

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE PTEN E DA
PROTEÍNA Akt ASSOCIADA A FATORES CLÍNICOS E
ANATOMOPATOLÓGICOS COMO PROGNÓSTICOS
NO CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS**

EURICO CLETO RIBEIRO DE CAMPOS

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de mestre.**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Profº Dr. Ademar Lopes

Co-Orientador: Profº Dr. Fernando Augusto Soares

São Paulo

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Campos, Eurico Cleto Ribeiro de

Análise da expressão do gene PTEN e da proteína Akt associada a fatores clínicos e anatomopatológicos como prognósticos no carcinoma de células renais / Eurico Cleto Ribeiro de Campos -- São Paulo, 2007.

99p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Ademar Lopes

Descritores: 1. CÂNCER RENAL. 2. EXPRESSÃO GÊNICA. 3. PROGNÓSTICO. 4. IMUNOHISTOQUÍMICA. 5. ESTADIAMENTO DO CÂNCER.

DEDICATÓRIA

Ao árduo esforço de meus pais em oferecerem as melhores condições para que eu chegasse até aqui.

A meu irmão Julio, por seu apoio constante e sua presença nos momentos mais difíceis.

A meus avós, pelos exemplos de simplicidade, integridade e união familiar.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ademar Lopes, Diretor do Departamento de Cirurgia Pélvica, por confiar no projeto desde o início, por sua amizade e todos os ensinamentos teóricos e práticos alcançados durante residência médica e pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, pela orientação na elaboração do projeto e durante sua realização.

Ao Dr. Stênio de Cássio Zequi, pelo apoio, amizade e incentivo na elaboração e concretização deste projeto.

Ao Dr Gustavo Cardoso Guimarães, por sua amizade, seriedade e ajuda nos momentos mais difíceis da residência médica.

À Dra. Maria do Rosário Dias Oliveira Latorre, pelas orientações metodológicas e colaboração na interpretação dos resultados.

Ao Prof. Dr. João Carlos Simões, por acreditar em minha capacidade profissional desde a graduação médica.

À Dra Isabela Werneck, pela presteza na realização das reações imunoistoquímicas e compreensão dos dados obtidos.

A Christiane Costa Calciolari, por compreender com muita paciência a necessidade das inúmeras horas de estudo e por sua dedicação a vida pessoal o que nos mantém cada vez mais unidos.

Ao Prof. Dr. Abrão Rapoport, pelo incentivo ao ingresso no curso de pós-graduação do Hospital Heliópolis e Hospital A.C. Camargo.

Ao Prof. Dr. Francisco Paulo da Fonseca e ao Dr. Wilson Bachega, pela dedicação ao ensino dos médicos residentes dentro do departamento de cirurgia pélvica.

Às Sras. Rosinéia Aguiar Carneiro, Francyne Pólen Gomes de Lima e, em especial, à Sra. Suely Francisco, à minha admiração por estarem sempre dispostas em ajudar a todos com muita atenção e carinho.

À Sra. Marfiza Leffer, por ser uma pessoa muito querida, humilde e dedicada à família.

A todos os funcionários do Hospital A.C. Camargo, que me trataram com muito carinho e respeito durante a residência médica e pós-graduação.

Ao Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do Hospital A.C. Camargo, pela disponibilidade e sempre pronto atendimento às solicitações durante o período de coleta dos dados.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo financiamento deste projeto, sem o qual não teria sido possível.

RESUMO

Campos ECR. **Análise da expressão do gene PTEN e da proteína Akt associada a fatores clínicos e anatomopatológicos como prognósticos no carcinoma de células renais.** São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

OBJETIVOS: Avaliar através de imunoistoquímica e reação de hibridização *in situ* do PTEN e da proteína Akt, a influência destes marcadores moleculares nas taxas de sobrevida livre de doença (SLD) e global (SG), assim como, avaliar a concordância entre os achados da reação de hibridização *in situ* (FISH) do PTEN com os obtidos da imunoistoquímica, correlacionar às expressões imunoistoquímicas entre as proteínas Akt e PTEN e determinar os fatores clínicos e anatomopatológicos mais significativos nas taxas de sobrevida. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram estudados 110 pacientes portadores de carcinoma de células renais e submetidos a tratamento cirúrgico do tumor primário. Dados epidemiológicos, clínicos, anatomopatológicos, de estadiamento (TNM 2004) e os obtidos das reações de hibridização e imunoistoquímica foram correlacionados entre si e com as sobrevidas global e livre de doença. As amostras foram analisadas através de *tissue microarray*. **RESULTADOS:** o seguimento médio foi de 41,95 meses. Foram fatores independentes para a sobrevida global em 5 anos: sintomatologia ao diagnóstico, performance status (Karnofski e Ecog), estadiamento clínico IV, recorrência tumoral e alto grau de Fuhrman ($p<0,05$). A sobrevida livre de doença em 5 anos foi influenciada unicamente pelos estádios clínicos II e III, no modelo múltiplo ($p<0,05$). Os resultados obtidos da reação de hibridização *in situ* não foram significativos nas sobrevidas global ($p=0,486$) e livre de doença ($p=0,344$). Predominou a hipoexpressão do PTEN a IIQ (88,2%), mas sem significância estatística nas sobrevidas global ($p=0,816$) e livre de doença ($p=0,272$) em 5 anos. Embora não tenham sido significantes as taxas de sobrevida livre de doença, os pacientes com expressão positiva para o PTEN não tiveram recorrência tumoral. Houve concordância baixa e não significativa entre reação de hibridização e

imunoistoquímica para o PTEN (Kappa=0,146; p=0,235). A proteína Akt esteve hiperexpressa em 33 pacientes (40%), enquanto em 77 (60%) predominou a hipoexpressão. Não houve diferenças significativas nas sobrevidas global (p=0,934) e livre de doença (p=0,705) em 5 anos entre os pacientes com proteína Akt hiper ou hipoexpressas. Não houve associação entre os casos positivos a IIQ para o Akt e negativos para o PTEN a IIQ (OR=0,169, p=0,235). A SLD e a SG em 5 anos foram, respectivamente, de 74,8% e 76,8%. **CONCLUSÕES:** Os fatores prognósticos habituais foram significativos para as sobrevidas global e livre de doença. A presença de deleção do PTEN à hibridização ou a hipoexpressão à imunoistoquímica não influenciaram as sobrevidas livre de doença e global. Houve concordância baixa e não significativa entre os métodos de hibridização e IIQ, para o PTEN. A hiperexpressão da proteína Akt não influenciou as taxas de sobrevida global e livre de doença, assim como não houve associação com a hipoexpressão imunoistoquímica do PTEN.

