a genetic diagnosis in 36 out of 42 (86%) clear cell carcinomas, 8 out of 13 (62%) chromophobe carcinomas, 5 out of 5 (100%) papillary carcinomas and 1 out of 8 (12.5%) oncocytomas.

We found intratumor heterogeneity in 7 of the 62 cases in which a comparison was possible (all clear cell carcinomas), with evidence of focal tumor progression and divergent clonal evolution. However, the genetic diagnosis was not affected by this heterogeneity since the 3p deletion was always detected in both fine needle aspiration and tumor tissue fragment of these cases.

We demonstrated with this work that a genetic diagnosis, by histological subtype, is feasible in fine needle aspirations biopsies of renal cell tumors, and conclude that the combination of CGH and morphological analyses allows a more accurate classification of kidney tumors.

Introdução

1 – Epidemiologia do cancro do rim

O cancro do rim representa cerca de 4% de todas as neoplasias malignas diagnosticadas. Os carcinomas representam 85% de todas as neoplasias com origem neste órgão, constituindo um grupo muito heterogéneo. Apesar dos grandes avanços na compreensão da biologia do cancro do rim, de acordo com *American Cancer Society* (ACS), estima-se que no ano de 2008, nos Estados Unidos da América (EUA), serão diagnosticados aproximadamente 54390 novos casos (33130 homens e 21260 mulheres) e que no mesmo ano irão ocorrer 13010 mortes por cancro do rim (8100 homens e 4910 mulheres) (Jemal *et al.*, 2008).

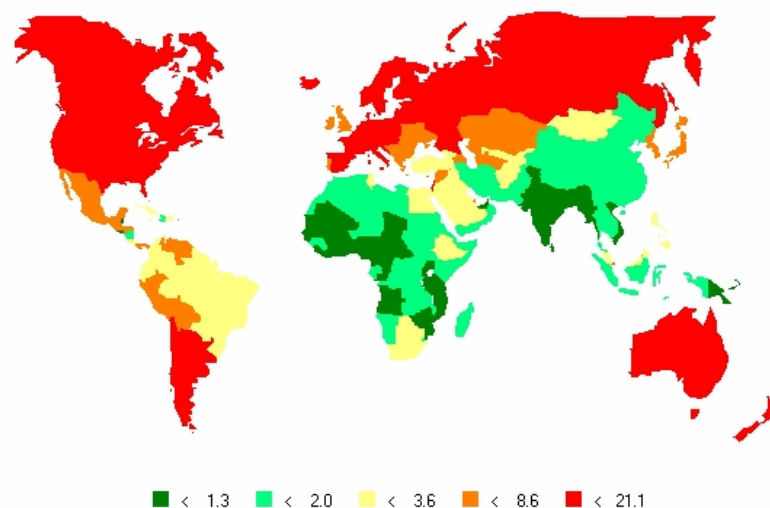


Figura 1 – Taxa de incidência ajustada à idade de cancro do rim no sexo masculino (Globocan 2002).

Em Portugal, segundo os dados da Agência Internacional para Investigação do Cancro (IARC), no ano de 2002 a taxa de incidência de cancro do rim no sexo masculino foi de 6,5 novos casos por 100000 habitantes e no sexo feminino foi de 2,7 novos casos por 100000 habitantes (<http://www.dep.iarc.fr>).

2 – Factores de risco

2.1 – Cancro do rim hereditário

O cancro do rim hereditário representa cerca de 4% dos tumores renais (Jemal *et al.*, 2008). Para quase todos os tipos, o oncogene ou o gene supressor tumoral envolvido é conhecido, possibilitando a realização de um diagnóstico fidedigno, assim como a identificação dos portadores da mutação germinativa mas que ainda não desenvolveram doença. Este grupo de doentes tende a desenvolver tumores múltiplos ipsilaterais e bilaterais. O risco para desenvolvimento de cancro do rim está também aumentado noutras síndromes genéticas. Exemplos de síndromes de predisposição hereditária para cancro do rim estão descritos na secção 4.1 (Moyad *et al.*, 2001; Hung *et al.*, 2007).

2.2 – Cancro do rim esporádico

A maioria dos casos de cancro do rim apresenta-se sob a forma de cancro esporádico e os factores de risco para desenvolvimento desta neoplasia maligna ainda não estão bem estabelecidos. No entanto, são vários os factores que se encontram associados:

- Género

O cancro do rim é cerca de duas vezes mais frequente nos homens do que nas mulheres (Jemal *et al.*, 2008).

- Idade

Os tumores renais afectam pessoas de todas as idades, mas alguns tipos são mais frequentes no adulto e outros em indivíduos mais jovens. No entanto, o risco global para desenvolvimento de neoplasias de células renais é mais elevado no adulto (Moyad *et al.*, 2001).

- Raça e etnia

A raça negra apresenta uma incidência maior de cancro do rim quando comparada com as outras raças (Moyad *et al.*, 2001).

- Factores socioeconómicos

A incidência de cancro do rim é mais alta no meio urbano do que no meio rural, principalmente no sexo masculino. Isto provavelmente reflecte a história de consumo de tabaco, assim como a exposição a agentes carcinogéneos ambientais. Não foram encontradas associações estatisticamente significativas com variáveis sociais, como a educação (Lipworth *et al.*, 2006).

- Exposição ao tabaco

Este é o factor ambiental mais estabelecido e que apresenta uma grande associação com o cancro do rim. Estudos indicam que cerca de 20% a 30% dos cancros do rim no sexo masculino e 10% a 20% no sexo feminino estão relacionados com esta variável (McLaughlin *et al.*, 1995; McLaughlin *et al.*, 2000). Outros estudos indicam que há uma correlação positiva entre a diminuição do número de casos de cancro do rim e tempo de abstinência de tabaco, mostrando mais uma vez a associação entre o tabaco e esta neoplasia maligna (Parker *et al.*, 2003).

- Obesidade

É grande a associação entre a obesidade e o desenvolvimento de cancro do rim (quase todos os estudos de coorte e de caso-controlo demonstram esta associação). Os indivíduos que apresentam maior massa corporal tendem a apresentar níveis mais elevados de estrogéneos e insulina, uma maior concentração de factores de crescimento no tecido adiposo, hipertensão, níveis de colesterol elevados, etc, sendo estes os possíveis factores que sinergisticamente contribuem para o desenvolvimento desta doença (Moyad *et al.*, 2001; Lipworth *et al.*, 2006).

- Hipertensão

É difícil perceber se é a hipertensão e os medicamentos usados para o tratamento que originam a neoplasia renal, ou se é a neoplasia que aumenta a pressão sanguínea antes do diagnóstico. No entanto, quase todos os estudos mostram que a hipertensão está associada com o cancro do rim, mesmo depois de serem excluídos cinco a dez anos antes do diagnóstico (nos quais a doença não diagnosticada pode originar um aumento da pressão sanguínea) (McLaughlin *et al.*, 2000; Lipworth *et al.*, 2006).

- Uso de analgésicos

Existe uma associação histórica entre o uso (abuso) de analgésicos contendo fenacetina e o desenvolvimento de cancro do rim. Contudo, este medicamento já foi retirado do mercado há mais de 25 anos (Lipworth *et al.*, 2006).

- Doença renal

As pessoas que têm doença renal com necessidade de recorrer a diálise apresentam um maior risco para desenvolvimento de cancro do rim (Lipworth *et al.*, 2006).

3 – Base genética do cancro

O cancro é uma doença complexa e factores ambientais desempenham um importante papel no seu desenvolvimento. Segundo a teoria da mutação somática do cancro, alterações genéticas adquiridas, não letais, são a causa directa da transformação neoplásica. A maioria das neoplasias malignas adquire múltiplas alterações cromossómicas à medida que ocorre a progressão da doença. Na maioria dos casos ocorre uma combinação de alterações citogenéticas numéricas e estruturais.

Frequentemente, após ter ocorrido uma translocação balanceada primária, que caracteriza o tumor em causa, surgem alterações numéricas adicionais. Um exemplo é o Sarcoma de Ewing, caracterizado pela presença, em 85% dos casos, da translocação $t(11;22)(q24;q12)$ e que apresenta frequentemente alterações genéticas adicionais como trissomia 8 e trissomia 12 (Mitelman *et al.*, 1992). No entanto, outras neoplasias apresentam alterações numéricas como única alteração no cariótipo (Teixeira e Heim, 2005).

A carcinogénese é um processo de várias etapas que envolve alterações genéticas que afectam vias celulares cruciais para o crescimento e desenvolvimento celular (Osborne *et al.*, 2004). Alterações no equilíbrio entre o crescimento celular e a apoptose podem resultar numa proliferação celular desordenada, originando um processo neoplásico (Kinzler e Vogelstein, 2002). Embora se desconheça a natureza e sequência exactas das múltiplas alterações genéticas e epigenéticas que levam ao desenvolvimento de um carcinoma, foram identificadas várias anomalias afectando a estrutura e/ou expressão de um número considerável de genes. As vias celulares envolvidas na carcinogénese envolvem diferentes tipos de genes, nomeadamente, os genes supressores tumorais e os oncogenes.

A teoria de Knudson explica o conceito de gene supressor tumoral. Knudson documentou a necessidade de ocorrerem dois eventos mutagénicos (*two-hit hypothesis*) no gene supressor tumoral *RBI* para que ocorra o desenvolvimento do retinoblastoma (Fearon, 2002; Kumar *et al.*, 2003). As mutações em genes supressores tumorais actuam de um modo recessivo em relação ao gene normal, pelo que são necessárias duas mutações independentes para inactivar ambos os alelos de um gene. A maioria destes genes previne o processo de transformação neoplásica através do controlo do ciclo celular, diferenciação, adesão célula a célula e apoptose. Recentemente, têm surgido

novos conceitos relativos aos genes supressores tumorais que os subdividem em *gatekeepers* e *caretakers*. Os *gatekeepers* representam os genes supressores tumorais clássicos anteriormente descritos, enquanto que os *caretakers* são responsáveis pela manutenção da integridade do genoma, pois actuam de forma indirecta, reparando erros que possam ocorrer durante o processo de síntese de DNA e/ou divisão celular.

Oncogenes são formas alteradas de genes celulares normais, denominados proto-oncogenes. Os produtos dos proto-oncogenes são importantes reguladores da progressão do ciclo celular, proliferação e diferenciação (Park, 2002). Os proto-oncogenes podem ser activados por translocações cromossómicas resultando na formação de oncogenes de fusão, por mutações pontuais que originam uma activação constitutiva do gene, e também por amplificação que aumenta os níveis de expressão de um gene. As alterações nos proto-oncogenes resultam num ganho de função que actua de um modo dominante em relação ao gene normal (Kinzler e Vogelstein, 2002; Osborne *et al.*, 2004).

4 – Características clínico-patológicas e genéticas

A classificação histológica das neoplasias epiteliais do rim era tradicionalmente baseada no tipo de célula do nefrónio a partir da qual se originam e no seu padrão de crescimento. No entanto, as classificações baseadas apenas no fenótipo citológico (carcinomas de células claras, cromofílicos, cromófobos) e no padrão de crescimento (papilar, não papilar) estão sujeitas a discordâncias entre patologistas, especialmente em neoplasias caracterizadas por heterogeneidade morfológica intra e intertumoral (Bodmer *et al.*, 2002).

A utilização cada vez mais frequente da imagiologia na avaliação médica de rotina tem levado à detecção de tumores renais cada vez mais pequenos, muitas vezes

assintomáticos e descobertos acidentalmente durante o estudo de outras patologias. A detecção destas pequenas lesões coloca muitos problemas de diagnóstico e de tratamento, por não ser consensual a sua natureza patológica e evolução clínica. Tumores renais com menos de 3 cm de diâmetro têm historicamente sido considerados adenomas, por raramente originarem metástases. No entanto, este conceito tem sido contestado e muitos autores defendem que estas lesões devem ser consideradas carcinomas. Deste modo, a decisão sobre a indicação e a extensão da cirurgia é dificultada pela incerteza sobre a natureza maligna ou benigna destas lesões (Amendola *et al.*, 1988; Licht *et al.*, 1993; Wolf Jr *et al.*, 1998).

Uma melhor compreensão da genética que está por trás da patogénese das neoplasias renais levou a uma melhor classificação dos diferentes tipos de tumores renais. No ano de 1996, em Heidelberg, o resultado de um Workshop intitulado “*Impact of Molecular Genetics on the Classification of Renal Cell Tumours*” levou a uma reclassificação destas neoplasias baseada no padrão de alterações genéticas presentes nas células neoplásicas (Figura 2).

Em 2004 surge uma nova classificação que sumaria os achados e contributos das classificações anteriores, principalmente da Classificação de Mainz (1986) e de Heidelberg (1997), a “*2004 WHO Classification of the Renal Tumors in the Adults*”. Esta descrição combina os achados patológicos com entidades genéticas bem individualizadas.

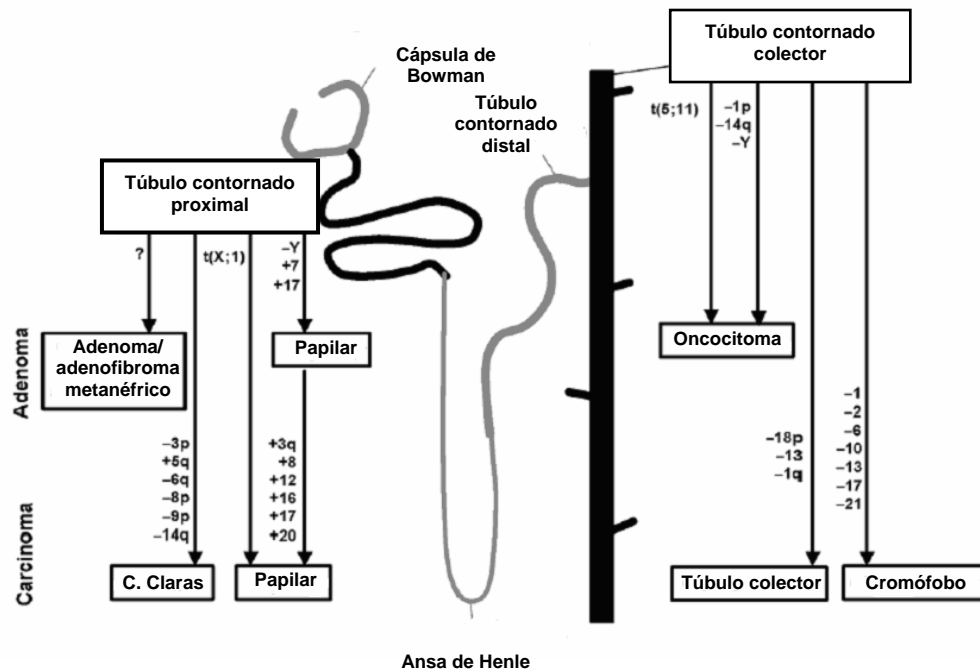


Figura 2 – Classificação de Heidelberg (adaptado de Bodmer *et al.*, 2002).

4.1 – Cancro do rim hereditário

A predisposição hereditária para o desenvolvimento de neoplasia renal representa cerca de 4% destes cancros, sendo o rim um órgão frequentemente envolvido em síndromes genéticas.

- Síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL)

A Síndrome de *Von Hippel-Lindau* é transmitida de forma autossómica dominante e é caracterizada pelo desenvolvimento de hemangioblastomas capilares no sistema nervoso central e na retina, carcinoma renal do tipo células claras ou quistos renais, feocromocitoma, quistos pancreáticos, entre outros. As lesões originadas por esta síndrome são frequentemente bilaterais e multifocais. Esta síndrome é causada por mutações germinativas no gene supressor tumoral *VHL*, localizado no braço curto do cromossoma 3 (3p25~26). Este gene encontra-se expresso numa grande variedade de tecidos, particularmente nas células epiteliais do tracto gastrointestinal, respiratório e uro-genital, assim como em órgãos endócrinos e exócrinos. Em condições normais a

proteína VHL liga-se ao *hypoxia inducible factor 1* (HIF-1) promovendo a sua degradação. Em condições de hipoxia ou perante a perda de função de VHL ocorre um aumento dos níveis celulares de HIF-1 e um subsequente aumento da expressão de outras proteínas proangiogénicas, nomeadamente o *vascular endothelial growth factor* (VEGF), o *platelet-derived growth factor* (PDGF), o *transforming growth factor- α* (TGF- α), o *epidermal growth factor receptor* (EGFR), o *insuline-like growth factor* (IGF) e transportadores de glucose. A VHL controla ainda outras funções celulares como a regulação do ciclo celular e a diferenciação epitelial (Merino *et al.*, 2004; Klatte *et al.*, 2007).

- Carcinoma papilar hereditário do rim

O carcinoma papilar hereditário do rim é transmitido de forma autossómica dominante sendo caracterizado pela presença de tumores múltiplos e bilaterais. Estima-se que aproximadamente 50% dos membros da família portadores desenvolvem doença por volta dos 55 anos de idade. Esta síndrome tem origem na activação do gene *MET*, localizado no braço longo do cromossoma 7 (7q31). Este gene codifica um receptor de cinase de tirosina e a sua forma mutada origina uma activação do receptor independente do ligando. Na maioria dos casos as células neoplásicas apresentam uma cópia adicional do cromossoma 7 mutado (Merino *et al.*, 2004).

- Leiomiomatose hereditária e carcinoma de células renais

A leiomiomatose hereditária e carcinoma de células renais é uma síndrome autossómica dominante originada por mutações germinativas no gene *FH*. É caracterizada pela predisposição para leiomiomas, mas está relacionada também com uma pequena percentagem de casos familiares de carcinoma de células renais. A idade média de diagnóstico é bastante inferior à dos casos de carcinoma esporádico. A sua manifestação é normalmente unilateral e única, mas a maioria dos doentes morre de

doença metastática nos cinco anos subsequentes. O gene *FH* encontra-se localizado no braço longo do cromossoma 1 (1q42~43) (Merino *et al.*, 2004).

- Síndrome Birt-Hogg-Dubé (BHD)

A síndrome BDH aumenta a susceptibilidade para desenvolvimento de tumores renais epiteliais. É caracterizada por originar tumores da pele benignos, mas tumores renais múltiplos são frequentes. Esta é uma síndrome autossômica dominante rara que apresenta uma penetrância incompleta. O gene *BDH* localiza-se no braço curto do cromossoma 17 (17p11.2) e codifica uma proteína de função desconhecida (Merino *et al.*, 2004).