SUMMARY

Campos ECR. [Analysis of PTEN/MMCA1 gene and Akt protein associated to clinical and anatomopathologic features as prognostic factors in renal cell carcinoma patients]. São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

OBJECTIVES: this study was designed to evaluate the hybridization in situ reaction and immunohistochemical expression of PTEN and Akt protein, looking to the influence of those on disease free survival (DFS) and global survival (GS) such as the concurrence between the results found in hybridization and immunohistochemical reactions for PTEN, the correlation between the Akt and PTEN immunohistochemical reactions and the most significant clinical and anatomopathologic factors on survivals. **MATERIAL AND METHODS:** It were analysed 110 patients with renal cell carcinoma (RCC) submitted to surgical resection of primary neoplasm. Epidemiologic factors, clinical factors, anatomopathologic factors, TNM stage and hybridization in situ and immunohistochemical results were correlated to survivals. The reactions were analysed in a tissue microarray with the 110 cases. **RESULTS:** The mean follow-up was 41,95 months. The overall survival was influenced on multivariate analysis by: symptoms at the diagnosis, performance status (karnofski and Ecog), clinical tumor stage IV, tumor recurrence and high Fuhrman grade ($p<0,05$). The disease free survival was only influenced by clinical tumor stage II and III on multivariate analysis ($p<0,05$). The results from hybridization in situ reaction did not influence the OS ($p=0,486$) and DFS ($p=0,344$). The majority of patients showed hipoexpression on immunohistochemical reaction (88,2%), but it were not significant on global survival ($p=0,816$) and disease free survival ($p=0,273$). Despite of the immunohistochemical results didn't showed significantly on survival, patients with positive PTEN expression had not tumor recurrence during the follow-up. There was a low concurrence and not significant association between PTEN hybridization and PTEN immunohistochemistry (Kappa=0,146, $p=0,235$). There were no statistical

differences on GS ($p=0,934$) and DFS ($p=0,705$) according to imunohistoquemistry for phosphorilated Akt protein expression. The Akt overexpression did not correlated to the PTEN low expression ($OR=0,169$, $p=0,235$). The DFS and GS were respectively 74,8% and 76,8%. **CONCLUSION:** the habitual renal prognostic factors were significant on survivals. PTEN deletion at hybridization situ reaction or PTEN and Akt immunohistochemistry analysis did not influence the GS and DFS. A low concurrence and not statically significant was observed between PTEN hybridization and its imunohistoquimestry. Akt overexpression did not correlate to the PTEN low expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo de ação do PTEN através de “down regulation” do PI3K que estimula positivamente a proteína Akt	5
Figura 2	Demonstração da sonda utilizada à reação de hibridização para a marcação do PTEN	16
Figura 3	Demonstração de deleção hemizigótica do gene PTEN por hibridização in situ.	37
Figura 4	Demonstração de trissomia pela técnica de FISH	38
Figura 5	Demonstração de reação de hibridização normal para o PTEN	39
Figura 6	Curva de sobrevida livre de doença de acordo com o estadiamento clínico TNM.	47
Figura 7	Curva de sobrevida global de acordo conforme a presença e ausência de deleção à hibridização.	57
Figura 8	Curva de sobrevida global em análise multivariada de acordo com sintomatologia ao diagnóstico	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número e porcentagem de pacientes segundo os dados epidemiológicos.	29
Tabela 2	Número e porcentagem de pacientes segundo os dados clínicos.	31
Tabela 3	Número e porcentagem de pacientes segundo os dados anatomopatológicos macroscópicos do tumor.	32
Tabela 4	Número e porcentagem de pacientes segundo os dados anatomopatológicos microscópicos do tumor.	34
Tabela 5	Número e porcentagem de pacientes de acordo com o estadiamento TNM (2004).	35
Tabela 6	Resultados das reações imunoistoquímicas do PTEN e proteína Akt.	36
Tabela 7	Resultados da reação de hibridização in situ.	39
Tabela 8	Taxas de sobrevida livre de doença em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, segundo os dados epidemiológicos.	42
Tabela 9	Taxas de sobrevida livre de doença em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, segundo os dados clínicos.	43
Tabela 10	Taxas de sobrevida livre de doença em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier segundo os dados anatomopatológicos macroscópicos.	44
Tabela 11	Taxas de sobrevida livre de doença em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier segundo os dados anatomopatológicos microscópicos.	45
Tabela 12	Taxas de sobrevida livre de doença em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, segundo os estadiamentos.	46
Tabela 13	Taxas de sobrevida livre de doença em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, conforme a expressão imunoistoquímica do PTEN e Akt.	48
Tabela 14	Taxas de sobrevida livre de doença em 5 anos pelo método de	48

Kaplan-Meier, conforme a presença e ausência de deleção à hibridização.

Tabela 15	Taxas de sobrevida global em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, segundo os dados epidemiológicos.	50
Tabela 16	Taxas de sobrevida global em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, segundo os dados clínicos.	51
Tabela 17	Taxas de sobrevida global em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, segundo os dados anatomopatológicos macroscópicos.	53
Tabela 18	Taxas de sobrevida global em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, segundo os dados anatomopatológicos microscópicos .	54
Tabela 19	Taxas de sobrevida global em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, segundo os estadiamentos.	55
Tabela 20	Taxas de sobrevida global em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, conforme a expressão imunoistoquímica do PTEN e Akt.	56
Tabela 21	Taxas de sobrevida global em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, conforme a presença e ausência de deleção à hibridização.	56
Tabela 22	Sobrevida livre de doença em 5 anos de acordo com o modelo múltiplo.	58
Tabela 23	Sobrevida global em 5 anos de acordo com o modelo múltiplo.	59

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	protein kinase B
CCR	carcinoma de células renais
ECOG	Eastern Cooperative Oncologic Group
Enos	endothelial nitric oxide synthase
FISH	fluorescence in situ hybridization
HIF	hypoxia-inducible factor
IIQ	imunoistoquímica
IRA	insuficiência renal aguda
IRC	insuficiência renal crônica
PTEN	phosphatase with tensin homology deleted in chromosome 10
PI3K	phosphatidylinositol 3-OH kinase
PI-3,4,5-P3	phosphatidyl 3,4,5 – triphosphatase
PS	performance status
RTQ	receptor tirosino quinase
SG	sobrevida global
SLD	sobrevida livre de doença
TMA	tissue microarray
VHL	von-Hipell Lindau
UICC	International Union Against Cancer

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Gene PTEN e Proteína Akt	3
2	OBJETIVOS	9
3	MÉTODOS	10
3.1	Casuística	10
3.2	Metodologia	10
3.3	Variáveis do estudo	18
3.3.1	Dados epidemiológicos	18
3.3.2	Dados clínicos	19
3.2.2	TMA (<i>Tissue microarray</i>)	12
3.2.3	Protocolo de Acompanhamento	17
3.3.3	Dados anatomopatológicos	21
3.3.4	Estadiamento	24
3.3.5	Situação clínica ao final do estudo	24
3.3.6	Sobrevida livre de doença	25
3.3.7	Sobrevida global	25
3.4	Análise estatística	26
3.5	Aspectos éticos	27
4	RESULTADOS	28
4.1	Dados epidemiológicos	28
4.2	Dados clínicos	30
4.3	Dados anatomopatológicos	32
4.4	Estadiamento	35
4.5	Expressão imunoistoquímica do gene PTEN e da proteína AKT	36
4.6	Hibridização in situ	37

4.7	Análise da concordância entre a expressão imunoistoquímica e reação de hibridização para o PTE	40
4.8	Análise da associação imunoistoquímica entre o Akt fosforilado e o gene PTEN	40
4.9	Situação clínica ao final do estudo	41
4.10	Análise da sobrevida livre de doença	41
4.10.1	Dados epidemiológicos	41
4.10.2	Dados clínicos	42
4.10.3	Dados anatomopatológicos	43
4.10.4	Estadiamento	45
4.10.5	Imunoistoquímica e Hibridização <i>in situ</i> (FISH)	47
4.11	Análise da sobrevida global	49
4.11.1	Dados epidemiológicos	49
4.11.2	Dados clínicos	50
4.11.3	Dados anatomopatológicos	52
4.11.4	Estadiamento	55
4.11.5	Análise imunoistoquímica PTEN e AKT e reação de hibridização <i>in situ</i>	55
4.12	Análise pelo modelo de Cox	57
4.12.1	Sobrevida livre de doença	57
4.12.2	Sobrevida global	58
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÃO	
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

ANEXOS

Anexo 1	Formulário de coleta de dados
Anexo 2	<i>Performance status</i>
Anexo 3	Estadiamento TNM 2004 e Estádio de Robson

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de células renais (CCR) corresponde a 3% das neoplasias em pacientes adultos. Entre as neoplasias urológicas é a terceira mais freqüente, porém, é a primeira em mortalidade. Para o ano de 2006, são esperados 38.890 novos casos de carcinoma de células renais nos Estados Unidos da América (EUA) com cerca de 12.840 mortes, configurando entre as dez neoplasias mais freqüentes. Sua incidência varia de 4,4 a 11,1 por 100 mil indivíduos/ano (GODLEY e ATAGA 2000).

Apesar do aumento no diagnóstico de tumores renais cada vez menores e assintomáticos, cerca de 30% dos pacientes apresentam metástases ao diagnóstico e outros 30% a 50% dos pacientes irão desenvolver metástases durante o curso da doença, mesmo aqueles portadores de doença localizada. Não há um tratamento eficaz para o CCR recorrente ou metastático, o que torna a sobrevida desses pacientes inferior a 10% em cinco anos (KIRKALI e OBEK 2003; LIPWORTH et al. 2006).

O tratamento padrão é a nefrectomia radical que consiste na remoção do rim envolto pela gordura perirrenal, glândula supra-renal e linfonodos do hilo renal. A nefrectomia parcial está indicada para tumores de até quatro centímetros e em casos selecionados até sete centímetros (BARBALIAS et al. 1999). Recentemente, outros procedimentos poupadores de néfrons, principalmente a crioterapia e radiofreqüência, foram incorporados no manejo do CCR no tratamento dos pacientes portadores de nefropatias ou CCR hereditário como na moléstia de VHL

(MOURAVIEV et al. 2007). Radioterapia e quimioterapia são ineficazes e a imunoterapia não tem produzido taxas de resposta superiores a 20%.

O CCR compreende um conjunto de neoplasias heterogêneas e de evolução incerta. Os principais fatores prognósticos reconhecidos e determinantes do tratamento, evolução e sobrevida dos pacientes são: estadiamento clínico patológico, grau histológico (Fuhrman), PS (*performance-status*) e, em alguns estudos o subtipo histológico (UNO et al. 2004; LAM et al. 2005; LAM et al. 2007). Apesar da identificação de fatores prognósticos no CCR, tumores com mesmo estadiamento, tratamento e subtipo histológico apresentam evoluções distintas.