- Translocações constitucionais do cromossoma 3

Esta síndrome é caracterizada pela presença de diferentes translocações envolvendo o cromossoma 3, com diferentes pontos de quebra, que aumentam o risco para desenvolvimento do carcinoma de células renais. Histologicamente, apresentam as mesmas características do carcinoma de células claras. É transmitida de forma autossômica dominante (Merino *et al.*, 2004).

4.2 – Neoplasias de células renais esporádicas

4.2.1 – Neoplasias renais benignas

As neoplasias renais benignas incluem o adenoma metanéfrico, o adenofibroma metanéfrico, o adenoma papilar e o oncocitoma.

- Adenoma papilar renal

É constituído por células basofílicas com um padrão de crescimento sólido-tubulo-papilar. As alterações genéticas frequentemente encontradas são a trissomia dos cromossomas 7 e 17 (Figura 3), assim como a perda do cromossoma Y nos indivíduos do sexo masculino. Os tumores papilares renais com 2 a 5 mm de diâmetro e grau

nuclear 1 apresentam as características genéticas anteriormente descritas (Kovacs *et al.*, 1991).

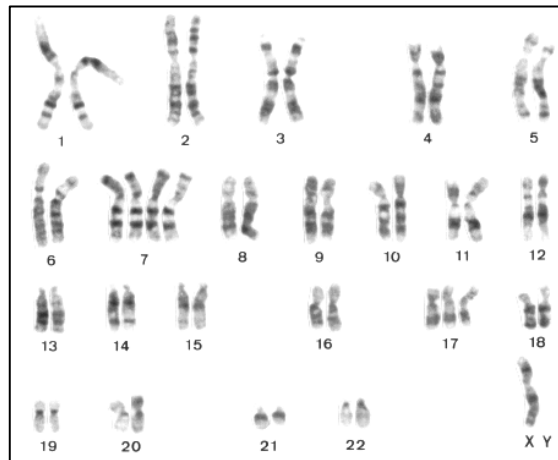


Figura 3 – Exemplo de um adenoma de células renais do tipo papilar com tetrassomia 7, trissomia 17 e perda do cromossoma Y (Kovacs *et al.*, 1989).

- Oncocitoma

É constituído por células com citoplasma eosinofílico (devido às numerosas mitocôndrias) e apresenta um padrão de crescimento acinar/arquipelaginoso. Pode também apresentar um padrão de crescimento sólido, trabecular ou mesmo quístico. As alterações genéticas mais frequentemente encontradas são a perda do braço curto do cromossoma 1 (1p), perda do braço longo do cromossoma 14 (14q), ou translocação envolvendo a banda 11q13, podendo também apresentar um cariótipo normal (Reuter *et al.*, 2004).

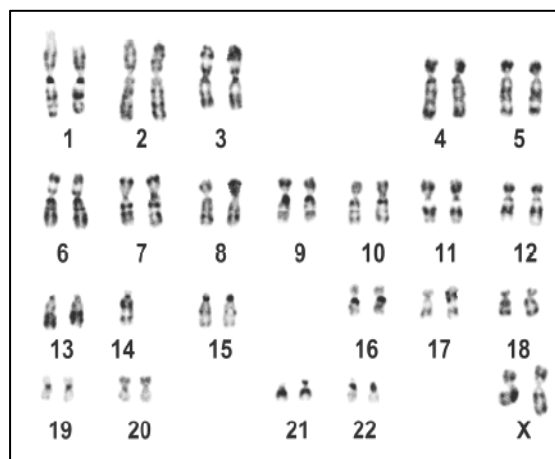


Figura 4 – Exemplo de um oncocitoma com deleção de 1p e monossomia 14 (Fuzesi *et al.*, 2005).

- Adenoma e adenofibroma metanéfrico

São raros, constituídos por tecido metanéfrico embrionário e ainda não foram geneticamente caracterizados.

4.2.2 – Neoplasias renais malignas

As neoplasias malignas incluem, entre outros, o carcinoma de células claras (CCRcc), o carcinoma papilar (CCRp), o carcinoma cromóforo (CCRcr), o carcinoma dos túbulos colectores e um grupo não classificado. Recentemente foi delineado um outro grupo de neoplasias caracterizado por alterações cromossómicas equilibradas que afectam principalmente crianças e adultos jovens.

- Carcinoma de células claras (CCRcc)

Constitui cerca de 75% de todas as neoplasias renais em séries cirúrgicas. São neoplasias malignas compostas por células com citoplasma moderado a abundante, frequentemente clarificado, embora possam existir células com citoplasma eosinofílico. O padrão de crescimento pode ser sólido, trabecular, tubular e quístico, embora também possam ser observadas áreas de crescimento papilar. Macroscopicamente, são frequentemente amarelados devido ao elevado teor em lípidos (Grignon *et al.*, 2004).

Análises citogenéticas de CCRcc revelaram que deleções do braço curto do cromossoma 3 (3p) são frequentes (Grignon *et al.*, 2004). Outras alterações citogenéticas frequentemente encontradas são duplicações de 5q22~qter e deleções de 6q, 8p, 9p e 14q (Grignon *et al.*, 2004).

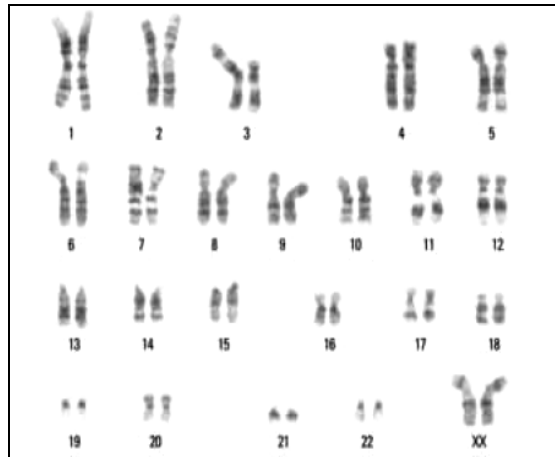


Figura 5 – Exemplo de um cariótipo de carcinoma de células claras com deleção de 3p (Grignon *et al.*, 2004).

Por CGH (*Comparative genomic hybridization*) as alterações mais frequentemente encontradas são perda de 3p (63%), 14q (30%), cromossoma 9 (26%), 1p, 6q ou cromossoma 6 (17%), assim como dos cromossomas 4 e 8p (15%). Ganhos são frequentes nos cromossomas 5 (63%), 7 (35%), 1q (33%), 2 (24%), 8q (20%), 12 e 20 (20% cada) (Reutzel *et al.*, 2001). Jiang *et al.* (2000) observaram valores um pouco diferentes, com perda dos cromossomas 3p (61%), 4q (50%), 6q (40%), 9p (35%), 13q (37%), Xq (21%) e 8p (12%). Os ganhos mais frequentes foram nos cromossomas 17 (20%) e em 5q e 9q (14% cada). O número médio de alterações por tumor foi de 6,4 (entre 0 e 22), sendo o número médio de perdas de 4,5 (entre 0 e 17) e de ganhos de 1,9 (entre 0 e 7) (Jiang *et al.*, 2000).

- Carcinoma papilar (CCRp)

Constitui cerca de 10% das neoplasias renais em séries cirúrgicas. Em mais de 2/3 dos casos são observadas amplas áreas de necrose e de degenerescência quística. Normalmente são revestidos por uma pseudocápsula. As partes viáveis deste tumor são constituídas, em pelo menos 50%, por estruturas papilares com pequenas zonas de padrão tubular. As células deste tumor podem ser pequenas com citoplasma escasso, ou grandes com citoplasma eosinofílico. As alterações genéticas mais frequentemente

detectadas são a trissomia dos cromossomas 3q, 7, 8, 12, 16, 17 e 20 (Delahunt e Eble, 2004).

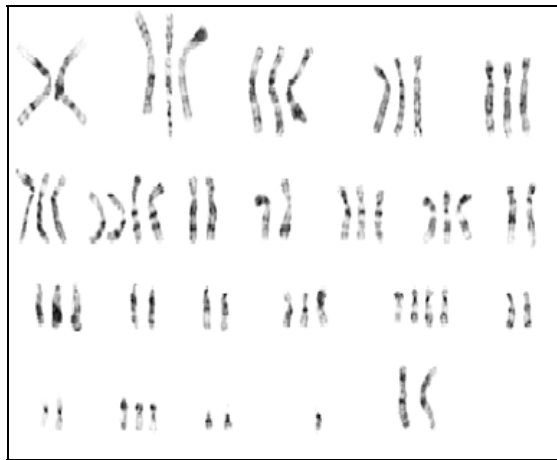


Figura 6 – Exemplo de um carcinoma de células renais papilar com múltiplos ganhos cromossômicos (Soller *et al.*, 2007).

Gunawan *et al.* (2003), num estudo por citogenética clássica que englobava 58 CCRp, verificaram que o número médio de alterações por tumor era de 8,3. A alteração mais frequentemente encontrada foi ganho de 17q (88%), na maioria dos casos combinado com polissomia do cromossoma 7 e/ou ganho de 16q (83%). Todos os tumores apresentavam ploidia alterada pelo menos dos cromossomas 7, 16 ou 17. Ganhos adicionais foram encontrados nos cromossomas 20 (50%), 3q (43%), 12 (41%), 2 (21%), 8q (19%), 5q e 13q (17% cada) e 1q (12%), assim como a perda do cromossoma Y nos homens (87%). Foram também detectadas perdas de material genético, embora em valores inferiores, nomeadamente nos cromossomas 18 (22%), 11q e 22q (16% cada), 9p e 14q (14% cada), 8p e 19p (12% cada) e 2q, 4p e 15q (10% cada) (Gunawan *et al.*, 2003).

O padrão de alterações genéticas detectado por CGH no CCRp inclui ganhos frequentes no número de cópias nos cromossomas 17q (76%), 17p e 7p (56% cada), 7q (44%), 12q (28%) e 16q e 20q (32% cada). As regiões mais frequentemente deletadas

foram Y (73%), 6q (40%), 4q, 9p, 13q e Xq (36% cada), Xp (28%) e 1p (24%) (Jiang F *et al.*, 1998).

Delahunt e Eble (1997) propuseram uma nova classificação para estes tumores que os subdivide em tipo I e II. O tipo I é constituído por estruturas tubulo-papilares rodeadas por células pequenas com citoplasma clarificado (Figura 7-A), enquanto o tipo II é constituído por estruturas papilares rodeadas por células grandes com citoplasma eosinofílico (Figura 7-B). O CCRp do tipo II apresenta-se mais frequentemente em estádios mais avançados (Delahunt e Eble, 1997).

O número de ganhos de regiões cromossómicas, especialmente 7p e 17p é bastante mais significativo no tipo I, sugerindo que existem diferentes vias para estes dois tipos tumorais (Jiang *et al.*, 1998; Gunawan *et al.*, 2003). Os CCRp tipo II apresentam uma frequência mais elevada de alterações cromossómicas estruturais, particularmente ganhos de 1q e perdas de 8p, 11 e 18 (Gunawan *et al.*, 2003).

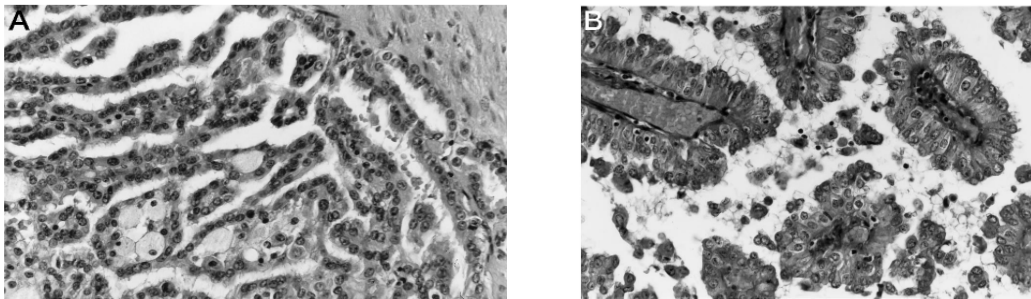


Figura 7 – A) Carcinoma papilar tipo I; B) Carcinoma papilar tipo II. HE 280x.

- Carcinoma cromóforo (CCRcr)

Constitui cerca de 5% das neoplasias renais em séries cirúrgicas e é caracterizado por células grandes, clarificadas, com membranas celulares proeminentes. A microscopia electrónica é bastante útil para a classificação destes tumores visto que apresentam numerosas vesículas citoplasmáticas. A coloração de Hale é muito útil para a sua classificação porque cora o citoplasma de azul. Com os procedimentos de rotina, o

citoplasma tende a condensar-se à volta da membrana celular, e forma um halo mais claro em torno do núcleo. Outras células podem apresentar citoplasma mais granular devido à presença de mitocôndrias, o que pode originar problemas de diagnóstico diferencial com os oncocitomas. O tamanho celular é muito variável e adoptam com frequência um padrão estrutural sólido (Storkel *et al.*, 2004).

Contrariamente ao CCRp, o CCRcr é caracterizado por múltiplas monossomias (Teixeira *et al.*, 2005). As alterações genéticas mais frequentemente encontradas por citogenética clássica são monossomias dos cromossomas 1, 2, 6, 10, 13, 17 e 21. Por CGH, 89% dos tumores apresentam perda do cromossoma 1, 84% perda dos cromossomas 2, 10 e 13, 79% perda dos cromossomas 6 e 21, e 68% perda do cromossoma 17. O cromossoma Y encontra-se perdido em 46% dos casos (Speicher *et al.*, 1994).

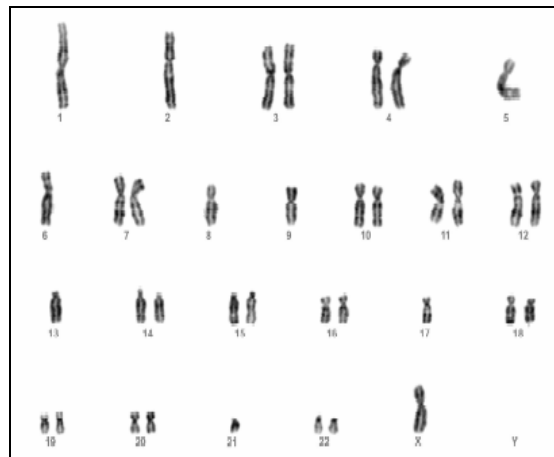


Figura 8 – Exemplo de um carcinoma de células renais cromóforo com múltiplas monossomias (Soller *et al.*, 2007).

- Carcinoma dos túbulos colectores

Constituem cerca de 1% das neoplasias renais em séries cirúrgicas e são caracterizados por apresentarem canais irregulares delineados por epitélio com marcada atipia citológica. Ainda não é totalmente compreendida a biologia do desenvolvimento destas neoplasias. Estudos de *loss of heterozygosity* (LOH) mostraram a existência de

perda de heterozigotia dos cromossomas 1q, 6p, 8p, 13q e 21q (Polascik *et al.*, 1996; Srigley e Moch, 2004).

- Carcinoma renal associado à translocação envolvendo Xp11.2/ Genes de fusão envolvendo *TFE*

O principal grupo afectado é constituído por crianças e adultos jovens e é geneticamente caracterizado por apresentar translocações cromossómicas específicas que envolvem membros da família de factores de transcrição MiTF/TFE.

Uma das translocações cromossómicas é a translocação $t(X;1)(p11;q21)$ envolvendo os genes *TFE* (Xp11) e *PRCC* (1q21) presente em tumores com arquitectura papilar ou em ninhos com citoplasma clarificado ou eosinofílico. Esta translocação resulta na formação do gene de fusão *PRCC-TFE3* e uma consequente sobreexpressão de *TFE3*. A translocação balanceada $t(X;17)(p11;q25)$ é característica de outro grupo de doentes e resulta na formação do gene de fusão *ASPL-TFE3*. Por último, um terceiro grupo de carcinoma renal em crianças é caracterizado pela translocação $t(6;11)(p21;q12)$ que resulta na fusão do gene *Alpha* (11q12) com o gene *TFEB* (6p21) (Teixeira, 2006).

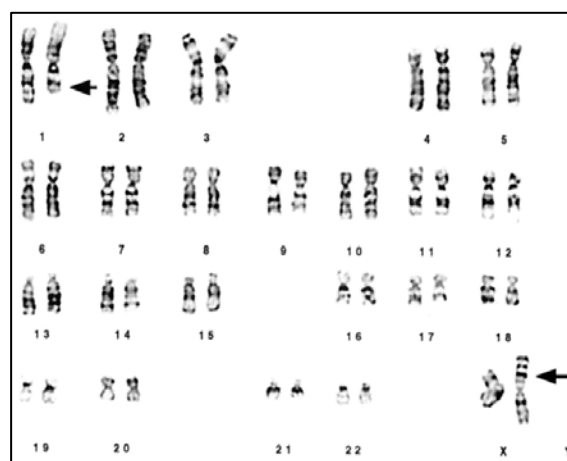


Figura 9 – Exemplo de uma translocação $t(X;1)(p11;q21)$ (Altinok *et al.*, 2005).

- Outros carcinomas de células renais

Na categoria de carcinomas de células renais não classificável enquadram-se todos os carcinomas que não se assemelham com nenhum dos grupos descrito anteriormente, representando 4-5% dos casos. Nesta categoria incluem-se casos com morfologias distintas e alterações genéticas diferentes, pelo que não podem ser classificados de forma específica (Eble, 2004).

Adicionalmente existem outros grupos de neoplasias renais raras, tais como carcinoma de células renais cístico multilocular, carcinoma renal medular, carcinoma renal associado com o neuroblastoma, carcinoma mucinoso tubular e carcinoma sarcomatóide.

5 – Prognóstico

Alguns factores de prognóstico estão já bem estabelecidos, como o estágio da doença e a degeneração sarcomatoide. A presença de invasão micro-vascular, o envolvimento da pélvis renal, o grau nuclear e o tipo celular, apresentam ainda aspectos controversos descritos na literatura.

O sistema de estadiamento TNM elaborado pela “*International Union Against Cancer*” (UICC) juntamente com o “*American Joint Committee on Cancer*” (AJCC) tem em consideração o tamanho do tumor, dado importante para o prognóstico dos doentes. Dentro do mesmo estágio, o grau de Furhman (entre 1 e 4), tem valor prognóstico, especialmente na variante de células claras, sendo que no grau 1 as células tumorais renais apresentam núcleos muito semelhantes aos das células renais normais, enquanto no outro extremo (grau 4), os núcleos são volumosos e com acentuada

bizarria. O prognóstico é tanto mais reservado quanto mais elevado o grau de Furhman (Grignon *et al.*, 2004).