Os procedimentos em biologia molecular têm complementado o estadiamento clínico-patológico com a identificação de diferentes genes e proteínas com potencial prognóstico e que sejam capazes de melhor avaliar os pacientes quanto ao risco de progressão ou morte pela doença e identificar aqueles que possam ter melhor resposta a tratamentos baseados nas alterações moleculares presentes (STAKES e ILIOPOULOS 2004; GARCIA e RINI 2007).

LAM et al. (2005) incorporaram os marcadores moleculares a nomogramas, além dos fatores prognósticos já conhecidos, para melhor estratificar os pacientes quanto a maior ou menor risco de recorrência tumoral e aparecimento de metástases, criando um sistema de estadiamento chamado de integrado que combina o estadiamento clínico-patológico aos marcadores moleculares.

Entre os principais marcadores moleculares analisados no CCR, destacam-se aqueles relacionados à proliferação celular (Ki-67, MIB-1), controle do ciclo celular (p53, Akt, Bcl-2, PTEN, p27, p21), adesão celular (E-caderina, EpCAM, caderina-6),

hipóxia (CA IX, HIF, VEGF) e mistos (vimentina, CD 44, gelsolina e VEGFR) (LAM et al. 2005).

1.1 GENE PTEN E PROTEÍNA Akt

O gene PTEN tem sido estudado como fator prognóstico em diferentes neoplasias como: glioblastoma multiforme (SAKURADA et al. 1997), bexiga (CAIRNS et al. 1998), próstata (YOSHIMOTO et al. 2006), rim (GESK et al. 2000, KONDO et al. 2001; SUKOSD et al. 2001), mama, pulmão (SAKURADA 1997) e endométrio (OSAKI e OSCHIMURA 2004).

Na carcinogênese renal, o PTEN (*phosphatase with tensin homology deleted in chromosome 10*) e a proteína Akt são duas das principais vias estudadas (LEE et al. 2003; HORIGUCHI et al. 2003; HARA et al. 2005). Alterações genéticas ou epigenéticas do PTEN, ou a presença de hipoexpressão imunoistoquímica, têm sido associadas a pior prognóstico (PRESTI et al. 1996; HORIGUCHI et al. 2003; HARA et al. 2005; KIM et al. 2005).

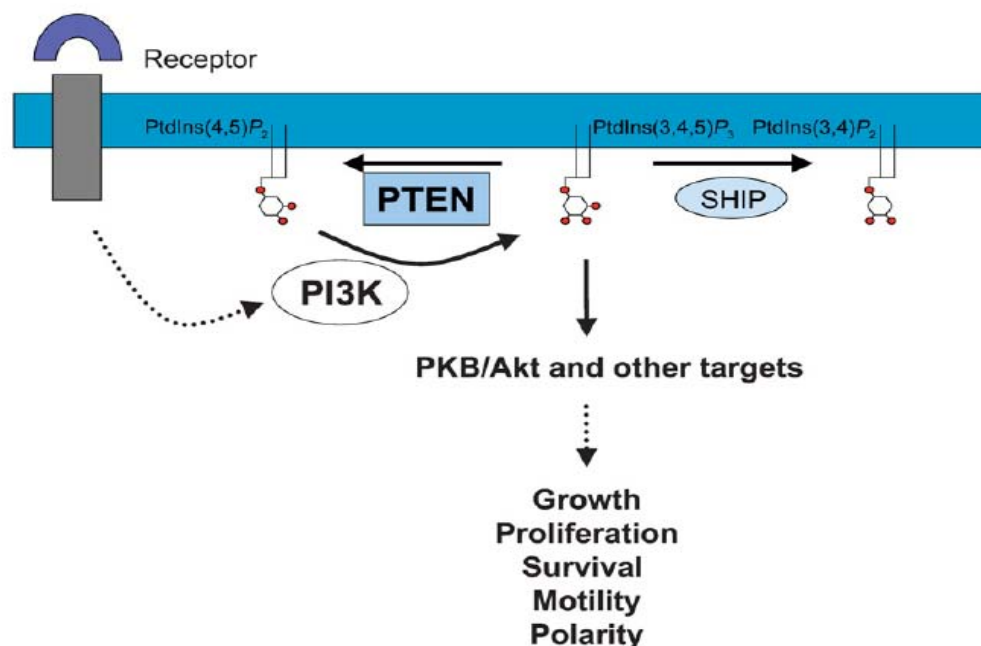
O gene PTEN pode ser inativado por mutação, deleção ou hipermetilação em diferentes neoplasias sólidas, como: carcinoma do endométrio, próstata, tireóide, mama, ovário e outros tumores esporádicos. Alterações germinativas podem determinar síndromes associadas a neoplasias (KONDO et al. 2001; OSAKI et al. 2004; HARA et al. 2005; PUC et al. 2005).

Esse gene, também conhecido como MMAC1 (*mutated in multiple advanced cancer*) ou TEP 1 (*TGFb regulated and epithelial cell enriched phosphatase*), está localizado no cromossomo 10q23. É responsável pelo controle da migração,

proliferação e apoptose celular e é capaz de modificar outras proteínas e moléculas de lipídios pela remoção do grupo fosfato. Atua como um gene supressor tumoral e, por esta ação de defosforilação, é considerado uma enzima fosfatase (ZYSMAN et al. 2002; VISAPAA et al. 2003; KIM et al. 2005; MEILI et al. 2005; GERICKE et al. 2006). Através da proteína tensina, mantém o esqueleto intracelular em contato com meio externo (PALLARES et al. 2005).