Os diferentes subtipos histológicos apresentam comportamentos clínicos e biológicos distintos, tendo potencial metastático e taxas de sobrevivência diferentes (Gudbjartsson *et al.*, 2005).

6 – Tratamento e alvos moleculares

O tratamento do CCR depende do estágio, sendo a cirurgia o tratamento de eleição e considerado curativo no tumor localizado. As hipóteses de sobreviver a esta doença sem a cirurgia são escassas. Dependendo do grau e estágio, a cirurgia pode abranger apenas o tumor e parte do tecido que o circunscreve, assim como todo o rim e estruturas adjacentes.

A nefrectomia parcial pode ser realizada em casos de tumores com menos de 4 cm de diâmetro. Esta opção cirúrgica está também recomendada nos doentes que apenas possuem um rim, com carcinoma bilateral, insuficiência renal, assim como nos casos de hipertensão, diabetes ou carcinoma de células renais hereditário (Cohen *et al.*, 2005). A nefrectomia total inclui a remoção de todo o rim em bloco com a fáscia de Gerota, a glândula adrenal ipsilateral e os gânglios linfáticos regionais. A abordagem cirúrgica é determinada pelo tamanho e localização do tumor primário assim como pelo estadiamento TNM. Após a nefrectomia total, 20% a 30% dos doentes recidivam (Hafez *et al.*, 1999; Fergany *et al.*, 2000; Druker *et al.*, 2005).

A nefrectomia pode ser igualmente realizada na doença metastática. A combinação do interferão alfa (IFN- α) com a nefrectomia mostrou melhores resultados do que o interferão isoladamente. Muitas vezes, a remoção de uma metástase pode

melhorar a sobrevivência ou permitir uma melhoria temporária dos sintomas (Flanigan *et al.*, 2001; Mickisch *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2005).

O tratamento médico é normalmente usado na doença localmente avançada ou metastática. Como a resposta ao tratamento (quimioterapia, radioterapia e imunoterapia) é baixa, torna-se cada vez mais necessária a identificação de novos agentes terapêuticos. A quimioterapia apresenta respostas na ordem dos 4 a 5% (Yagoda *et al.*, 1995) devido à resistência das células do túbulo contornado proximal (a partir do qual têm origem os carcinomas de células claras e papilar), mas pode ser mais eficaz nos carcinomas com origem no túbulo colector (Cohen *et al.*, 2005).

A radioterapia pode ser utilizada como tratamento paliativo naqueles doentes em que a cirurgia não está indicada, mas apenas resulta em alguns casos. É normalmente usada no controlo da dor ou sangramento de um tumor primário, assim como no tratamento de sintomas associados à invasão da medula óssea ou do sistema nervoso central (Brendan *et al.*, 2004).

A imunoterapia pode ser usada numa pequena percentagem de casos sensíveis a este tratamento e apenas no CCRcc. Doentes com elevado nível de Karnofsky e com doença metastática predominantemente pulmonar, podem ser candidatos a esta terapêutica. As duas citocinas mais frequentemente utilizadas são o IFN- α e a Interleucina-2 (IL-2). Elevadas doses de IL-2 apresentaram boas respostas num pequeno número de doentes, mas a toxicidade obtida levou a estudos que envolvam doses menores (Motzer *et al.*, 1996).

Uma melhor compreensão dos factores que influenciam o desenvolvimento e o crescimento do carcinoma de células renais está a dar origem a novas terapias. O mau prognóstico do carcinoma de células renais metastizado implica uma persistência na procura de novos agentes terapêuticos. A solução poderá estar numa melhor

compreensão da biologia de cada tumor dependente de estudos mais amplos sobre a expressão génica e análises proteómicas.

A inibição da angiogénese é uma forma de combater a metastização no CCR. Surgiram novos agentes terapêuticos inibidores da angiogénese tais como o bevacizumab, o sorafenib e o sunitinib. Enquanto que o bevacizumab é um anticorpo monoclonal contra o VEGF, o sorafenib é um inibidor multikinase oral que actua em VEGFR, PDGFR- β e cinase Raf, o sunitinib inibe o VEGFR e o PDGFR- β . Por outro lado, o temsirolimos é um inibidor da *mammalian target of rapamycin* (mTOR). A expressão de vários destes alvos moleculares é controlada por HIF-1 cujos níveis celulares são controlados pela proteína VHL (Klatte *et al.*, 2007).

7 – Principais problemas de diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial entre os vários tumores renais é muitas vezes difícil quando baseado apenas na morfologia, especialmente entre carcinoma cromóforo e oncocitoma, entre carcinoma cromóforo e carcinoma de células claras, em casos de carcinomas de células claras com padrão de crescimento papilar e entre adenoma e carcinoma papilar (Kovacs *et al.*, 1997; Fuzesi *et al.*, 1999). Teoricamente, doentes com tumores benignos poderiam ser poupados a nefrectomia se o diagnóstico pudesse ser estabelecido com segurança antes da decisão terapêutica (Wunderlich *et al.*, 2005)

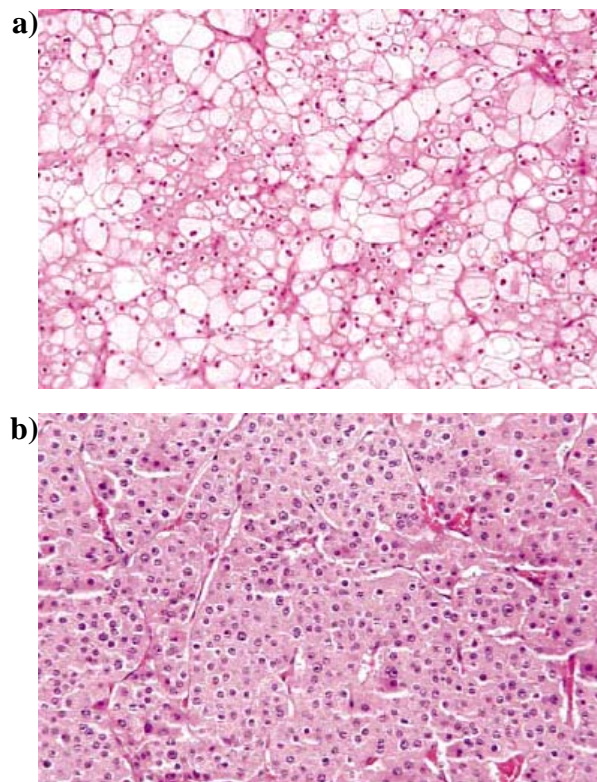
7.1 – Carcinoma cromóforo vs oncocitoma

Em 1985 surge a classificação de carcinoma cromóforo devido à presença de células com um citoplasma clarificado. No entanto, em 1988 verifica-se que existe uma variante destes tumores designada por eosinofílica que apresenta um citoplasma mais

granular devido à presença de mitocôndrias (Thoenes *et al.*, 1988). No mesmo tumor pode estar presente a forma típica, a variante eosinofílica, assim como a transição entre estas duas variantes (Akhtar *et al.*, 1995).

Os problemas de diagnóstico diferencial entre os carcinomas cromóforos e os oncocitomas surgem com a presença de um elevado número de mitocôndrias e um consequente citoplasma granular, denso e eosinofílico, uma vez que estas características são comuns aos dois tipos tumorais (Figura 10). Na coloração de rotina (hematoxilina e eosina) os aspectos morfológicos (particularmente o citoplasma) são semelhantes.

Quando o estudo é baseado na análise molecular ou citogenética, na capacidade de invadir o tecido adiposo ou vasos adjacentes, assim como na capacidade de metastizar (sugerindo neoplasia maligna), verifica-se que uma proporção destes tumores é erradamente classificada como oncocitomas (Bugert *et al.*, 1997). O diagnóstico diferencial é importante porque a sobrevivência destas neoplasias é bastante diferente.



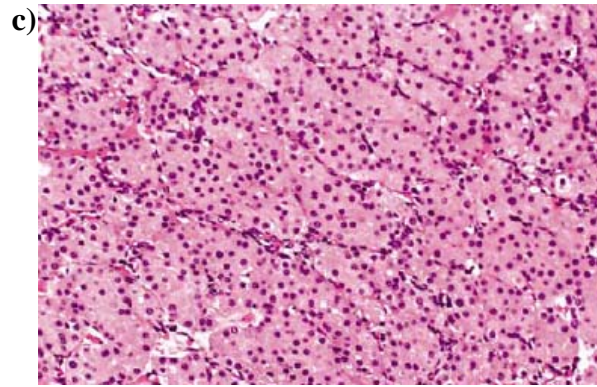


Figura 10 – Morfologia de carcinoma cromóforo (a), variante eosinofílica do carcinoma cromóforo (b) e oncocitoma (c)

7.2 – Carcinoma cromóforo vs carcinoma de células claras

A presença de um elevado número de mitocôndrias e um consequente citoplasma granular, denso e eosinofílico, são características comuns à variante eosinofílica do carcinoma de células claras e à variante eosinofílica do carcinoma cromóforo. Por outro lado, a variante típica do carcinoma cromóforo pode assemelhar-se ao carcinoma de células claras, tendo estes dois subtipos padrões de alterações genéticas distintos (Liu *et al.*, 2007).

7.3 – Carcinoma de células claras vs carcinoma papilar

Alguns tumores de células renais apresentam características morfológicas sobreponíveis, nomeadamente no caso de tumores de células claras com um padrão de crescimento papilar. Recorrendo à análise por citogenética clássica, verificou-se que estes tumores apresentavam as características genéticas dos CCRcc, com deleção de 3p e monossomia do cromossoma 14 (Fuzesi *et al.*, 1999) ou deleção de 3p e trissomia de 5q32~qter (Kovacs *et al.*, 1999), e que não apresentavam aumento do número de cópias

de 3q, 7, 8, 12, 16, 17 e 20 ou perda do cromossoma Y, características dos CCRp (Fuzesi *et al.*, 1999; Salama *et al.*, 2003).

7.4 – Adenoma vs carcinoma papilar

A sobreposição de características morfológicas nos adenomas e carcinomas papilares origina muitos problemas de diagnóstico diferencial ao patologista (Brunelli *et al.*, 2003). A existência de pequenas lesões corticais em autópsias faz levantar a suspeita de existirem muitas lesões no epitélio renal (proliferação) que não têm capacidade de evoluir para cancro. Os estudos existentes que afirmam que tumores com menos de 3 cm não apresentam capacidade para metastizar foram efectuados em autópsias (Bell *et al.*, 1950). No entanto, o critério utilizado para distinguir o adenoma (benigno) do carcinoma papilar (maligno) é apenas o tamanho macroscópico. Com a crescente descoberta acidental de tumores renais cada vez mais pequenos, a classificação baseada no tamanho deixa de fazer sentido, uma vez que tanto pode tratar-se de um tumor indolente como de um tumor agressivo detectado numa fase precoce (Eble, 1997).

7.5 – Diagnóstico diferencial em biópsias renais

A utilização de biópsias renais não está generalizada porque as dificuldades de um diagnóstico morfológico são ainda maiores em amostras reduzidas, podendo não compensar os riscos inerentes ao procedimento (Herts *et al.*, 1995; Wood *et al.*, 1999; Hara *et al.*, 2001; Neuzillet *et al.*, 2004). A possibilidade de associar uma análise genética que permita um diagnóstico diferencial a um procedimento minimamente invasivo poderia evitar nefrectomias desnecessárias no caso de tumores benignos e contribuir para uma melhor avaliação diagnóstica e prognóstica pré-operatória no caso dos carcinomas.

Objetivos

Este estudo teve como objectivos principais:

- 1- Avaliar a possibilidade de analisar simultaneamente todos os cromossomas por hibridação genómica comparativa (CGH) em biópsias aspirativas *ex vivo* de tumores renais;
- 2- Determinar o valor da análise por CGH de biópsias aspirativas para realizar um diagnóstico genético correcto de tumores renais;
- 3- Avaliar a representatividade de uma biópsia aspirativa na caracterização genética por CGH dos vários tumores renais;
- 4- Avaliar a contribuição da análise genética por CGH para o diagnóstico correcto dos tumores renais.

Material e Métodos

1 – Material biológico

O estudo incluiu 75 pacientes (totalizando 150 amostras) com tumores do rim sujeitos a nefrectomia total, tratados consecutivamente no Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil. De cada doente obteve-se uma biópsia aspirativa por agulha fina *ex vivo* e um fragmento de tecido tumoral, de modo a testar a representatividade da biópsia aspirativa para o diagnóstico diferencial e para confirmar a associação entre a classificação morfológica e genética. As biópsias aspirativas e os fragmentos representativos do tumor foram congelados a -80°C até à análise por hibridação genómica comparativa (CGH). O diagnóstico histopatológico do tumor foi realizado por um patologista especializado em uropatologia. Os resultados da análise morfológica e da análise genética foram cruzados no final do estudo.

2 – Métodos

2.1 – Extracção e quantificação do DNA

A extracção de DNA das biópsias aspirativas, do respectivo tumor e dos linfócitos do sangue periférico de dadores saudáveis (DNA de referência) foi realizada por métodos *standard*. Para determinar a concentração de DNA foi utilizado o *NanoDrop*.

2.2 – Hibridação genómica comparativa (CGH)

A técnica de CGH foi descrita pela primeira vez na década de 90 (Kallioniemi *et al.*, 1992; Kallioniemi *et al.*, 1994) e baseia-se na hibridação competitiva de dois DNAs (DNA do tumor marcado com fluorocromo verde e DNA controlo marcado com

fluorocromo vermelho) em metafases normais. Esta metodologia permite a detecção de diferenças no número de cópias de sequências de DNA (ganho ou perda de material) em todo o genoma do tumor, através da análise da variação do rácio da intensidade normalizada da fluorescência dos dois fluorocromos. Como o quociente de intensidade verde/vermelho ao longo de cada cromossoma reflecte a abundância relativa das sequências de DNA no tumor, as regiões cromossómicas que se encontram sobre-representadas no tumor apresentam cor verde, enquanto que as zonas sub-representadas apresentam cor vermelha (Kallioniemi *et al.*, 1992).

Neste estudo o protocolo de CGH foi modificado de acordo com o descrito por Teixeira *et al.* (2004).

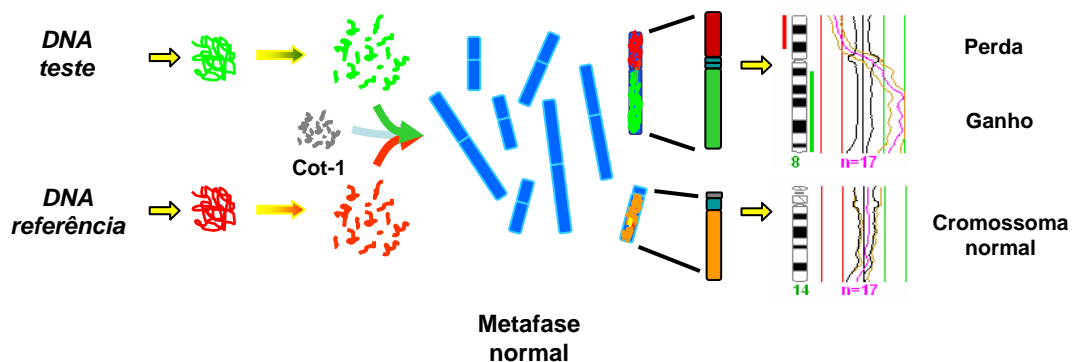


Figura 11 – Representação esquemática da análise por CGH. O DNA tumoral (verde) e normal (vermelho) hibridam numa metafase normal. As regiões cromossómicas onde existe ganho de material apresentam maior intensidade de fluorescência verde, enquanto as zonas com perda de material genético exibem maior intensidade de vermelho.

Esta metodologia engloba três passos:

A- Reacção de *Nick-Translation*:

Para a reacção de marcação do DNA teste (tumoral) e de referência (linfócitos) foram utilizados dUTPs conjugados com fluorocromo verde ou vermelho,

respectivamente. Para um volume final de 50µl, 1 µg de DNA foi marcado com os respectivos nucleotídeos conjugados com *SpectrumGreen-dUTP* [Vysis®] e *SpectrumRed-dUTP* [Vysis®]. Para ajustar o tamanho dos fragmentos (sondas genómicas) foram utilizadas as enzimas *DNA polimerase I/DNase I* [Invitrogen®] e *DNA Polimerase I (E.coli)* [Invitrogen®] com incubação num termociclador GeneAmp PCR System 2700 [Applied Biosystems®] a 15°C durante 40 a 60 minutos. No final de cada reacção, para verificar o tamanho dos fragmentos, os produtos foram sujeitos a electroforese em gel de agarose [GIBCO®] 1% (p/v) corado com solução de brometo de etídeo [SIGMA®], sendo aceitáveis fragmentos com o tamanho compreendido entre os 300 e os 2000 pb.

B- Precipitação do DNA e hibridação

Aproximadamente 60 ng de cada um dos DNAs (tumoral e normal) marcados com o respectivo fluorocromo foram misturados, tendo-se adicionado posteriormente *Human Cot-1 DNA* [Invitrogen®] para bloquear a ligação das sondas às sequências repetitivas dos cromossomas e soluções de etanol absoluto [Merk®] e acetato de sódio 3M [Merk] para precipitar o DNA. Depois de precipitado e seco, o DNA foi dissolvido em tampão de hibridação *LSI Hybridization Buffer* [Vysis®].

As metafases de linfócitos normais, obtidas comercialmente (*CGH Target Slides, Normal Male Metaphases* [Vysis®]), foram desnaturadas em formamida desionizada [Q-BIOgene®] a 70%/2xSSC [Vysis®] à temperatura de 74°C. Após desnaturação a 70°C, a mistura de DNA foi colocada a hibridar com as metafases normais durante 2 a 3 dias, numa câmara húmida a 37°C. Procedeu-se de seguida a uma série de lavagens com formamida desionizada a 50%/2xSSC a 45°C e 2xSSC/0.1Igepal [SIGMA-ALDRICH®] à temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se a solução contrastante *Vectashiel*

Mounting Medium for Fluorescence with DAPI [Vector®] e foi colocada a respectiva lamela.

C- Captura e análise

Para cada amostra foram seleccionadas 10 metafases de boa qualidade. Utilizando uma roda de filtros *HBO 100* acoplada a um microscópio de fluorescência *Axioplan Imaging* [Zeiss®] e o sistema de análise *CytoVision* versão 3,9 [Applied Imaging®], foram sequencialmente capturadas com uma câmara *Cohu 4900 CCD* [Applied Imaging®] (12-bit, monocromática), três imagens correspondentes a cada um dos fluorocromos e ao DAPI. Os cromossomas foram identificados com base na observação no respectivo DAPI invertido e a intensidade relativa do sinal de hibridação foi determinada ao longo de cada cromossoma.

Os dados obtidos das 10 metafases foram combinados originando um perfil médio para cada cromossoma derivado do rácio das duas fluorescências, com um intervalo de confiança de 99%. Com o objectivo de estabelecer um perfil normal para ser utilizado como intervalo de confiança de referência, foram utilizadas 10 metafases de cada uma de dez hibridações normal *versus* normal (Kirchhoff *et al.*, 1998).

Foi considerada a existência de ganho ou perda de material genético sempre que os intervalos de confiança a 99% do DNA teste e de referência não eram sobreponíveis. Foi considerada amplificação sempre que o intervalo de confiança a 99% era superior a 1,5. A descrição das alterações detectadas por CGH foi realizada segundo as normas do ISCN (2005).

2.3 – Interpretação dos resultados

Para a classificação dos tumores do rim seguiu-se o esquema indicado na Figura 12, adaptado de Receuveur *et al.* (2005).

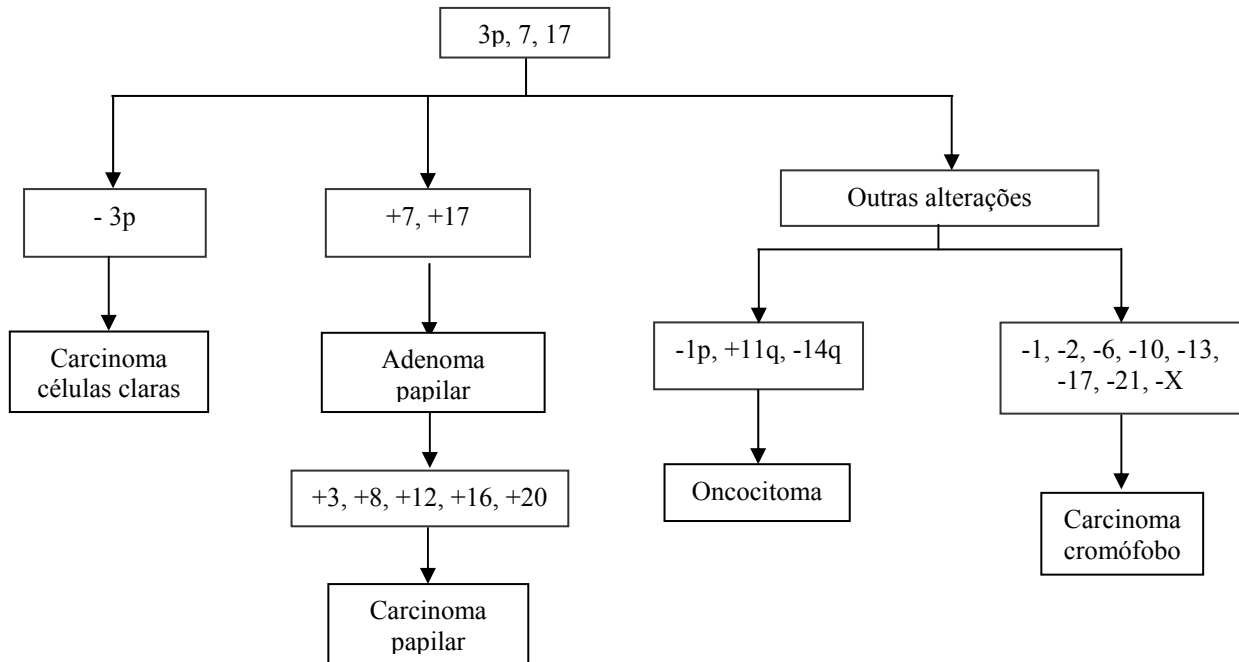


Figura 12 – Diagrama de diagnóstico genético dos tumores de células renais, adaptado de Receuveur *et al.* (2005).

Em primeiro lugar foi observado o padrão de alterações dos cromossomas 3p, 7 e 17. Perante deleção de 3p o tumor foi classificado como carcinoma de células claras (CCRcc). O ganho dos cromossomas 7 e 17 permite o diagnóstico do adenoma papilar. Na presença de ganho de pelo menos três dos cromossomas 3, 7, 8, 12, 17, 16 ou 20, o tumor foi classificado como carcinoma papilar (CCRp). Os carcinomas cromófobos (CCRcr) são diagnosticados por apresentarem perdas dentro do conjunto de cromossomas mais frequentemente alterado, ou seja, os cromossomas 1, 2, 6, 10, 13, 17, 21 ou X. Os critérios para diagnóstico deste subtipo tumoral foram perda de pelo menos dois cromossomas sem mais alterações numéricas e/ou estruturais ou perda de pelo

menos três cromossomas (dentro do grupo de cromossomas mais frequentemente perdidos). O diagnóstico de oncocitomas foi realizado na presença de deleção de 1p, 14q e/ou ganho de 11q. Perante um padrão de alterações genéticas que não se enquadrasse dentro dos subgrupos acima referidos (ou na ausência de alterações genéticas detectáveis por CGH), o tumor foi considerado não classificável do ponto de vista genético.

2.4 – Análise de agregação hierárquica

Para proceder à análise por agregação hierárquica foi necessário codificar os resultados para posteriormente serem importados para o respectivo programa informático. Assim, as alterações foram registadas, por braço cromossómico, numa folha de cálculo do *Microsoft Excel*, excluindo os braços curtos dos cromossomas acrocêntricos. A codificação das alterações do número de cópias por braço cromossómico foi efectuada da seguinte maneira: ausência de alterações, 0; ganho de material, 1; perda de material, -1; amplificação, 2.

A folha de *Excel* com os dados codificados foi guardada em formato de texto e transferida para o programa *J-Express Pro 2.5*. A análise foi realizada com os parâmetros *average linkage* (método de agregação) e correlação de Pearson (distância métrica). Os dendrogramas gerados pelo programa informático agregam as amostras de acordo com o grau de semelhança genética.

Resultados

1 – Diagnóstico genético de tumores do rim

Foi possível realizar a análise por CGH em 62 (83%) biópsias aspirativas e em 72 (96%) fragmentos de tecido tumoral, num total de 75 casos (Tabela 1).

Recorrendo unicamente ao padrão de alterações genéticas na biópsia aspirativa, foi possível realizar o diagnóstico genético em 42 dos 62 tumores (68%) nos quais foi possível obter um resultado por CGH. O diagnóstico genético foi carcinoma de células claras (CCRcc) em 29 casos, carcinoma cromóforo (CCRcr) em oito casos, carcinoma papilar (CCRp) em quatro casos, e oncocitoma em um caso, sendo o diagnóstico genético inconclusivo nos restantes 20 casos.

Nas figuras seguintes, apresenta-se um exemplo de cada diagnóstico genético que foi possível realizar baseado no padrão de alterações genéticas, nomeadamente carcinoma de células claras (Figura 13), carcinoma cromóforo (Figura 14), carcinoma papilar (Figura 15) e oncocitoma (Figura 16).

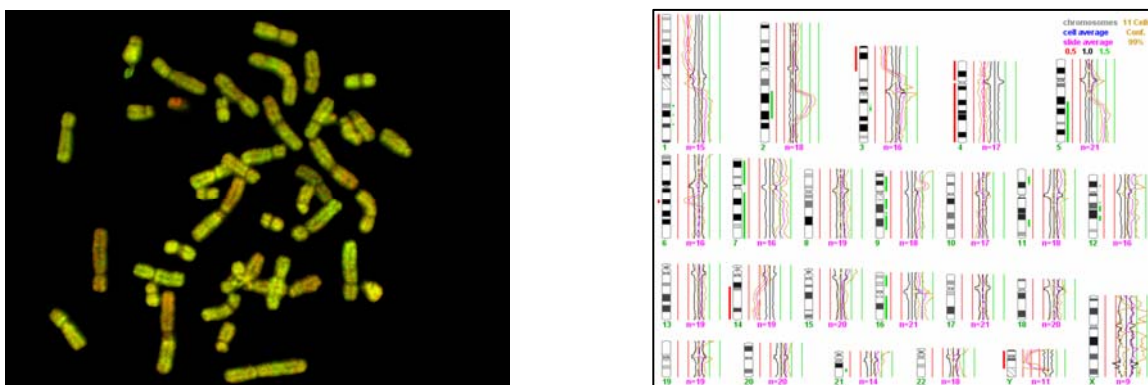


Figura 13 – Exemplo de um carcinoma renal de células claras (caso 199) com uma deleção no ramo curto do cromossoma 3, entre outras alterações. Barras vermelhas representam regiões cromossómicas deletadas e barras verdes representam regiões cromossómicas ganhas.

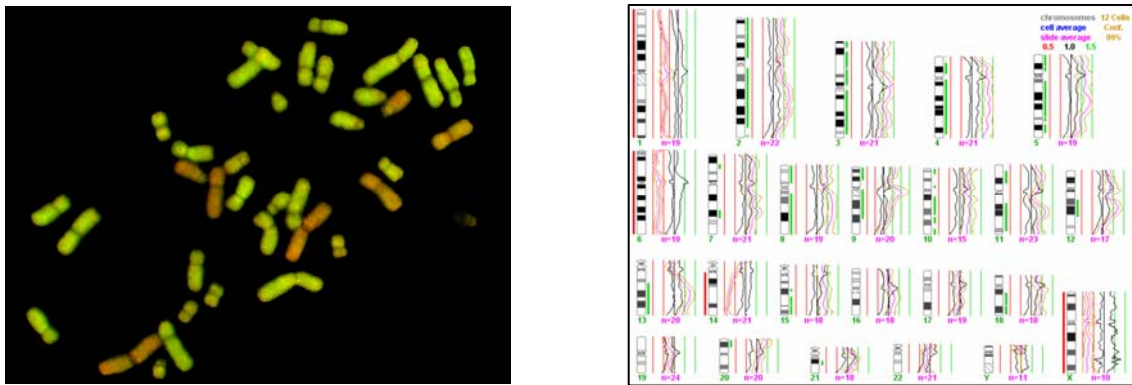


Figura 14 – Exemplo de um carcinoma cromóforo (caso 153) com perda dos cromossomas 1, 6, 14 e X, entre outras alterações. Barras vermelhas representam regiões cromossómicas deletadas e barras verdes representam regiões cromossómicas ganhas.

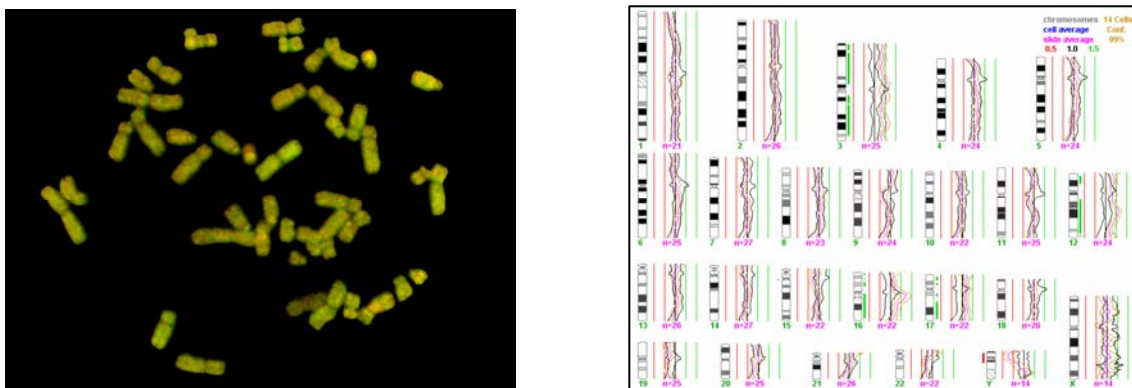


Figura 15 – Exemplo um carcinoma papilar (caso 179) com ganho dos cromossomas 3, 12, 16 e 17. Barras vermelhas representam regiões cromossómicas deletadas e barras verdes representam regiões cromossómicas ganhas.

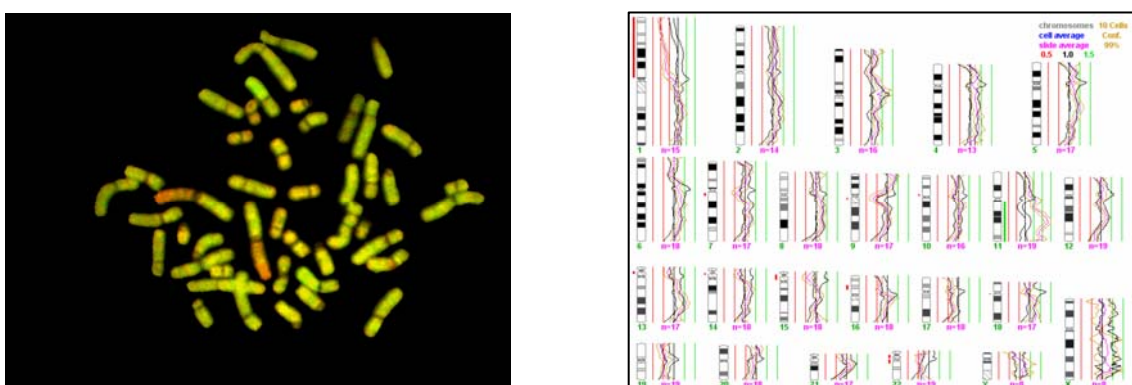


Figura 16 – Exemplo um oncocitoma (caso 182) com perda de 1p e ganho de 11q. Barras vermelhas representam regiões cromossómicas deletadas e barras verdes representam regiões cromossómicas ganhas.

Tabela 1 – Resultados da CGH nas biópsias aspirativas e respectivo fragmento de tecido tumoral.

Caso	CGH biópsia aspirativa	CGH fragmento de tecido tumoral
126	rev ish dim(2)(p23p25),enh(5)(p12p15), dim(9)(p22p24),enh(9)(q11q33),dim(10) (q21q26),dim(11)(q22q25),dim(12)(q24), dim(13)(q14q34),enh(16)(p12p13)	*
127	Sem alterações	*
128	rev ish dim(3)(p26q21),dim(6)(q24q27),dim(9)	*
129	rev ish dim(X)(p22q26),dim(1),dim(2), enh(3),enh(4),enh(5),dim(6),enh(7),enh(8), enh(9),dim(10),enh(11),enh(12),dim(13)(q), enh(14)(q),enh(15)(q),enh(16),dim(17),enh(18), enh(19),enh(20),dim(21)(q),enh(22)(q)	*
130	rev ish dim(Y),dim(3)(p26q21),dim(6)(q24q27), enh(20)	*
131	rev ish enh(2)(q32),enh(3)(p21q29),dim(3) (p21p25),enh(5)(q23q35),dim(8)(p21p22), enh(11)(p13p15),enh(11)(q14q22),dim(11) (q24q25),dim(14)(q31q32),enh(17)(q21q24), dim(22)(q11q13)	*
132	nd	rev ish dim(3)(p14p26),enh(5)(q33q35)
133	rev ish dim(3)(p13p25),enh(5)(q14q35),enh(7), dim(10)(q21q26)	*
134	rev ish dim(X),dim(1),enh(2)(p21p24), dim(2)(q),enh(3)(p21),enh(3)(q21),enh(5) (q32q35),enh(6)(p21p23),enh(7)(p22q11), enh(8)(p12p22),enh(9)(p13q34),enh(11) (p12p15),enh(11)(q13q14),dim(10),enh(11) (q23q24),enh(12)(q13q14),enh(12)(q24), enh(14)(q24q32),enh(15)(q),enh(16),enh(17), enh(18)(q21q23),enh(19),enh(20)(q),enh(21) (q22),enh(22)(q)	*
135	Sem alterações	*

Caso	CGH biópsia aspirativa	CGH fragmento de tecido tumoral
136	rev ish dim(X)(p22q21),dim(X)(q23q26), dim(1)(p36),dim(1)(p33q44),enh(2),dim(3) (p24q29),enh(4),dim(5),dim(6),enh(7),enh(8), dim(9)(p21p24),dim(10)(p13q25),enh(11), enh(12),dim(13)(q),enh(14)(q),enh(15)(q), enh(16),enh(18),dim(17),enh(19),enh(20)	*
137	nd	rev ish enh(2)(p22q37),dim(3)(p13p25), enh(5)(q22),enh(5)(q34q35),enh(7)(q22q35), enh(11)(p12p15),enh(11)(q14q24),enh(12)(q14 q23),enh(20)(p12),enh(20)(q12q13)
138	rev ish enh(2)(q22q37),dim(3)(p21p26)	*
139	nd	Nd
140	nd	Nd
141	Sem alterações	*
142	nd	rev ish dim(3)(p14p25),amp(5p),enh(5) (q22q35),dim(8)(p21p23),dim(9)(q13q34), enh(12), dim(14)(q24q32),enh(16),enh(20)
143	rev ish dim(1)(p31p32),dim(3)(p14p26),enh(3) (q28q29),enh(5)(p15),enh(5)(q13q35),dim(8) (p21p23),dim(11)(q14q25),enh(13)(q21q34), dim(14)(q24q31),enh(16)	*
144	nd	rev ish dim(3)(p12p24),enh(5)(q31q35), enh(16)(q)
145	Sem alterações	*
146	Sem alterações	*
147	rev ish dim(Y),enh(2),enh(3)(q13q29), enh(7)(p15),enh(7)(p13q36),enh(10)(p13q22), enh(12),dim(14)(q),enh(16),enh(17)(p13q21), enh(18)(p11),enh(18)(q21q22),enh(20)	*
148	nd	Nd
149	rev ish dim(18)	*
150	rev ish dim(3)(p21p26),dim(8)(p12p23)	*