O PTEN age por um mecanismo de "down regulation" do PI3K (*phosphatidylinositol 3-OH kinase*) e de seu produto, o PI-3,4,5-P3 (*phosphatidyl 3,4,5 – triphosphatase*) que são importantes no estímulo da proliferação e sobrevivência celular, principalmente nas células que estão sob estímulo de fatores de crescimento como produtos de oncogenes e citocinas de efeito parácrino (HORIGUCHI et al. 2003; OSAKI et al. 2004; SAMUELS et al. 2006). A ligação do PI3K na membrana plasmática ocorre através de receptores de membrana tipo tirosino-quinases (RTQ) (LUO et al. 2003; SANSAL et al. 2004; WYMANN et al. 2005).

Os RTQ promovem a fosforilação e ativação do PI3K para a formação de seu segundo mensageiro PI-3,4,5-P3(PIP3) (SAMUELS et al. 2006; GERICKE et al. 2006). O PIP3 ativa outra proteína efetora/sinalizadora do ciclo celular a proteína quinase B, também chamada Akt (LUO et al. 2003; BADER et al. 2005; LAM et al. 2005).



Fonte: LESLIE e DOWNES (2004).

Figura 1 - Mecanismo de ação do gene PTEN por “down regulation” do PI3K que estimula positivamente a proteína Akt.

O Akt pertence à família das tirosino-quinases e age principalmente, na proliferação celular, e tornando a célula resistente à apoptose. Essa proteína é deslocada para a membrana plasmática celular, quando se liga às moléculas lipídicas e sofre a fosforilação, resultando na formação de PDK1 e PDK2, suas formas ativadas (HORIGUCHI et al. 2003; OSAKI e OSHIMURA 2004). A proteína Akt interage com o PI(3,4,5)P₃ na membrana plasmática através do domínio PH (*plekstrin homology*). O domínio PH, é formado por proteínas globulares, constituídas por 100 aminoácidos e presentes em diversas proteínas, incluindo o PDK1 e Akt (OSAKI e OSHIMURA 2004). A interação Akt-PI(3,4,5)P₃, ocasiona a alteração conformacional do Akt, expondo os dois sítios de fosforilação Thr 308 e Ser 474 à porção reguladora C-terminal. A fosforilação do Thr 308 é fundamental para sua ativação (HILL e HEMMINGS 2002).

Além do controle da proliferação celular, o complexo PI3K-Akt estimula a angiogênese, a motilidade, a glicólise e o crescimento celular (LUO et al. 2003; SANSAL et al. 2004). A atividade angiogênica pode estar relacionada à ativação constante do HIF-1 (*hypoxia inducible factor*) e da Enos (*endothelial nitric oxide synthase*) (LUO et al. 2003).

A função da proteína Akt em estimular a proliferação celular é decorrente da ação sobre a proteína GSK-3 (*glycogen synthase kinase-3*) de moléculas transportadoras de glicose como GLUT4, CDK (*ciclin dependent kinases*), proteína m-TOR e TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*) (OSAKI e OSHIMURA 2004).

O Akt inibe a atividade da molécula GSK3, prevenindo a fosforilação da β -catenina, impedindo a sua degradação e deslocando-a para o núcleo. No núcleo, a β -catenina combina-se com fatores de transcrição, promovendo a expressão de diferentes genes como a ciclina D1 que regula o ciclo celular e promove a fosforilação do gene RB, inativando-o (CROSS et al. 1995). A proteína Akt também fosforila as proteínas p21 e p27, bloqueando suas atividades antiproliferativas (CROSS et al. 1995).

O Akt aumenta a síntese protéica por promover a fosforilação da proteína m-Tor, que uma vez ativada ocasiona a transdução da ciclina D (LUO et al. 2003) O complexo esclerose tuberosa 2 (TSC2) também é fosforilado pelo Akt, não ocorrendo a formação de tuberina, o que inibe a atividade supressora tumoral do gene TSC2. Não há formação de um complexo protéico com o TSC1, que juntos inibem a ativação de moléculas promotoras da transdução protéica (OSAKI e OSHIMURA 2004).

A resistência à apoptose é resultante da fosforilação de moléculas que atuam diretamente ou indiretamente no processo apoptótico, como a fosforilação da proteína pró-apoptótica Bad (OSAKI e OSHIMURA 2004). A proteína Akt regula indiretamente a atividade supressora da p53, por promover a fosforilação da proteína Mdm2 (*murine doublé 2 minute*), que desestabiliza a p53, promovendo sua degradação e prejudicando a resposta da célula ao dano celular (LUO et al. 2003).

Em certos tumores como câncer de endométrio e ovário, a ativação constante da proteína Akt deve-se as alterações genéticas presentes no gene PTEN, como mutação ou deleção, resultando em ativação constante do PI3K/Akt mesmo na ausência de qualquer estímulo exógeno, podendo-se iniciar o processo carcinogênico. Por outro lado, o Akt pode estar hiperfosforilado, provocando um desequilíbrio no processo de apoptose e proliferação. No CCR, o mecanismo de ativação do Akt permanece incerto (OSAKI e OSHIMURA 2004).

Diferentes estudos em neoplasia renal têm demonstrado o potencial prognóstico do PTEN ou da proteína Akt quando analisados pelos seguintes métodos: imunoistoquímica, hibridização in situ, cDNA microarrays ou Western blot (MORITA et al. 1991; PRESTI et al. 1996; TENG et al. 1997; TAKAHASHI et al. 2001; HORIGUCHI et al. 2003; LEE et al. 2003; LIOU et al. 2004).