Caso	CGH biópsia aspirativa	CGH fragmento de tecido tumoral
151	rev ish dim(3)(p21p24),enh(3)(q12q28),enh(5), dim(6),dim(8)(p23q23),dim(9)(p22p24),dim(9) (q22q33),enh(12)(q21q24),dim(13)(q12q14), dim(14)(q22q32),enh(16)(q12q23), dim(18)(p11q21),enh(21)(q)	*
152	rev ish dim(3)(p13p25),enh(5)(q23q35)	*
153	rev ish dim(X),dim(1),enh(2),enh(3),enh(4), enh(5),dim(6),enh(7)(p15),enh(7)(q31q32), enh(8),enh(9)(p21p24),enh(9)(q13q33),enh(10) (p13),enh(10)(q21q26),enh(11)(p12p15), enh(11)(q13q24),enh(12)(q14q23),enh(13) (q14q34),dim(14),enh(15)(q21q26),enh(18) (q12q23),enh(20)(p12p13),enh(21)(q21q22)	*
154	rev ish dim(3)(p21p26),enh(5)(q33q35), enh(18)	*
155	rev ish dim(Y),dim(3)(p21p25),enh(7)(p14p21), enh(7)(q22q36),dim(8)(p12p23)	*
156	rev ish dim(1)(p36),dim(11)(p15)	*
157	nd	rev ish enh(5)(p15),enh(5)(q14q23)
158	rev ish dim(Y),enh(2)(q22q37),dim(3)(p), enh(5),enh(22)(q12q13)	*
159	rev ish dim(3)(p13p26),dim(14)(q)	*
160	rev ish enh(2)(q21q37),amp(2)(q22q32), dim(3)(p13p25),enh(22)(q11q13)	*
161	nd	rev ish dim(1)(q41q44),dim(3)(p25q21)
162	rev ish dim(1)(p),enh(11)(q),amp(11)(q22q23)	*
163	nd	rev ish enh(2)(q31q33),dim(3)(p21p25), enh(5)(q22q35),dim(14)(q22q32)
164	rev ish dim(Y),enh(2)(p23q33),dim(2)(q37), dim(3)(p25q21),enh(3)(q21q29),enh(7) (p15p21),enh(7)(p13),enh(7)(q21q36),dim(8) (p12p21),enh(8)(q21q23),dim(10),enh(11) (p12p15),enh(11)(q13q23),dim(13)(q31q34), dim(15)(q21q22),enh(16)(q13q24),dim(18) (p11q22),enh(20)(p12p13),enh(20)(q),enh(21) (q21q22)	*

Caso	CGH biópsia aspirativa	CGH fragmento de tecido tumoral
165	rev ish dim(3)(p21p25),enh(5)(q22q35)	*
166	rev ish dim(Y),dim(1)(p36),dim(3)(p12p25), enh(5),amp(5)(q14q31),enh(7),enh(11) (p12p15),dim(14)(q)	*
167	rev ish dim(Y),enh(3)(q21q29),dim(4), enh(5)(p),dim(5)(q13q35),dim(8)(p21p22), dim(9)(p21p23),dim(10)(q23q24),dim(11) (q23q25),enh(16)(q),dim(17)(q11q21),enh(20)	*
168	rev ish enh(7)(p14p21),enh(7)(q31q35)	*
169	rev ish enh(8)(q22q23)	*
170	rev ish enh(1)(q25q42),enh(2),dim(3) (p21p25),enh(5)(q31q35),dim(14)(q)	*
171	Sem alterações	*
172	rev ish dim(3)(p),enh(5),dim(11)(q21q25), enh(12),dim(14)(q),enh(21)(q22)	*
173	rev ish dim(Y),dim(3)(p25q21),enh(6)(p21), dim(6)(q14q27),dim(9)(p13p24)	*
174	nd	rev ish dim(Y),dim(3),enh(5)
175	Sem alterações	*
177	rev ish dim(Y),enh(1)(q21q42),dim(3) (p22p24),dim(3)(p12p14),enh(5)(q31q35), dim(6),enh(7)(q31q36),enh(8)(p21),enh(8) (q22),dim(9)(p),enh(11)(q13q14),enh(12) (q13q24),dim(13)(q),dim(14)(q),dim(15) (q11q22),enh(16)(q),dim(18)(p11q12),enh(20)	*
178	rev ish dim(Y),dim(1),enh(11)(q13q14), enh(13)(q),dim(21)(q)	*
179	rev ish dim(Y),enh(3),enh(12),enh(16),enh(17)	*
180	Sem alterações	*
181	nd	rev ish dim(8)

Caso	CGH biópsia aspirativa	CGH fragmento de tecido tumoral
182	rev ish enh(3),enh(7),enh(16)	*
183	rev ish dim(1)(p34p36),enh(1)(p31),dim(1)(p13p22),enh(1)(q21q43),dim(2),enh(3)(p13p26),dim(3)(q11q21),enh(3)(q22q29),enh(4),enh(5),dim(6),enh(7),enh(8),enh(9),enh(10)(p11p13),dim(10)(q21q26),enh(11),enh(12),dim(13)(q),enh(14)(q),enh(15)(q),enh(16)(q12q24),dim(17),enh(18),enh(20),enh(21)(q),enh(22)(q12q13)	*
184	rev ish dim(Y),enh(1)(p32p33),amp(1)(q21),enh(2)(p13p23),dim(2)(q34q37),enh(3),dim(4)(p),enh(4)(q),enh(5)(p15),dim(5)(q),enh(7)(p13p21),enh(7)(q31q35),dim(8)(p),enh(8)(q),dim(9)(p),enh(10)(p),dim(10)(q21q26),dim(11)(q23q24),enh(12)(q15q23),enh(13)(q12q21),dim(14)(q),enh(16)(q23q24),dim(17)(p),enh(17)(q),dim(18),enh(19)(q13),dim(20)(p),enh(20)(q),amp(20)(q11q12),enh(21)(q21q22)	*
185	Sem alterações	*
186	rev ish dim(3)(p21p26),enh(4)(q26q28),enh(5)(q14q35),enh(7),enh(12),enh(17)(q21q25),amp(17)(q25),dim(22)(q)	*
187	rev ish dim(1)(p35p36),dim(1)(q32),dim(1)(q42),enh(2),enh(3)(p13p24),enh(3)(q21q26),dim(5)(q33q35),enh(7),enh(8),dim(10)(p12p13),enh(12)(p12p13),enh(12)(q14q24),enh(13)(q13q34),dim(15)(q21q22),enh(16)(q12q23),enh(18)(p11q22)	*
188	rev ish dim(Y),dim(3)(p26q21),enh(5),dim(6)(p21p25),enh(7),dim(9),enh(10)(p13q21),dim(11)(q22q25),enh(12),dim(13)(q12q21),dim(14)(q21q32),enh(20)(q),	*
189	rev ish dim(2),enh(3)(q),amp(5)(p),dim(5)(q13q35),enh(7)(p15),enh(7)(q21q36),dim(8)(p23q23),dim(9)(p13p24),dim(9)(q21q34),dim(11)(p),enh(11)(q),amp(11)(q14q23),enh(12),enh(13)(q),enh(14)(q),dim(15)(q),dim(17)(p12p13),enh(17)(q21q25),enh(20)	*
190	rev ish dim(3)(p13p26),enh(5),dim(9),enh(12),dim(14)(q),enh(20)(p12q13)	*
191	rev ish dim(Y),dim(2)(q37),dim(3)(p26q21),enh(5)	*
192	Sem alterações	*
193	rev ish dim(2),dim(17)	*

Caso	CGH biópsia aspirativa	CGH fragmento de tecido tumoral
194	rev ish enh(Y),dim(1),dim(2),enh(3),enh(4), enh(5),dim(6),enh(7),enh(8),enh(9),dim(10), enh(11),enh(12),enh(13)(q21),enh(14)(q24q32), enh(15)(q),enh(16),dim(17),enh(18)(q12q23), enh(19),enh(20),enh(21)(q),enh(22)(q)	*
195	rev ish dim(X),dim(1),dim(2),enh(3),enh(4), dim(5),dim(6),enh(7),enh(8),enh(9),dim(10), enh(11),enh(12),enh(13)(q),enh(14)(q),enh(15) (q),enh(16),dim(17),enh(18),enh(19),enh(20), enh(21)(q),enh(22)(q)	*
196	Sem alterações	*
197	rev ish dim(3)(p21p25),enh(5)(q33q35)	*
198	nd	rev ish enh(7)(p13p21),enh(7)(q21q36), enh(16),enh(20)
199	rev ish dim(Y),dim(1)(p13p36),enh(1)(q22q24), enh(1)(q31),enh(1)(q41),enh(2)(q21q32),dim(3) (p21p26),enh(3)(q21),dim(4),enh(5)(q14q35), dim(6)(q14q16),enh(7),enh(9)(p22q34),enh(11) (p12p15),enh(11)(q23),enh(12)(q13q24), dim(14)(q22q32),enh(16),enh(21)(q22)	*
200	rev ish dim(3)(p13p26),enh(5),dim(8)(p23q13)	*
201	rev ish dim(Y),dim(3)(p),enh(5),dim(6) (q25q27),dim(14)(q)	*

nd – não determinado

rev ish, *reverse in situ hybridization*; enh, *enhanced*; dim, *diminished*; amp, *amplification*

* – Padrão de alterações genéticas similar ao da biópsia aspirativa.

2 – Comparação entre o diagnóstico genético e histopatológico

O diagnóstico genético baseado na biópsia aspirativa foi confirmado pela análise histopatológica em 40 dos 42 casos (95%). Houve discordância entre a classificação genética e histológica em duas neoplasias renais (casos 136 e 162). O caso 136 foi geneticamente classificado como carcinoma cromóforo, e não como carcinoma de células claras por apresentar perdas dentro do conjunto de cromossomas que os

caracteriza, nomeadamente a perda total dos cromossomas 6, 13q e 17. O caso 162 foi geneticamente classificado como oncocitoma, e não como carcinoma cromóforo, pois apresentou um padrão de alterações genéticas, perda de 1p e ganho de 11q, característico daquele tumor benigno. O diagnóstico genético foi confirmado em ambos os casos após reavaliação pelo anatomopatologista.

Considerando apenas os casos em que foi possível a análise por CGH na biópsia aspirativa, e tendo em conta o diagnóstico final, a análise genética classificou correctamente 29 dos 31 carcinomas de células claras, 8 dos 13 carcinomas cromóforos, 4 dos 4 carcinomas papilares e 1 dos 7 oncocitomas, totalizando 42 (75%) dos 56 tumores de células renais. O valor preditivo positivo, o valor preditivo negativo, a sensibilidade e a especificidade dos resultados de CGH para cada subtipo de tumor renal encontram-se na Tabela 2.

Se incluirmos todas as amostras da série, a análise genética na biópsia aspirativa classificou correctamente 29 dos 42 (69%) carcinomas de células claras, 8 dos 13 (62%) carcinomas cromóforos, 4 dos 5 (80%) carcinomas papilares e 1 dos 8 (12.5%) oncocitomas (Tabela 3).

A análise de CGH nos fragmentos de tecido tumoral conseguiu classificar mais 8 casos para além dos 42 diagnosticados pela análise genética das biópsias aspirativas (Tabela 4). A taxa de classificação dos tumores por CGH nos dois tipos de amostra em conjunto foi de 50 de 72 (69%) tumores renais ou de 50 de 66 (76%) se considerarmos apenas os tumores de células renais.

Por subtipo histológico de tumores de células renais, a análise genética combinada dos dois tipos de amostra permitiu classificar correctamente 36 dos 42 (86%) carcinomas de células claras, 8 dos 13 (62%) carcinomas cromóforos, 5 dos 5 (100%) carcinomas papilares e 1 dos 8 (12.5%) oncocitomas.

Tabela 2 – Valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, sensibilidade e especificidade por subtipo histológico da classificação genética nas biópsias aspirativas de tumores renais nas quais foi possível realizar CGH.

	Valor Preditivo Positivo	Valor Preditivo Negativo	Sensibilidade	Especificidade
CCR Células claras	100%	93.9%	93.5%	100%
CCR Cromóforo	100%	90.7%	61.5%	100%
CCR Papilar	100%	100%	100%	100%
Oncocitoma	100%	90.2%	14.3%	100%

Tabela 3 – Classificação morfológica e genética na série de 75 tumores do rim estudados.

Caso	Tipo histológico	Classificação por CGH
126	Leiomiossarcoma	d
127	Linfoma não-Hodgkin folicular	d
128	CCR Células claras	CCR Células claras
129	CCR Cromóforo	CCR Cromóforo
130	CCR Células claras	CCR Células claras
131	CCR Células claras	CCR Células claras
132	CCR Células claras	a,b
133	CCR Células claras	CCR Células claras
134	CCR Cromóforo	CCR Cromóforo
135	Oncocitoma	d
136	CCR Células claras*	CCR Cromóforo*
137	CCR Células claras	a,b
138	CCR Células claras	CCR Células claras
139	CCR Células claras	a,c,d
140	CCR Células claras	a,c,d
141	Oncocitoma	d
142	CCR Células claras	a,b
143	CCR Células claras	CCR Células claras
144	CCR Células claras	a,b
145	Oncocitoma	d
146	Oncocitoma	d
147	CCR Papilar	CCR Papilar
148	Oncocitoma	a,c,d
149	CCR de padrão misto	d
150	CCR Células claras	CCR Células claras
151	CCR Células claras	CCR Células claras
152	CCR Células claras	CCR Células claras
153	CCR Cromóforo	CCR Cromóforo
154	CCR Células claras	CCR Células claras
155	CCR Células claras	CCR Células claras
156	CCR Cromóforo	d
157	CCR Células claras	a,d
158	CCR Células claras	CCR Células claras
159	CCR Células claras	CCR Células claras

Caso	Tipo histológico	Classificação por CGH
160	CCR Células claras	CCR Células claras
161	CCR Células claras	a,b
162	CCR Cromóforo*	Oncocitoma*
163	CCR Células claras	a,b
164	CCR Células claras	CCR Células claras
165	CCR Células claras	CCR Células claras
166	CCR Células claras	CCR Células claras
167	Carcinoma urotelial	d
168	CCR Células claras	d
169	CCR Cromóforo	d
170	CCR Células claras	CCR Células claras
171	Oncocitoma	d
172	CCR Células claras	CCR Células claras
173	CCR Células claras	CCR Células claras
174	CCR Células claras	a,b
175	CCR Cromóforo	d
177	CCR Células claras	CCR Células claras
178	Oncocitoma	d
179	CCR Papilar	CCR Papilar
180	CCR Células claras	a,d
181	CCR Células claras	a,d
182	CCR Papilar	CCR Papilar
183	CCR Cromóforo	CCR Cromóforo
184	Carcinoma urotelial papilar	d
185	Angiomiolipoma	d
186	CCR Células claras	CCR Células claras
187	CCR Papilar	CCR Papilar
188	CCR Células claras	CCR Células claras
189	Carcinoma urotelial papilar	d
190	CCR Células claras	CCR Células claras
191	CCR Células claras	CCR Células claras
192	CCR Cromóforo	d
193	CCR Cromóforo	CCR Cromóforo
194	CCR Cromóforo	CCR Cromóforo
195	CCR Cromóforo	CCR Cromóforo
196	CCR Cromóforo	d
197	CCR cístico multilocular**	CCR Células claras
198	CCR Papilar	a,b
199	CCR Células claras	CCR Células claras
200	CCR Células claras	CCR Células claras
201	CCR Células claras	CCR Células claras

^a Não foi possível efectuar análise na biópsia por escassez de material.

^b Foi possível obter diagnóstico recorrendo à análise do tumor.

^c Não foi possível efectuar análise no tumor.

^d Não foi possível obter um diagnóstico.

* Divergência entre classificação histológica e genética.

** Variante de baixo grau do carcinoma de células claras

Tabela 4 – Série de tumores renais na qual foi possível obter um diagnóstico genético apenas no fragmento de tecido tumoral.

Caso	Tipo histológico do tumor	Classificação por CGH do fragmento de tecido tumoral
132	CCR Células claras	CCR Células claras
137	CCR Células claras	CCR Células claras
142	CCR Células claras	CCR Células claras
144	CCR Células claras	CCR Células claras
161	CCR Células claras	CCR Células claras
163	CCR Células claras	CCR Células claras
174	CCR Células claras	CCR Células claras
198	CCR Papilar	CCR Papilar

3 – Análise de agregação hierárquica

A análise de agregação hierárquica baseada apenas no padrão de alterações genéticas revelou a existência de três grupos distintos de tumores: o grupo dos carcinomas papilares e carcinomas uroteliais, o grupo dos carcinomas de células claras e o grupo dos carcinomas cromófobos e oncocitomas (Figura 17). Houve dois tumores que segregaram fora do grupo a que pertencem, o caso 168 (carcinoma de células claras) e o caso 187 (carcinoma papilar). O caso 126, que corresponde a um leiomiossarcoma, segregou em conjunto com o grupo I.

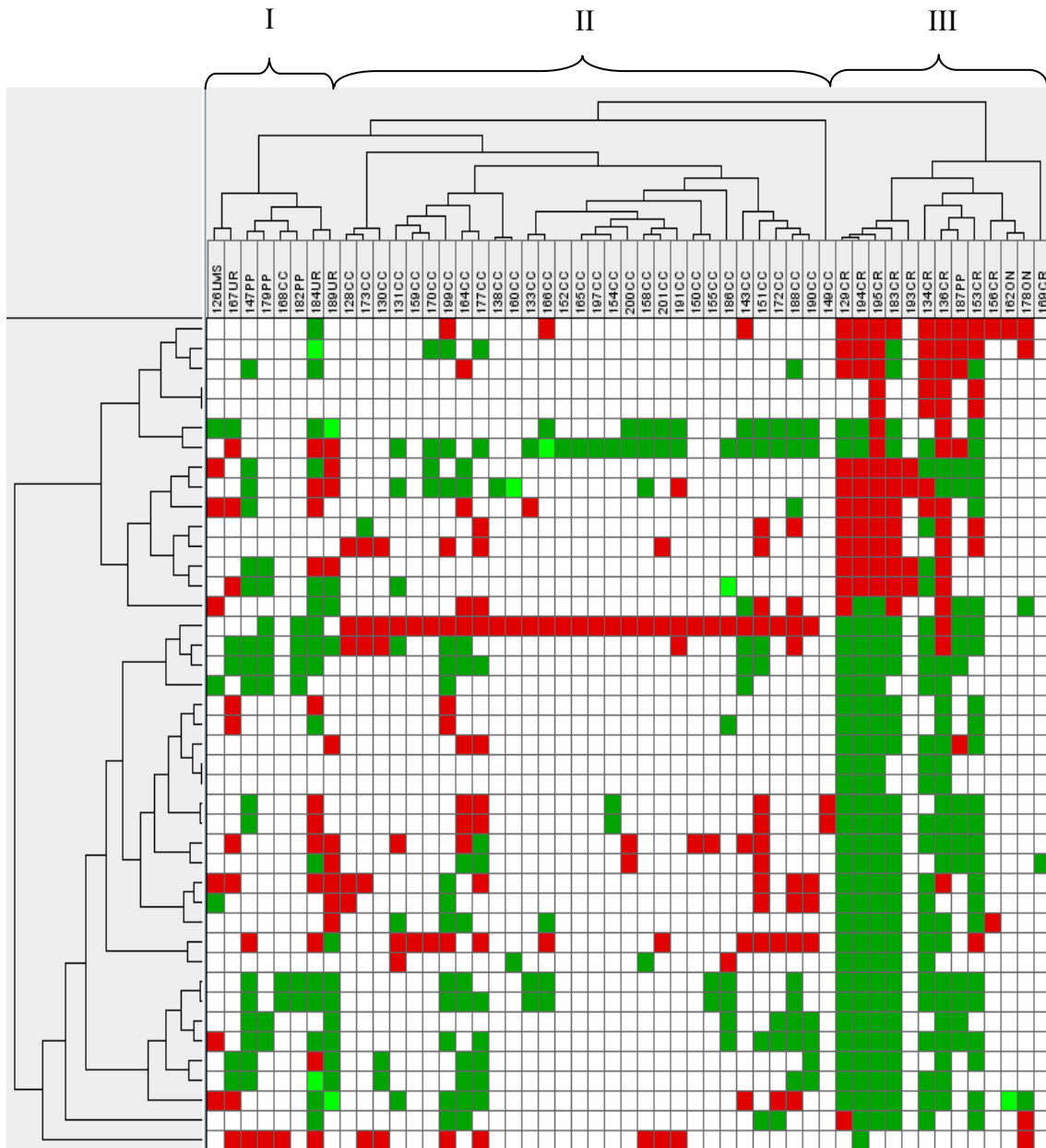


Figura 17 – Análise de agregação hierárquica nas biópsias aspirativas dos tumores renais, nas quais foi possível obter um resultado por CGH (excluindo cariótipos normais). I, grupo dos carcinomas papilares e carcinomas uroteliais; II, grupo dos carcinomas de células claras; III, grupo dos carcinomas cromófobos e oncocitomas.

4 – Padrão de alterações cromossômicas por tipo de tumor renal

Para efeitos de comparação entre o diagnóstico histológico final e o perfil de alterações genéticas, foi contabilizado o resultado da biópsia sempre que possível e, na sua ausência, o perfil do respectivo fragmento de tecido tumoral.

No grupo dos carcinomas de células claras, apenas um apresentou cariótipo normal. De entre os que apresentam cariótipo anormal, o padrão de alterações mais frequente incluiu perdas em 3p (92%), 14q (36%), 8p (23%) e Y (21%). Relativamente aos ganhos de material genético destacaram-se 5q (69%), 5p (33%), 7q (26%), 2q e 12q (23% cada) e 7p (21%) (Figura 18).

Nos carcinomas cromófolos, três casos apresentaram cariótipo normal (casos 175, 192 e 196). Nos restantes destacaram-se as perdas de 1p (80%), 1q, 2q, 6, 10q e 17 (60% cada), 2p e 10p (50% cada), X (40%), 13q (23%) e 5 (20%). Relativamente a ganhos predominaram os dos cromossomas 7, 8, 11, 12q, 15q e 18q (70% cada), 3p, 4, 9, 14q, 16q, 18p e 20 (60% cada), 3q, 5q, 12p, 16p, 19, 21q e 22q (50% cada), 5p (40%), 2p e 13q (30% cada) e 2q e 10q (20% cada) (Figura 19).

No grupo dos carcinomas papilares, todos apresentaram alterações genéticas sendo as alterações mais frequentes os ganhos de 16q (100%), de 3q, 7 e 16p (80% cada), de 3p e 12 (60% cada), de 2, 17, 18 e 20 (40% cada) e de 8, 10 e 13q (20% cada) e as perdas dos cromossomas Y (40%) e 1, 5q, 10p, 14q e 15q (20% cada) (Figura 20).

Relativamente aos oncocitomas, apenas dois casos apresentaram cariótipo anormal (num total de 8 neoplasias) sendo as regiões mais frequentemente afectadas por perdas os cromossomas 1p (100%), 1q, 21q e Y (50%) e por ganhos os cromossomas 11q (100%) e 13q (50%).

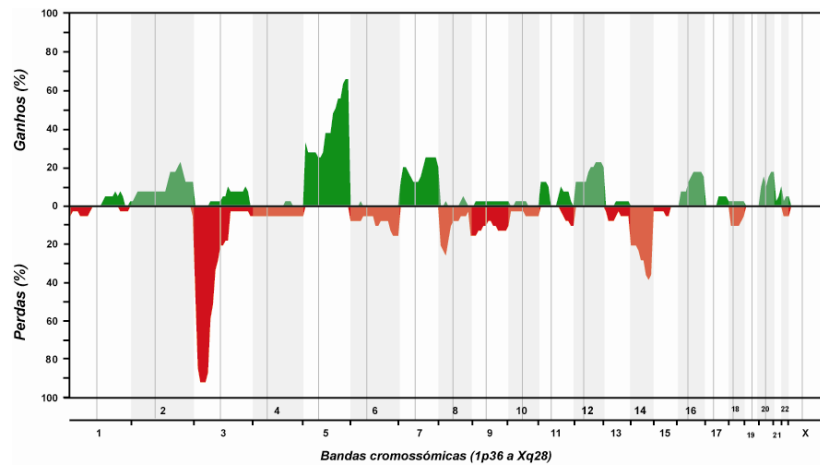


Figura 18 – Padrão de alterações no nº de cópias de DNA detectado na série de carcinomas de células claras, recorrendo à CGH.

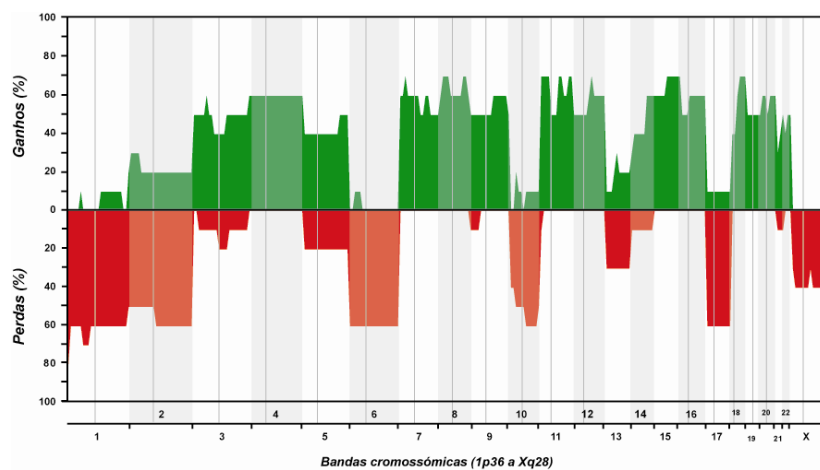


Figura 19 – Padrão de alterações no nº de cópias de DNA detectado na série de carcinomas cromófobos, recorrendo à CGH.

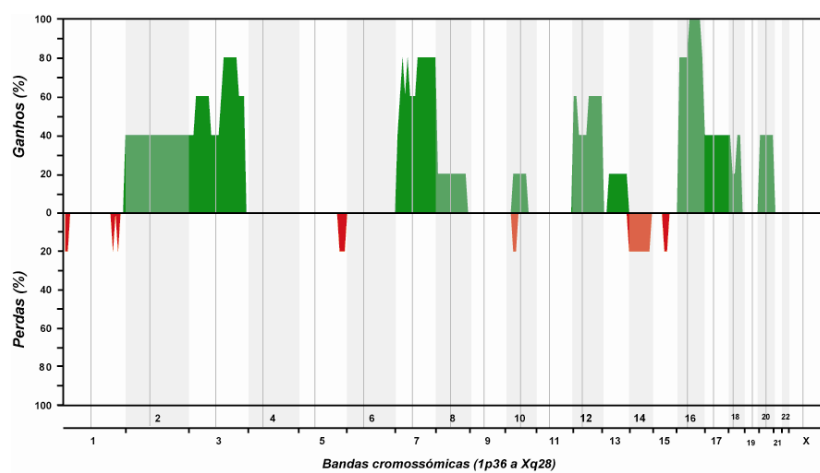


Figura 20 – Padrão de alterações no nº de cópias de DNA detectado na série de carcinomas papilares, recorrendo à CGH

5 – Heterogeneidade genética intratumoral

Quando comparados os resultados obtidos pela análise da biópsia aspirativa com o fragmento de tecido tumoral, foi encontrada heterogeneidade intratumoral em sete carcinomas de células renais no total de 62 casos em que foi possível estabelecer a comparação (Tabela 5, Figuras 21 e 22).

Tabela 5 – Casos com heterogeneidade genética entre a biópsia aspirativa e o respectivo fragmento de tecido tumoral.

Caso	Tipo de alteração	CGH da biópsia aspirativa	Heterogeneidade no fragmento de tecido tumoral
130	Ganho	20	-20
	Perda	Y,3p26q21,6q24q27	+18q21q23
133	Ganho	5q14q35,7	-5q14q35
	Perda	3p13p25,10q21q26	-10q21q26
143	Ganho	3q28q29,5p15,5q13q35,13q21q34,16	-5p15, -5q13q35
	Perda	1p31p32,3p14p26,8p21p23,11q14q25,14q24q31	-1p31p32, -8p21p23, -11q14q25, -14q24q31
159	Perda	3p13p26,14q	-14q
173	Ganho	6p21	
	Perda	Y,3p25q21,6q14q27,9p13p24	+14q
186	Ganho	4q26q28,5q14q35,7,12,17q21q25	-7
	Perda	3p21p26,22q	-22q
	Amplificação	17q25	
190	Ganho	5,12,20p12q13	
	Perda	3p13p26,9,14q	+1p21p22, +4, +8p, +18

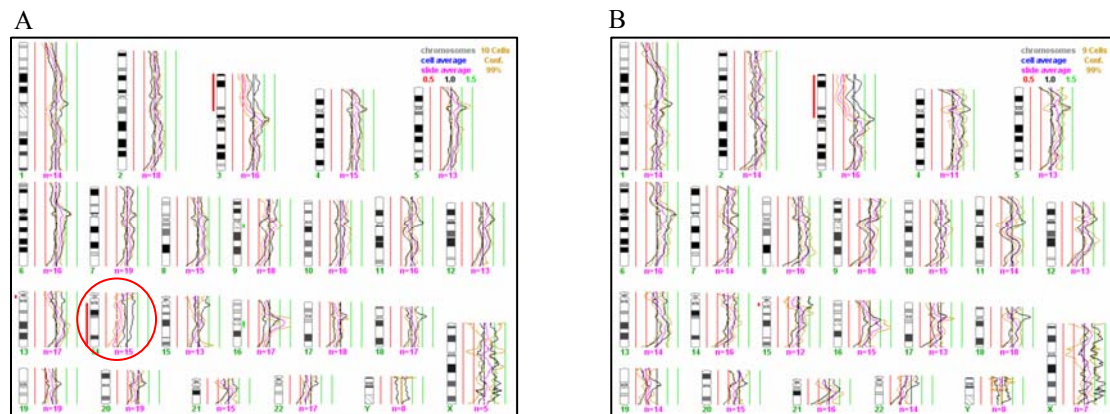


Figura 21 – Evidência de heterogeneidade intratumoral no caso 159 entre a biópsia aspirativa (A) e o respectivo fragmento de tecido tumoral (B), sendo a deleção de 3p comum a ambas as amostras.

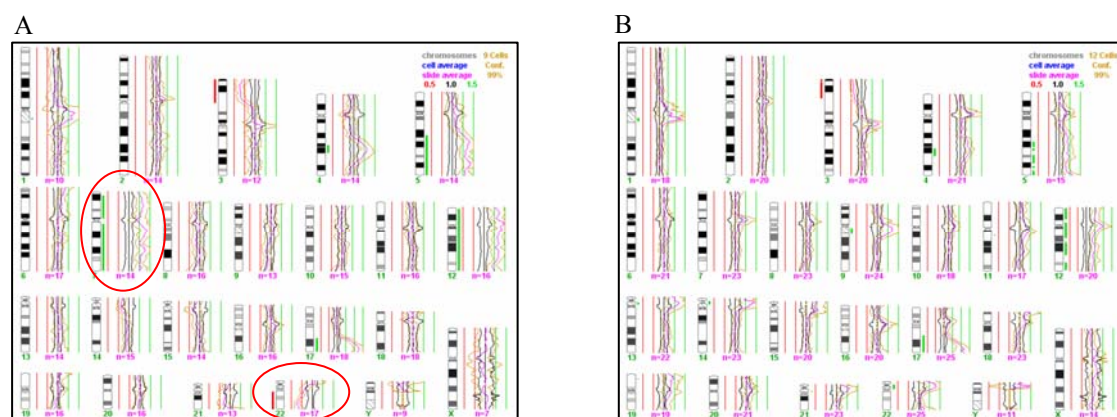


Figura 22 – Evidência de heterogeneidade intratumoral no caso 186 entre a biópsia aspirativa (A) e o respectivo fragmento de tecido tumoral (B), sendo a deleção de 3p, entre outras alterações, comum a ambas as amostras.

Discussão

1 – Considerações metodológicas

A classificação de Heidelberg das neoplasias renais é baseada no padrão de alterações citogenéticas presentes nas células neoplásicas, nomeadamente a deleção de 3p no carcinoma de células claras, monossomias múltiplas no carcinoma cromóforo e trissomias múltiplas no carcinoma papilar (Eble *et al.*, 2004). Várias metodologias podem ser utilizadas para a classificação dos tumores renais, entre as quais a citogenética clássica, o FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) e a CGH.

A citogenética clássica baseia-se na análise de metafases, sendo para tal necessário tecido fresco para estabelecer cultura celular. Permite a análise de todos os cromossomas simultaneamente, pelo que é um bom método para estabelecer um diagnóstico e pode fornecer informação prognóstica por permitir avaliar a evolução clonal. No entanto, esta metodologia está limitada pela taxa de divisão celular *in vitro* das células tumorais, que pode ser inferior à das células normais existentes na amostra. O tempo de cultura varia de caso para caso, podendo demorar até uma ou duas semanas (Chang *et al.*, 2003). Outra limitação é inerente ao nível de resolução, pois as bandas cromossómicas têm cerca de 5 a 10 megabases de DNA e podem incluir centenas de genes. A possibilidade de a complexidade cariotípica poder mascarar determinadas alterações citogenéticas é também um problema inerente a esta metodologia.

O FISH possibilita a análise de células individuais no âmbito de organização tecidular (usando cortes de tecido embebido em parafina), permitindo também observar a eventual heterogeneidade existente no tumor. É baseado no uso de sondas dirigidas a determinada região do cromossoma, permitindo identificar ganho, perda ou rearranjo de determinado gene ou conjunto de genes. Por permitir a análise de núcleos interfásicos, pode ser aplicado a amostras obtidas por citologia aspirativa. É um método rápido, mas apresenta a desvantagem de o número de alvos possíveis de serem estudados

simultaneamente ser limitado, perdendo-se informação sobre as regiões do genoma não testadas (Teixeira *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2003).

A CGH cromossómica é um bom método para a detecção de ganhos/amplificações e/ou perdas de material genético em todos os cromossomas ao mesmo tempo, não sendo necessárias sondas específicas ou informação *à priori* sobre as regiões eventualmente alteradas. Não necessita de cultura celular, bastando a extracção de DNA de boa qualidade do tumor (idealmente de material fresco ou congelado) e de tecido normal (geralmente de leucócitos de um dador). A CGH tem como desvantagem não detectar translocações equilibradas, inversões, mutações pontuais, ou alterações nas regiões repetitivas peri-centroméricas e subteloméricas, tendo um limite de resolução de 3 a 10 Mb. Existe ainda uma limitação relacionada com a contaminação da amostra com células normais, que poderá diminuir a sensibilidade da técnica, particularmente se a percentagem de células neoplásicas for inferior a 50% (Kallioniemi *et al.*, 1992; Kallioniemi *et al.*, 1994).

2 – Diagnóstico genético em biópsia aspirativa de tumores do rim

O diagnóstico de tumores renais recorrendo a biópsias aspirativas tem sofrido alguns avanços nos últimos anos. A biópsia aspirativa, sendo um procedimento pouco invasivo, é realizada com o objectivo de determinar a natureza benigna ou maligna de lesões não ressecáveis (devido, por exemplo, à ausência de condições cirúrgicas), perante uma doença metastática em diagnóstico, em doença localizada mas em estágio avançado, ou para determinar se se trata de um tumor primário do rim ou de uma metástase (Truong *et al.*, 1999). É também utilizada com o objectivo de estabelecer um diagnóstico preciso antes do tratamento médico (Katz *et al.*, 1997; Renshaw *et al.*,

1997; Truong *et al.*, 1999). Com os avanços da imagiologia na avaliação médica de rotina têm sido detectados tumores renais cada vez mais pequenos, sendo muito importante a obtenção de um diagnóstico fidedigno e uma melhor avaliação da agressividade biológica da neoplasia numa fase prévia à definição da terapêutica.

Volpe *et al.* (2007) realizaram uma revisão de todos os casos publicados entre 1977 e 2006 com utilização de biópsias por agulha e aspirativas, no intuito de determinar qual a indicação, o procedimento utilizado, a precisão, a sensibilidade e a segurança deste exame e verificaram que, com o avanço da tecnologia e da experiência, o risco de originar células de tumor circulantes é mínimo, devendo os urologistas ponderar a realização de um maior número de biópsias em massas renais suspeitas, com o intuito de obter um diagnóstico precoce (pelo menos nos indivíduos mais idosos e/ou com maior risco de complicação com a cirurgia). De acordo com diversos autores, a utilização de biópsia aspirativa apenas para uma análise citológica tem a limitação de nem sempre prever o grau de Furhman nem uma correcta classificação nos diferentes subtipos histológicos (Nguyen *et al.*, 1985; Flint *et al.*, 1987; Ljungber *et al.*, 1987; Dekmezian *et al.*, 1991; Auger *et al.*, 1993; Cajulis *et al.*, 1993; Layfield, 1994; Caraway *et al.*, 1995; Granter *et al.*, 1997). A familiarização com os aspectos citológicos das células normais do parênquima renal é importante para se poder obter um diagnóstico. Truong *et al.* (1999) alertaram para o facto de grandes quantidades de glomérulos e de células epiteliais tubulares se encontrarem presentes em biópsias aspirativas renais, podendo simular a presença de um CCR. Após comparação dos resultados em nefrectomias e em biópsias, aqueles investigadores verificaram uma boa correlação em relação ao grau do tumor mas não em relação à classificação por subtipo histológico nas variantes de células claras e granulares do CCR, apesar de descreverem aspectos distintos e característicos para carcinomas papilares e cromófobos. Mesmo

recorrendo a biópsias por agulha (com o objectivo de um diagnóstico histológico) a taxa de insucesso na classificação ou obtenção de biópsias viáveis pode ser superior a 25%, sendo por vezes necessária a realização de várias biópsias (no centro e periferia do tumor, tornando o método mais invasivo) (Dechet *et al.*, 2003; Neuzillet *et al.*, 2004; Wunderlich *et al.*, 2005).