A técnica do TMA (*Tissue microarray*) permite estudar simultaneamente a expressão protéica a partir de milhares de amostras teciduais, assim também como analisar por meio de técnicas mais recentes, o DNA e RNA (NOCITO et al. 2001). Análises morfológicas e moleculares através de imunoistoquímica ou reação de hibridização in situ são realizadas para se identificar a significância dos vários marcadores testados quanto a possível envolvimento na progressão tumoral,

recorrência, resposta à terapêutica e valor preditivo/prognóstico (CAMP et al. 2000; KALLIONIEMI et al 2001; RIMM et al. 2001; SHERGILL et al. 2006). Para garantir uma representação mais adequada do tecido a ser analisado e considerando a existência de tumores muito heterogêneos, pelo menos duas amostras de cada tecido devem ser obtidas (MERSEBURGER et al. 2006). Segundo CAMP et al. (2000), HARA et al. (2005) e SHERGILL et al. (2006), o TMA tem valor prognóstico similar às técnicas habituais.

HARA et al. (2005) foram os primeiros autores a avaliar simultaneamente a proteína Akt e o gene PTEN no carcinoma de células renais, através da técnica de Western Blot. Até o momento, não foram encontrados estudos que analisassem simultaneamente no carcinoma de células renais o PTEN através de imunoistoquímica e hibridização *in situ*, comparando se a baixa expressão IIQ do PTEN está associada à presença de deleção à hibridização, como também, o grau de associação da hiperexpressão a IIQ da proteína Akt à hipoexpressão imunoistoquímica do PTEN.

Para avaliar a significância das análises moleculares, o gene e a proteína em questão serão correlacionados entre si, e serão determinadas as sobrevidas global e livre de doença, assim como, os fatores clínicos e anatomopatológicos tradicionalmente utilizados na definição do prognóstico de pacientes portadores de CCR.

2 OBJETIVOS

Em pacientes portadores de carcinoma de células renais metastáticos ou não ao diagnóstico e submetidos a tratamento cirúrgico da neoplasia renal, pretende-se:

1. Avaliar a concordância entre os métodos de hibridização *in situ* e imunoistoquímica quanto a alterações presentes no PTEN, assim como, avaliar a associação imunoistoquímica entre as proteínas PTEN e Akt.
2. Avaliar a influência dos fatores clínicos e anatomopatológicos, tradicionalmente utilizados na definição do prognóstico de pacientes portadores de carcinoma de células renais, nas taxas de sobrevida global e livre de doença.
3. Avaliar a influência das alterações do gene PTEN presentes à reação de hibridização *in situ* (FISH) nas taxas de sobrevida global e livre de doença.
4. Avaliar a influência das expressões imunoistoquímicas do gene PTEN e da proteína Akt, nas taxas de sobrevida global e livre de doença.

3 MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foram analisados 110 pacientes portadores de CCR comprovado histologicamente nos estádios T1 a T4, N1 a N2 e portadores ou não de metástase a distância ao diagnóstico, tratados exclusivamente no Hospital A.C. Camargo no período de 1980 a 2005. Todos os pacientes receberam tratamento cirúrgico da neoplasia renal que consistiu em nefrectomia radical ou parcial.

3.1.1 Critérios de exclusão

Os critérios estabelecidos para exclusão dos pacientes no estudo foram: 1) tratamento em outro serviço, 2) pacientes submetidos a outros tipos de tratamentos oncológicos (imunoterapia, quimioterapia, hormonioterapia, radioterapia), 3) material arquivado em parafina em más condições para elaboração do *tissue microarray* e 4) pacientes com comorbidades graves que limitassem sua expectativa de vida ou que tivessem outra neoplasia maligna em atividade.

3.2 METODOLOGIA

Os registros dos pacientes foram obtidos em arquivos nos departamentos de anatomia patológica e cirurgia pélvica. Os dados epidemiológicos, clínicos, relacionados ao tratamento, dados anatomopatológicos e as informações a respeito do

seguimento dos pacientes foram coletados em um formulário específico (Anexo 1) proveniente do Same (Serviço de Arquivo Médico e Estatístico) do Hospital A.C. Camargo.

3.2.1 Tipo de cirurgia realizada

Foram realizadas nefrectomias radicais ou parciais seguindo as seguintes técnicas cirúrgicas:

A Nefrectomia radical

Realizada através de acesso toraco-abdominal extrapleural ou transperitoneal mediante incisão subcostal ou laparotomia mediana e acesso extraperitoneal mediante lombotomia. A nefrectomia radical foi na maioria das vezes realizada seguindo a técnica idealizada por ROBSON et al. (1969) e constituiu na ligadura prévia da artéria renal e ressecção em bloco do rim, adrenal ipsilateral, ureter nos seus dois terços superiores além da gordura perirrenal, sendo todo o produto cirúrgico envolto pela cápsula de gerota. Nos casos de trombos murais venosos, foi realizada a ressecção de trombos em veia renal ou em veia cava inferior, podendo haver necessidade de ressecção associada de parede de veia cava inferior, com sua substituição ou não.

Procedeu-se, nesses casos, a linfadenectomia regional hilar renal. As ligaduras vasculares foram realizadas com fios inabsorvíveis, e a síntese da parede cirúrgica foi realizada com suturas de poligalactina 1 em sutura simples em cada um dos planos musculares.

B Nefrectomia parcial

Teve indicação nos casos de pacientes com rim único anatômico ou funcional, insuficiência renal, tumores renais bilaterais sincrônicos ou metacrônicos ou nos casos de tumores de tamanho inferior a 4,0 cm no maior diâmetro e com rim contralateral normal.

Promoveu-se dissecação cuidadosa do pedículo renal com clampeamento arterial, precedido por resfriamento renal, heparinização sistêmica com heparina 5000/UI endovenosa e infusão de 0,25 ml/Kg de peso e manitol a 20% na dose de 1ml/Kg. Procurou-se a ressecção do segmento renal acometido em conjunto com a gordura perirrenal adjacente, com margem de segurança de no mínimo um centímetro, comprovada por biópsia de congelação da margem renal remanescente.