A sobreposição de características morfológicas origina problemas de diagnóstico diferencial num pequeno, mas significativo, número de tumores renais, mesmo em mãos de patologistas muito experientes usando peças de nefrectomia (Kim *et al.*, 2002; Abrahams *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007). Um citoplasma granular, denso e eosinofílico, é comum à variante eosinofílica do carcinoma de células claras, ao carcinoma cromóforo, e ao oncocitoma. Por outro lado, a forma típica do carcinoma cromóforo pode assemelhar-se ao carcinoma de células claras (Tickoo *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2007). Estas dificuldades explicam a alteração do diagnóstico histopatológico inicial ocorrida em dois casos, após reavaliação tendo em consideração a informação genética (um carcinoma de células claras e um carcinoma cromóforo foram reclassificados como carcinoma cromóforo e oncocitoma, respectivamente). A importância de uma classificação correcta prende-se com a diferente agressividade clínica das neoplasias. O carcinoma de células claras é o subtipo de tumor mais agressivo, enquanto o carcinoma papilar tem melhor prognóstico, o carcinoma cromóforo raramente metastiza e o oncocitoma é um tumor benigno (Barocas *et al.*, 2007). De facto, a sobrevivência livre de doença aos 5 anos é 43-89% nos carcinomas de células claras, 57-86% nos carcinomas papilares e 76-100% nos carcinomas cromóforos (Moch *et al.*, 2000; Amin *et al.*, 2002; Gudbjartsson *et al.*, 2005; Patard *et al.*, 2005).

Recorrendo unicamente ao padrão de alterações genéticas na biópsia aspirativa *ex vivo*, e de acordo com o diagrama adaptado de Receuveur *et al* (2005) (Figura 12), foi possível classificar correctamente, com uma especificidade e valor preditivo positivo de 100%, 42 dos 56 (75%) tumores de células renais que puderam ser analisados por CGH, correspondendo a 29 de 31 carcinomas de células claras (sensibilidade de 93.5%, valor preditivo negativo de 93.9%), 8 de 13 carcinomas cromófobos (sensibilidade de 61.5%, valor preditivo negativo de 90.7%), 4 de 4 carcinomas papilares (sensibilidade de 100%, valor preditivo negativo de 100%) e 1 de 7 oncocitomas (sensibilidade de 14.3%, valor preditivo negativo de 90.2%). Por outro lado, a análise de agregação hierárquica não agregou todos os subtipos histológicos de uma forma igualmente fidedigna, sugerindo que a interpretação do analista das alterações genéticas mais relevantes constitui a melhor opção para a classificação destes tumores.

Na literatura, de acordo com o nosso conhecimento, o único estudo em biópsias renais que envolveu citogenética clássica ou molecular foi realizado por Barocas *et al.* (2007). Estes investigadores efectuaram um diagnóstico morfológico e genético [FISH para os centrómeros dos cromossomas 3, 7, 10 e 17, *loci* para 13q e 21q e *BACs* (*bacterial artificial chromosomes*) para o gene *VHL*] numa série de 36 CCR/oncocitomas, em material obtido em biópsia por agulha *ex vivo*, e compararam com o diagnóstico final. O material obtido na biópsia permitiu um correcto diagnóstico morfológico e genético em 87% e 68% dos casos, respectivamente (excluindo as amostras em que não foi possível a análise por inadequada quantidade/qualidade do material). Quando o diagnóstico morfológico foi reavaliado, dois carcinomas cromófobos foram reclassificados como carcinomas de células claras por apresentarem deleção de 3p, e um carcinoma cromóforo foi reclassificado como papilar por apresentar trissomia dos cromossomas 7 e 17. No entanto, de dois carcinomas de células

claras com material insuficiente para análise morfológica mas analisáveis por FISH, um foi correctamente diagnosticado (com deleção de 3p) e o outro foi incorrectamente classificado como papilar (por não apresentar deleção de 3p mas sim trissomia 7 e 17). Contudo, a combinação das análises morfológica e genética resultou num aumento do número de casos correctamente classificados de 87% para 94%.

Existe a necessidade da combinação de uma análise genética ao diagnóstico histopatológico para uma classificação mais fidedigna dos tumores de células renais, não só no que diz respeito a tumor benigno vs maligno mas também para identificação do tipo de neoplasia. O estudo de Barocas *et al.*, no entanto, revela uma limitação do diagnóstico genético recorrendo ao FISH uma vez que há perda de informação sobre as regiões do genoma não testadas. A CGH tem a vantagem de analisar todos os cromossomas ao mesmo tempo, possibilitando a identificação do perfil genético global do tumor. Mesmo perante a eventual ausência da alteração genética primária, o padrão característico de alterações cromossómicas secundárias pode permitir o diagnóstico diferencial. O presente estudo demonstra que a análise por CGH de biópsias aspirativas é possível e que é superior à análise por FISH com sondas específicas no diagnóstico de tumores de células renais.

3 – Padrão de alterações genéticas em tumores de células renais

3.1 – Carcinoma de células claras

A análise por CGH nos dois tipos de amostras detectou, no grupo de casos geneticamente anormais, a perda de 3p característica do carcinoma de células claras em 92% dos casos, o que é superior ao encontrado na generalidade dos estudos por CGH (61-63%, Jiang *et al.*, 2000; Reutzel *et al.*, 2001). Foram ainda encontradas alterações

cromossômicas secundárias características, tais como perdas de 8p, 14q e Y e ganhos de 2q, 5p, 5q, 7p, 7q e 12q.

Três casos sem deleção de 3p apresentaram alterações cromossômicas distintas dos eventos secundários anteriormente descritos no CCRcc, sugerindo tratarem-se de uma entidade genética à parte. Um caso não apresentou alterações por CGH, podendo eventualmente ter alterações genéticas abaixo do limiar de resolução desta técnica.

A frequente deleção de 3p nos carcinomas de células claras sugere a existência de genes supressores tumorais aí localizados com relevância para a carcinogênese destes tumores. Foi encontrada perda de heterozigotia em carcinomas de células claras esporádicos em três regiões, 3p12~14, 3p21~22 e em 3p25~26 (Van den Berg *et al.*, 1997). Em 3p25~26 o gene supressor tumoral mais relevante é o *VHL*. Em 3p12~14 são vários os genes candidatos, nomeadamente o *FHIT* (Julicher *et al.*, 1999, Dreijerink *et al.*, 2001). Existem outros genes candidatos a um papel relevante, tais como *DRR1* em 3p21.1 (Wang *et al.*, 2000), o *RASSF1A* em 3p21.3 (Dreijerink *et al.*, 2001), e o *TGFβR-II* em 3p22 (Ramp *et al.*, 1997; Kundu *et al.*, 1998).

É ainda desconhecido qual o gene ou genes alvo do ganho de 5q, presente em 69% na nossa série. Diversos genes relacionados com o crescimento ou proliferação celular encontram-se localizados nesta região, nomeadamente os genes *PDGFRβ*, *CSF1R*, *FGF1*, *IL9*, *CDC25* e *CDC25C* (Yang *et al.*, 2000).

3.2 – Carcinoma cromóforo

Oito dos 13 carcinomas cromóforos apresentaram um padrão de alterações por CGH compatível com este subtipo histológico, três apresentaram cariótipo normal e os dois restantes pequenas alterações não características deste subtipo tumoral.

Para além de monossomias características deste subtipo tumoral (dos cromossomas 1, 2, 6, 10, 13q, 17 e X), detectaram-se ganhos de 7, 8, 11, 12q, 15q e 18q (70% cada), 3p, 4, 9, 14q, 16q, 18p e 20 (60% cada), 3q, 5q, 12p, 16p, 19, 21q e 22q (50% cada), 5p (40%), 2p e 13q (30% cada) e 2q e 10q (20% cada). A aparente complexidade destes cariótipos é em parte explicada como um reflexo da ploidia do tumor, uma vez que os ganhos relativos podem resultar quer da presença de duas cópias de certos cromossomas num tumor hiper-haplóide ou de quatro cópias desses mesmos cromossomas após poliploidização (geralmente resultando em hiper-triploidia) (Kovacs *et al.*, 1988; Gerharz *et al.*, 1995, Bugert *et al.*, 1997).

Carcinomas cromófobos com cariótipo normal representam uma minoria dos casos na literatura. Speicher *et al.* (1994) obtiveram dois casos normais num total de 19 casos analisados por CGH, enquanto Iqbal *et al.* (1996) encontraram dois casos normais em oito por citogenética clássica. Por outro lado, Brunelli *et al.* (2005) reportaram dois casos sem alterações numéricas num total de 19 estudados por FISH recorrendo à combinação de sondas centroméricas para os cromossomas 1, 2, 6, 10 e 17.

3.3 – Carcinoma papilar

Na série de cinco carcinomas papilares foram encontrados ganhos de cromossomas característicos deste subtipo histológico (3, 7, 8, 12, 16, 17 e 20) e ainda dos cromossomas 2, 10, 13q e 18. Adicionalmente, alguns casos apresentaram perdas dos cromossomas 1, 10p, 14q, 15q e Y.

A partir do estudo de Bell (1950) o tamanho do tumor passou a ser considerado como critério para diferenciar benigno de maligno, apesar de alguns pequenos tumores terem capacidade de metastização. Baseado no facto de ter sido descrito que carcinomas papilares apresentam ganhos dos cromossomas 7, 12, 16, 17 e 20 e que os adenomas

apresentam apenas ganhos nos cromossomas 7 e 17 e perda do Y, surgiu a ideia que a aquisição de trissomias adicionais de diferentes cromossomas leva à transformação do adenoma em carcinoma. Estes estudos incluíram muito poucos tumores com tamanho \leq 5 mm de diâmetro devido à dificuldade da análise por citogenética clássica (Dal Cin *et al.*, 1989; Kovacs *et al.*, 1991, Brunelli *et al.*, 2003).

O ganho do cromossoma 7 nem sempre apareceu associado com o ganho do cromossoma 17, mas surgiram sim combinações de ganhos de cromossomas dentro do grupo dos frequentemente afectados nos carcinomas papilares, tal como descrito anteriormente por vários autores [nomeadamente por Henkle e Erbersdobler (2002) e Gunawan *et al.*, (2003)].

Mutações do gene *MET* (7q31) presentes no CCRp hereditário estão descritas em apenas uma pequena percentagem de casos de CCRp esporádico. Schmidt *et al.* (1999) obtiveram 13% de CCRp esporádicos com mutação deste gene. Kovacs *et al.* (1993), através da citogenética clássica, obtiveram trissomia 7 em 95% dos casos. Estes dados sugerem que a trissomia do cromossoma 7 nem sempre está associada à presença de mutações do gene *MET*.

3.4 – Oncocitoma

Dos oito oncocitomas analisados apenas dois eram geneticamente anormais, incluindo as típicas perdas de 1p e ganho de 11q. O cariótipo normal pode reflectir a presença de translocações balanceadas ou a presença de alterações genéticas abaixo do limiar de resolução da CGH, mas também pode ser um resultado influenciado por contaminação da amostra com células normais.

Fuzesi *et al.* (2005) sugerem a existência de três subgrupos dentro dos oncocitomas, um sem alterações detectáveis por citogenética clássica, o segundo

caracterizado por perdas de 1/1p como evento primário, seguidas de perda dos cromossomas Y ou 14, e um terceiro grupo com translocações envolvendo 11q13.

Foi encontrada perda de 1/1p em oncocitomas por diversos autores (Brown *et al.*, 1996; Presti *et al.*, 1996; Thrash-Bingham *et al.*, 1996; Herbers *et al.*, 1998; Junker *et al.*, 2000), sugerindo a existência de genes supressores tumorais localizados em 1p, não tendo ainda sido encontrada nenhuma região envolvida em particular. A perda adicional do cromossoma 14 sugere que se trata de um evento secundário (Presti *et al.*, 1996; Junker *et al.*, 2000; Fuzesi *et al.*, 2005).

Alterações envolvendo 11q13 foram descritas por diversos autores como um subgrupo de oncocitomas. Foram encontradas numerosas translocações envolvendo as bandas 9p23 (Walter *et al.*, 1989; Fuzesi *et al.*, 1994; Neuhaus *et al.*, 1997), 5q35 (Presti *et al.*, 1991, Sinke *et al.*, 1997, Jhang *et al.*, 2004), 4q12, 9q22 e 9q32 (Fuzesi *et al.*, 1998) e 6p21, 7q11 e 1p13 (Jhang *et al.*, 2004). Em 11q13 localiza-se o gene *CCND1* (também conhecido por *PRADI* e *BCL1*) responsável pela regulação do ciclo celular. A sobreexpressão de *CCND1* é uma das alterações genéticas mais comuns no desenvolvimento neoplásico, incluindo doenças hematológicas, carcinoma da mama e carcinoma espinocelular (Lammie *et al.*, 1991). Lin *et al.* (1998) sugeriram a existência de sobreexpressão de ciclina D1 em aproximadamente 50% dos oncocitomas. Por outro lado, Jhang *et al.* (2004) encontrou sobreexpressão em apenas 3 de 5 casos com uma translocação envolvendo 11q13, sugerindo a existência de outros genes alvo nesta região.

4 – Heterogeneidade genética intratumoral

A heterogeneidade intratumoral passa muitas vezes despercebida pois normalmente apenas se analisa uma amostra por neoplasia. Neste estudo foi efectuada uma comparação entre o resultado da CGH na biópsia aspirativa com o de um fragmento de tecido tumoral, tendo sido encontrada heterogeneidade genética intratumoral em sete dos 62 casos em que foi possível estabelecer uma comparação (todos eles carcinomas de células claras). No entanto, a heterogeneidade intratumoral pode estar subestimada neste estudo visto que a CGH não detecta clones relativamente pequenos nem alterações cromossómicas equilibradas (Teixeira *et al.*, 1996, 2001).

Em seis dos sete casos houve evidência de progressão tumoral focal, com alterações genéticas adicionais apenas numa das amostras. No caso restante verificou-se progressão clonal divergente nas duas amostras. De salientar que a heterogeneidade intratumoral encontrada não afectou o diagnóstico genético destes carcinomas de células claras, uma vez que a deleção de 3p foi detectada sempre em ambas as amostras e a divergência clonal envolveu apenas alterações cromossómicas secundárias.

Conclusão

As principais conclusões deste trabalho são:

1. É possível obter informação genómica global por CGH na maioria (83%) das biópsias aspirativas de tumores renais.
2. É possível realizar o diagnóstico genético por subtipo histológico em 75% das biópsias aspirativas de tumores de células renais com especificidade e valor preditivo positivo de 100%. A sensibilidade e o valor preditivo negativo são de, respectivamente, 93.5% e 93.9% para carcinomas de células claras, 61.5% e 90.7% para carcinomas cromófobos, 100% e 100% para carcinomas papilares e 14.3% e 90.2% para oncocitomas.
3. Os resultados obtidos por CGH em biópsia aspirativa são globalmente compatíveis com os do fragmento de tecido tumoral, sendo que a heterogeneidade intratumoral encontrada em 12.5% dos tumores de células renais não afecta o diagnóstico genético.
4. A análise genética por CGH contribui para uma classificação mais fidedigna de tumores de células renais (quer em peças de nefrectomia quer em biópsias aspirativas), possibilitando a obtenção de um diagnóstico mais preciso antes de qualquer decisão terapêutica.

Referências bibliográficas

Abrahams NA, MacLennan GT, Khoury JD, *et al.* Chromophobe renal cell carcinoma: a comparative study of histological, immunohistochemical and ultrastructural features using high throughput tissue microarray. *Histopathology* 2004;45:593-602.

Akhtar M, Kardar H, Linjawi T, McClintock J, Ali MA. Chromophobe cell carcinoma of the kidney. A clinicopathologic study of 21 cases. *Am J Surg Pathol* 1995;19:1245-56.

Altinok G, Kattar MM, Mohamed A, *et al.* Pediatric renal carcinoma associated with Xp11.2 translocations/TFE3 gene fusions and clinicopathologic associations. *Pediatr Dev Pathol* 2005; 8:168-80.

Amendola MA, Bree RL, Pollack HM, *et al.* Small renal cell carcinomas: resolving a diagnostic dilemma. *Radiology* 1988; 166:637-41.

Amin MB, Amin MB, Tamboli P, *et al.* Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases. *Am J Surg Pathol* 2002; 26:281-91.

Auger M, Katz RL, Sella A, Ordóñez NG, *et al.* Fine-needle aspiration cytology of sarcomatoid renal cell carcinoma: a morphologic and immunocytochemical study of 15 cases. *Diagn Cytopathol.* 1993; 9:46-51.

Barocas DA, Mathew S, DelPizzo JJ, *et al.* Renal cell carcinoma sub-typing by histopathology and fluorescence in situ hybridization on a needle-biopsy specimen. *BJU Int* 2007; 99:290-5.

Bell ET. Renal disease. Lea e Febiger. Philadelphia: 1950.

Bodmer D, van den Hurk W, van Groningen JJ, *et al.* Understanding familial and non-familial renal cell cancer. *Hum Mol Genet.* 2002; 11:2489-98.

Brendan D. Renal cell carcinoma. *JAMA* 2004; 292:97-100.

Brown JA, Takahashi S, Alcaraz A, *et al.* Fluorescence in situ hybridization analysis of renal oncocytoma reveals frequent loss of chromosomes Y and 1. *J Urol* 1996; 156:31-5.

Brunelli M, Eble JN, Zhang S, Martignoni G, Cheng L. Metanephric adenoma lacks the gains of chromosomes 7 and 17 and loss of Y that are typical of papillary renal cell carcinoma and papillary adenoma. *Mod Pathol* 2003; 16:1060-3.

Brunelli M, Eble JN, Zhang S, Martignoni G, Cheng L. Gains of chromosomes 7, 17, 12, 16, and 20 and loss of Y occur early in the evolution of papillary renal cell neoplasia: a fluorescent in situ hybridization study. *Mod Pathol* 2003; 16:1053-9.

Brunelli M, Eble JN, Zhang S, *et al.* Eosinophilic and classic chromophobe renal cell carcinomas have similar frequent losses of multiple chromosomes from among

chromosomes 1, 2, 6, 10, and 17, and this pattern of genetic abnormality is not present in renal oncocytoma. *Mod Pathol* 2005;18:161-9.

Bugert P, Gaul C, Weber K, *et al.* Specific genetic changes of diagnostic importance in chromophobe renal cell carcinomas. *Lab Invest* 1997; 76:203-8.

Cajulis RS, Katz RL, Dekmezian R, el-Naggar A, *et al.* Fine needle aspiration biopsy of renal cell carcinoma. Cytologic parameters and their concordance with histology and flow cytometric data. *Acta Cytol.* 1993; 37:367-72.

Caraway NP, Wojcik EM, Katz RL, *et al.* Cytologic findings of collecting duct carcinoma of the kidney. *Diagn Cytopathol.* 1995;13:304-9.

Chang CC, Shidham VB. Molecular genetics of pediatric soft tissue tumors: clinical application. *J Mol Diagn* 2003; 5:143-54.

Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2005; 353:2477-90.

Dal Cin P. Genetics in renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol* 2003; 13:463-6.

Dechet CB, Zincke H, Sebo TJ, *et al.* Prospective analysis of computerized tomography and needle biopsy with permanent sectioning to determine the nature of solid renal masses in adults. *J Urol* 2003; 169:71-4.

Dekmezian R, Sneige N, Shabb N. Papillary renal-cell carcinoma: fine-needle aspiration of 15 cases. *Diagn Cytopathol.* 1991; 7:198-203.

Delahunt B, Eble JN. Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod Pathol* 1997;10:537-44.

Dreijerink K, Braga E, Kuzmin I, *et al.* The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:7504-9.

Drucker BJ. Renal cell carcinoma: current status and future prospects. *Cancer Treat Rev* 2005; 31:536-45.

Eble JN, Bostwick DG. Neoplasms of the kidney. *In:* Eble JN, Bostwick DG, editors. *Urologic Surgical Pathology*. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc 1997: 82-147.

Eble JN. Renal cell carcinoma, unclassified. *In:* Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, editors. *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. Lyon: IARC Press 2004: 43.

Eble JN, Moch H. Papillary adenoma of the kidney. *In:* Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, editors. *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. Lyon: IARC Press 2004: 41-43

Fearon ER. Tumor Suppressor Genes. in Vogelstein B, Kinzler KW, editors. The Genetics Basis of Human Cancer, 2nd Edition. New York: McGraw-Hill 2002: 197-206.

Fergany AF, Hafez KS, Novick AC. Long-term results of nephron sparing surgery for localized renal cell carcinoma: 10-year followup. J Urol 2000;163:442-5.

Flanigan RC, Salmon SE, Blumenstein BA, *et al.* Nephrectomy followed by interferon alfa-2b compared with interferon alfa-2b alone for metastatic renal-cell cancer. N Engl J Med 2001; 345:1655-9.

Flint A, Cookingham C. Cytologic diagnosis of the papillary variant of renal-cell carcinoma. Acta Cytol. 1987;(3):325-9.

Fuzesi L, Gunawan B, Braun S, Boeckmann W. Renal oncocytoma with a translocation t(9;11)(p23;q13). J Urol 1994; 152:471-2.

Fuzesi L, Gunawan B, Braun S, *et al.* Cytogenetic analysis of 11 renal oncocytomas: further evidence of structural rearrangements of 11q13 as a characteristic chromosomal anomaly. Cancer Genet Cytogenet 1998;107:1-6.

Fuzesi L, Gunawan B, Bergmann F, *et al.* Papillary renal cell carcinoma with clear cell cytomorphology and chromosomal loss of 3p. Histopathology 1999; 35:157-61.

Fuzesi L, Frank D, Nguyen C, *et al.* Losses of 1p and chromosome 14 in renal oncocytomas. Cancer Genet Cytogenet 2005; 160:120-5.

Gerharz CD, Moll R, Storkel S, *et al.* Establishment and characterization of two divergent cell lines derived from a human chromophobe renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 1995; 146:953-62.

Grignon DJ, Eble JN, Bonsib SM, *et al.* Clear cell renal cell carcinoma. *In:* Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, editors. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: IARC Press 2004: 23-25.

Granter SR, Fletcher JA, Renshaw AA. Cytologic and cytogenetic analysis of metanephric adenoma of the kidney: a report of two cases. *Am J Clin Pathol.* 1997; 108:544-9.

Gudbjartsson T, Hardarson S, Petursdottir V, *et al.* Histological subtyping and nuclear grading of renal cell carcinoma and their implications for survival: a retrospective nation-wide study of 629 patients. *Eur Urol* 2005; 48:593-600.

Gunawan B, von Heydebreck A, Fritsch T, *et al.* Cytogenetic and morphologic typing of 58 papillary renal cell carcinomas: evidence for a cytogenetic evolution of type 2 from type 1 tumors. *Cancer Res* 2003; 63:6200-5.

Hafez KS, Fergany AF, Novick AC. Nephron sparing surgery for localized renal cell carcinoma: impact of tumor size on patient survival, tumor recurrence and TNM staging. *J Urol* 1999;162:1930-3.

Hara I, Miyake H, Hara S, *et al.* Role of percutaneous image-guided biopsy in the evaluation of renal masses. *Urol Int* 2001; 67:199-202.

Henke RP, Erbersdobler A. Numerical chromosomal aberrations in papillary renal cortical tumors: relationship with histopathologic features. *Virchows Arch* 2002; 440:604-9.

Herbers J, Schullerus D, Chudek J, *et al.* Lack of genetic changes at specific genomic sites separates renal oncocytomas from renal cell carcinomas. *J Pathol* 1998; 184:58-62.

Herts BR, Baker ME. The current role of percutaneous biopsy in the evaluation of renal masses. *Semin Urol Oncol* 1995; 13:254-61.

Hung RJ, Moore L, Boffetta P, *et al.* Family history and the risk of kidney cancer: a multicenter case-control study in Central Europe. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16:1287-90.

International Agency for Research on Cancer (IARC); Cancer databases; IARC Cancer Epidemiology; Globocan 2002 [online 6 de Abril de 2008]. *In:* URL: <http://www.dep.iarc.fr>.

Iqbal MA, Akhtar M, Ali MA. Cytogenetic findings in renal cell carcinoma. *Hum Pathol* 1996; 27:949-54.

ISCN An International system for Human Cytogenetic Nomenclature. S. Karger: Basel
2005

Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008; 58:
71-96.

Jhang JS, Narayan G, Murty VV, Mansukhani MM. Renal oncocytomas with 11q13
rearrangements: cytogenetic, molecular, and immunohistochemical analysis of cyclin
D1. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 149:114-9.

Jiang F, Richter J, Schraml P, *et al.* Chromosomal imbalances in papillary renal cell
carcinoma: genetic differences between histological subtypes. *Am J Pathol* 1998;
153:1467-73.

Jiang F, Desper R, Papadimitriou CH, *et al.* Construction of evolutionary tree models
for renal cell carcinoma from comparative genomic hybridization data. *Cancer Res*
2000; 60:6503-9.

Julicher K, Marquitan G, Werner N, *et al.* Novel tumor suppressor locus in human
chromosome region 3p14.2. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1563-8.

Junker K, Moravek P, Podhola M, *et al.* Genetic alterations in metastatic renal cell
carcinoma detected by comparative genomic hybridization: correlation with clinical and
histological data. *Int J Oncol* 2000;17:903-8.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, *et al.* Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258:818-21.

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, *et al.* Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 10:231-43.

Katz RL. Controversy in fine-needle aspiration of lymph nodes. A territorial imperative? *Am J Clin Pathol* 1997; 108:S3-S5.

Kim MK, Kim S. Immunohistochemical profile of common epithelial neoplasms arising in the kidney. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002; 10:332-8.

Kinzler KW, Vogelstein B. Basic Concepts in Cancer Genetics: Introduction. *In:* Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The Genetics Basis of Human Cancer*, 2nd Edition. New York: McGraw-Hill 2002: 2-6.

Klatte T, Pantuck AJ, Kleid MD, Beldegrun AS. Understanding the natural biology of kidney cancer: implications for targeted cancer therapy. *Rev Urol* 2007; 9:47-56.

Kovacs G, Frisch S. Clonal chromosome abnormalities in tumor cells from patients with sporadic renal cell carcinomas. *Cancer Res* 1989; 49:651-9.

Kovacs G, Fuzesi L, Emanuel A, Kung HF. Cytogenetics of papillary renal cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1991; 3:249-55.

Kovacs G. Molecular differential pathology of renal cell tumours. *Histopathology* 1993; 22:1-8.

Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, *et al.* The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol* 1997;183:131-3.

Kundu SD, Kim IY, Zelner D, *et al.* Absence of expression of transforming growth factor-beta type II receptor is associated with an aggressive growth pattern in a murine renal carcinoma cell line, Renca. *J Urol* 1998; 160:1883-8.

Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Neoplasia. In: Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, editors. *Robbins Basic Pathology*, 7th Edition. Philadelphia: W. B. Saunders Company 2003: 165-210.

Lammie GA, Peters G. Chromosome 11q13 abnormalities in human cancer. *Cancer cells* 1991; 3:413-20.

Licht MR, Novick AC. Nephron sparing surgery for renal cell carcinoma. *J Urol* 1993; 149:1-7.

Layfield LJ. Fine-needle aspiration biopsy of renal collecting duct carcinoma. *Diagn Cytopathol.* 1994;11:74-8.

Lin BT, Brynes RK, Gelb AB, *et al.* Cyclin D1 expression in renal carcinomas and oncocytomas: an immunohistochemical study. *Mod Pathol* 1998; 11:1075-81.

Lipworth L, Tarone RE, McLaughlin JK. The epidemiology of renal cell carcinoma. *J Urol* 2006;176:2353-8.

Liu L, Qian J, Singh H, Meiers I, *et al.* Immunohistochemical analysis of chromophobe renal cell carcinoma, renal oncocytoma, and clear cell carcinoma: an optimal and practical panel for differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2007; 131:1290-7.

Ljungberg B, Stenling R, Roos G. Flow cytometric DNA analysis of renal-cell carcinoma. A study of fine needle aspiration biopsies in comparison with multiple surgical samples. *Anal Quant Cytol Histol.* 1987; 9:505-8.

Merino MJ, Eccles DM, Linehan WM, *et al.* Familial renal cell carcinoma. *In:* Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, editors. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: IARC Press 2004: 15-22.

McLaughlin JK, Lindblad P, Mellemegaard A, *et al.* International renal-cell cancer study. I. Tobacco use. *Int J Cancer* 1995; 60:194-8.

McLaughlin JK, Lipworth L. Epidemiologic aspects of renal cell cancer. *Semin Oncol* 2000; 27:115-23.

Mickisch GH, Garin A, Van Poppel H, de Prijck L, Sylvester R. Radical nephrectomy plus interferon-alfa-based immunotherapy compared with interferon alfa alone in metastatic renal-cell carcinoma: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:966-70.

Mitelman F, Heim S. Quantitative acute leukemia cytogenetics. *Genes Chromosomes Cancer* 1992; 5:57-66.

Moch H, Gasser T, Amin MB, *et al.* Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma: a Swiss experience with 588 tumors. *Cancer* 2000;89:604-14.

Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 1996;335:865-75.

Moyad MA. Review of potential risk factors for kidney (renal cell) cancer. *Semin Urol Oncol* 2001; 19:280-93.

Moyad MA. Obesity, interrelated mechanisms, and exposures and kidney cancer. *Semin Urol Oncol* 2001; 19:270-9.

Neuhaus C, Dijkhuizen T, van den BE, *et al.* Involvement of the chromosomal region 11q13 in renal oncocytoma: case report and literature review. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 94:95-8.

Neuzillet Y, Lechevallier E, Andre M, Daniel L, Coulange C. Accuracy and clinical role of fine needle percutaneous biopsy with computerized tomography guidance of small (less than 4.0 cm) renal masses. *J Urol* 2004; 171:1802-5.

Nguyen GK, Amy RW, Tsang S. Fine needle aspiration biopsy cytology of renal oncocytoma. *Acta Cytol.* 1985; 29:33-6.

Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* 2004;9:361-77.

Pan CC, Chen PC. A distinct expression pattern and point mutation of c-KIT in papillary renal cell carcinomas. *Mod Pathol* 2004; 17:1440-1.

Park M. Oncogenes. *In*: Volgestein B, Kinzler KW, editors. *The Genetics Basis of Human Cancer*, 2nd Edition. New York: McGraw-Hill 2002: 177-196.

Parker AS, Cerhan JR, Janney CA, Lynch CF, Cantor KP. Smoking cessation and renal cell carcinoma. *Ann Epidemiol* 2003; 13:245-51.

Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N, *et al.* Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience. *J Clin Oncol* 2005; 23:2763-71.

Presti JC, Jr., Rao PH, Chen Q, *et al.* Histopathological, cytogenetic, and molecular characterization of renal cortical tumors. *Cancer Res* 1991; 51:1544-52.

Presti JC, Jr., Moch H, Reuter VE, Huynh D, Waldman FM. Comparative genomic hybridization for genetic analysis of renal oncocytomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 17:199-204.

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.

Ramp U, Jaquet K, Reinecke P, *et al.* Acquisition of TGF-beta 1 resistance: an important progression factor in human renal cell carcinoma. *Lab Invest* 1997; 76:739-49.

Receveur AO, Couturier J, Molinie V, *et al.* Characterization of quantitative chromosomal abnormalities in renal cell carcinomas by interphase four-color fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;158:110-8.

Renshaw AA, Lee KR, Madge R, Granter SR. Accuracy of fine needle aspiration in distinguishing subtypes of renal cell carcinoma. *Acta Cytol* 1997;41:987-94.

Reuter VE, Davis CJ, Moch H. Oncocytoma *In:* Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, editors. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: IARC Press 2004: 42-43.

Reutzel D, Mende M, Naumann S, *et al.* Genomic imbalances in 61 renal cancers from the proximal tubulus detected by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 2001; 93:221-7.

Salama ME, Worsham MJ, DePeralta-Venturina M. Malignant papillary renal tumors with extensive clear cell change: a molecular analysis by microsatellite analysis and fluorescence in situ hybridization. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127:1176-81.

Schmidt L, Junker K, Nakaigawa N, *et al.* Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene* 1999; 18:2343-50.

Sinke RJ, Dijkhuizen T, Janssen B, *et al.* Fine mapping of the human renal oncocytoma-associated translocation (5;11)(q35;q13) breakpoint. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 96:95-101.

Soller MJ, Kullendorff CM, Bekassy AN, Alumets J, Mertens F. Cytogenetic findings in pediatric renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; 173:75-80.

Speicher MR, Schoell B, du MS, *et al.* 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; 145:356-64.

Srigley JR, Moch H. Carcinoma of the collecting ducts of Bellini. *In:* Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, editors. *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs.* Lyon: IARC Press 2004: 33-34.

Storkel S, Martignoni G, van den Berg E. Chromophobe renal cell carcinoma. *In:* Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, editors. *World Health Organization Classification*

of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: IARC Press 2004: 30-32.

Teixeira MR, Pandis N, Bardi G, Andersen JA, Heim S. Karyotypic comparisons of multiple tumorous and macroscopically normal surrounding tissue samples from patients with breast cancer. *Cancer Res* 1996;56:855-9.

Teixeira MR, Tsarouha H, Kraggerud SM, *et al.* Evaluation of breast cancer polyclonality by combined chromosome banding and comparative genomic hybridization analysis. *Neoplasia* 2001;3:204-14.

Teixeira MR. Combined classical and molecular cytogenetic analysis of cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38:1580-4.

Teixeira MR, Heim S. Multiple numerical chromosome aberrations in cancer: what are their causes and what are their consequences? *Semin Cancer Biol* 2005; 15:3-12.

Teixeira MR. Recurrent fusion oncogenes in carcinomas. *Crit Rev Oncog* 2006; 12:257-71.

Thoenes W, Storkel S, Rumpelt HJ, *et al.* Chromophobe cell renal carcinoma and its variants--a report on 32 cases. *J Pathol* 1988; 155:277-87.

Tickoo SK, Lee MW, Eble JN, *et al.* Ultrastructural observations on mitochondria and microvesicles in renal oncocytoma, chromophobe renal cell carcinoma, and eosinophilic

variant of conventional (clear cell) renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2000; 24:1247-56.

Truong LD, Todd TD, Dhurandhar B, Ramzy I. Fine-needle aspiration of renal masses in adults: analysis of results and diagnostic problems in 108 cases. *Diagn Cytopathol* 1999; 20:339-49.

van den BA, Dijkhuizen T, Draaijers TG, *et al.* Analysis of multiple renal cell adenomas and carcinomas suggests allelic loss at 3p21 to be a prerequisite for malignant development. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 19:228-32.

Volpe A, Kachura JR, Geddie WR, *et al.* Techniques, safety and accuracy of sampling of renal tumors by fine needle aspiration and core biopsy. *J Urol* 2007; 178:379-86.

Walter TA, Pennington RD, Decker HJ *et al.* Translocation t(9;11)(p23;q12): a primary chromosomal change in renal oncocytoma. *J Urol.* 1989;142(1):117-9.

Wang L, Darling J, Zhang JS, *et al.* Loss of expression of the DRR 1 gene at chromosomal segment 3p21.1 in renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 27:1-10.

Wolf JS Jr. Evaluation and management of solid and cystic renal masses. *J Urol.* 1998; 159:1120-33.

Wood BJ, Khan MA, McGovern F, *et al.* Imaging guided biopsy of renal masses: indications, accuracy and impact on clinical management. *J Urol.* 1999; 161:1470-4.

Wunderlich H, Hindermann W, Al Mustafa AM, *et al.* The accuracy of 250 fine needle biopsies of renal tumors. *J Urol.* 2005; 174:44-6.

Yagoda A, Abi-Rached B, Petrylak D. Chemotherapy for advanced renal-cell carcinoma: 1983-1993. *Semin Oncol* 1995; 22:42-60.

Yang ZQ, Yoshida MA, Fukuda Y, *et al.* 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; 91:156-63.