Nos casos em que se procedeu à abertura das vias excretoras, realizou-se a rafia dessa abertura com suturas impermeáveis contínuas de poligalactina 3.0. Os pontos em “X” hemostáticos foram realizados com poligalactina 2.0 e 3.0. Nas suturas em ”u” de aproximação renal empregou-se catagute cromado 0. Em ambos os tipos de cirurgia, a drenagem foi feita por sucção usando-se drenos de Jackson-Pratt. Os drenos foram mantidos, em geral, até o terceiro dia pós-operatório nas nefrectomias radicais e até o sétimo dia de pós-operatório nas nefrectomias parciais.

3.2.2 TMA (*Tissue microarray*)

Os 110 tumores designados por seus números de registro de laudo anatomopatológico correspondentes, previamente selecionados e classificados, foram inclusos na construção de um bloco-receptor de parafina de TMA (Beecher Instruments, Silver Spring, MD), a partir de amostras colhidas do bloco-doador

original, com agulha de um milímetro de diâmetro (TMArrayer punch MP10-1,0 mm), após a prévia escolha e marcação de área representativa da neoplasia, a partir da lâmina de Hematoxilina Eosina (H.E.) original.

Consideramos todos os critérios morfocitológicos e quantitativos necessários, segundo a literatura, para o diagnóstico definitivo.

Foram realizados *punches* em duplicata (dois cores de cada caso) do bloco de parafina doador, no bloco de parafina receptor, contendo assim, duas áreas diferentes da neoplasia em cada caso. Efetuamos cortes histológicos de 3 a 4 μ de espessura do bloco de parafina receptor, até todo o seu desgaste, obtendo-se um total de 100 lâminas numeradas seqüencialmente a partir de “um”.

A Interpretação imunoistoquímica do PTEN e da proteína Akt

As reações imunoistoquímicas para PTEN e proteína Akt foram realizadas em duplicata nos cortes obtidos do bloco de TMA. A técnica contemplou a utilização do complexo estreptavidina-biotina-peoxidase (StreptABC, DAKO®), com um único protocolo de recuperação antigênica. As lâminas foram incubadas em solução de ácido cítrico 10mM pH6,0 em forno de microondas na potência máxima de 1300 watts, duas vezes, por nove minutos cada. Após o resfriamento por 20 minutos em temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas em água destilada. A seguir, promoveu-se o bloqueio da peroxidase endógena e imersão em solução salina tamponada com fosfatos (PBS).

Todas as lâminas foram incubadas com anticorpo primário diluído em título predeterminado estabelecido em PBS. Para a revelação, as lâminas foram incubadas em solução de substrato cromógeno, Diaminobenzina (DAB. Sigma®), sensível à luz

e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck®). Para detectar a expressão do PTEN, foi utilizado anticorpo da Cascade Bioscience *murine anti-human PTEN*, clone 6 H2.1, na diluição de 1:300. A análise da proteína Akt foi estudada a partir de dois anticorpos. Um deles designado para avaliar quantidade total de Akt da Santa Cruz Biotechnology, na diluição de 1:50. O outro anticorpo, proveniente da Upstate Biotechnology, avaliou o Akt fosforilado, clone Ser 473, na diluição de 1:50. Foram selecionados cortes histológicos de tecido tireoidiano como controle positivo para os anticorpos testados. O controle negativo foi realizado com a não utilização do anticorpo primário.

B Avaliação das amostras do TMA

A análise dos resultados foi feita em microscopia óptica comum. A confirmação da presença da neoplasia com o diagnóstico de carcinoma de células renais e sua classificação histológica no TMA foi considerada após o estudo das lâminas coradas com H.E. e nas lâminas de IIQ. Foi considerado como suficiente, um mínimo de 10% do diâmetro total de um caso contendo os critérios de elegibilidade de graus e padrões histológicos para o diagnóstico de carcinoma de células renais. Os seguintes subtipos histológicos foram observados: células claras, papilífero, cromóforo, gene TFE3, ductos coletores e subtipo inclassificável.

C Avaliação das reações imunoistoquímicas no TMA

A avaliação da imunoexpressão do PTEN e da proteína Akt fosforilada e total, foi baseada em um escore categorizado quanto à intensidade e frequência das reações. A intensidade foi classificada em: 0) negativo, 1) positivo fraco, 2) positivo

médio e 3) positivo forte. Para a definição da frequência da reação, a seguinte classificação foi utilizada: 0) < 1%, 1) 1-10%, 2) 11-50%, 3) 51-90% e 4) > 90%.

Os resultados foram definidos a partir do produto dos valores obtidos com a análise da intensidade e frequência:

1. negativo: 0 a 1,9;
2. positivo fraco: 2,0 a 4,9;
3. positivo médio: 5,0 a 8,9; e
4. positivo forte: 9,0 a 12,0.

Para a análise dos resultados da imunoexpressão do PTEN e da proteína AKT fosforilada e total, os pacientes foram distribuídos em dois grupos, entre cada marcador imunoistoquímico testado. Um dos grupos foi constituído por pacientes com reação positiva e definido como portadores de hiperexpressão, pela presença de reações imunoistoquímicas com positividade média ou forte. Os pacientes do segundo grupo de pacientes apresentaram reação imunoistoquímica negativa e foram considerados como portadores de hipoexpressão pela presença de reações negativas ou com positividade fraca.

D Híbridização *in situ* (FISH)

A pesquisa de alterações estruturais ou numéricas do PTEN foi realizada mediante reação de hibridização *in situ* (FISH) através de sonda *dual color* com afinidade específica para a região 10q23 do cromossomo 10, contendo seqüências que identificam as porções 5' e 3' do gene PTEN. Para a pesquisa de hibridização, foram selecionadas as áreas em que as anormalidades celulares eram mais frequentes, tendo como referência o tecido correspondente corado com H.E. Para a

identificação do número de cópias, foi considerado um mínimo de 100 núcleos interfásicos por tecido tumoral.

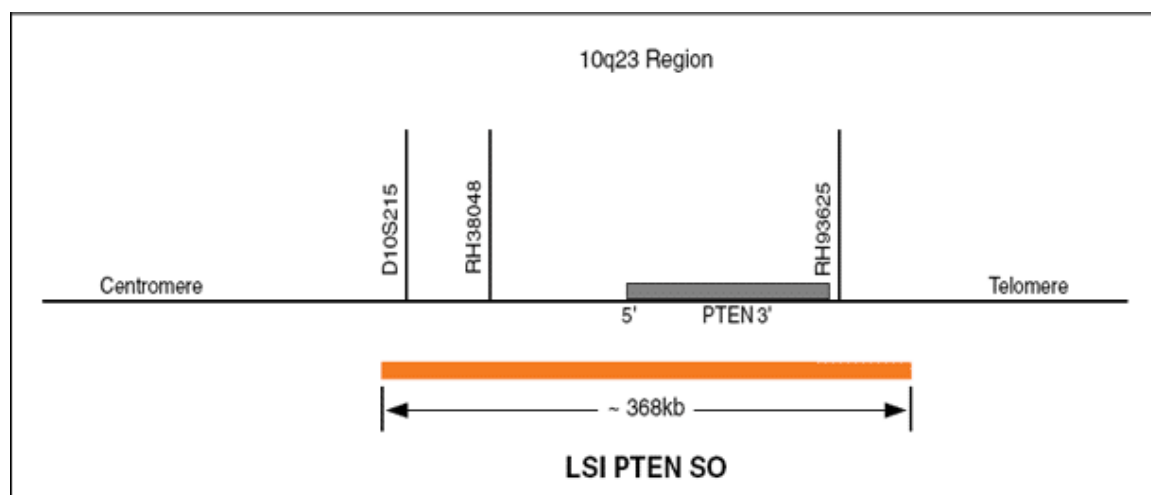


Figura 2 - Demonstração da sonda de 368 kb que realiza a hibridização do gene PTEN.

O gene PTEN foi considerado normal pela presença de dois sinais vermelhos (10q23/PTEN locus) e dois sinais verdes (CEP 10). Para a definição de deleção, foram utilizados valores de corte superiores aos valores atribuídos a ganhos celulares, para evitar que perdas celulares ocorridas no processo de corte fossem interpretadas erroneamente como deleção. Para a interpretação dos resultados, foi conhecido o padrão de sinal normal e anormal da sonda aplicada mediante o uso de controles positivos e negativos.

A presença de deleção hemizigótica foi definida quando um dos alelos estava alterado parcial ou completamente, estando o gene selvagem presente, ou seja, quando havia mais de 24% do tumor contendo somente um locus gene PTEN e quando havia presença de sinal no controle.

Deleção homozigótica correspondeu a alterações em ambos os alelos, resultando na perda funcional completa do gene e representando assim o tipo patognomônico de mutação em gene supressor tumoral. A deleção homozigótica foi definida na leitura das lâminas, quando os locus do gene PTEN estavam ausentes e estava presente o sinal do grupo controle em mais de 30% dos núcleos interfásicos (KORSHUNOV et al. 2005; VENTURA et al. 2006).

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

Para a análise estatística da SG, SLD e correlação com o estudo imunoistoquímico do PTEN, dois grupos de pacientes foram definidos de acordo com os resultados obtidos pela reação de hibridização *in situ*. Os pacientes que demonstraram deleção hemizigótica, homozigótica ou monossomia à hibridização foram considerados no grupo de deleção. Reação de hibridização *in situ* com achados de trissomia ou normalidade definiram o outro grupo como “sem deleção”.

3.2.3 Protocolo de Acompanhamento

De acordo com a rotina do departamento de cirurgia pélvica do Hospital A.C. Camargo, o acompanhamento no pós-operatório consiste de consultas trimestrais nos primeiro e segundo anos, semestrais no terceiro e quarto anos e anualmente após o quinto ano. Em todas as consultas realizam-se exame físico geral e específico, além

de radiografias de tórax simples nas incidências de frente e perfil e dosagem sérica de uréia e creatinina.

Também são realizadas ultra-sonografias de abdômen total alternadas com tomografias abdominais e pélvicas. A cintilografia óssea é realizada nos casos de suspeita clínica ou laboratorial de metástase óssea. Todas essas informações constam nos prontuários e foram coletadas pelo autor dessa dissertação.

3.3 VARIÁVEIS DO ESTUDO

3.3.1 Epidemiológicas

Tempo de seguimento

O tempo de seguimento foi calculado em meses e correspondeu ao intervalo de tempo decorrido entre a data da cirurgia e a data do último seguimento clínico do paciente.

Idade

Considerada em anos completos e analisada em três faixas etárias: 23-44, 45-59 e 60 a 82 anos.

Raça

Os pacientes foram classificados como brancos e não brancos.

Sexo

Classificação como masculino e feminino.

Diagnóstico incidental

Ocorreu quando o diagnóstico foi decorrente da realização de exames complementares por outros motivos médicos e sem sintomas ao diagnóstico.

Sintomatologia

Qualquer sintoma ou sinal que tenha motivado o diagnóstico foi classificado como queixa. Foram selecionadas as queixas mais frequentes citadas na literatura como: dor lombar, hematúria, perda de peso, massa palpável e febre.

Metástase ao diagnóstico

Ocorreu quando havia disseminação metastática da neoplasia renal no momento do diagnóstico, demonstrada clinicamente ou através de biópsia.

História familiar de CCR

Pacientes que referiram nos seus antecedentes familiares a ocorrência do CCR em dois parentes consangüíneos ou em parente com menos de 40 anos, foram considerados como tendo história familiar positiva para a doença. Aqueles que negaram foram classificados como negativos para história familiar, e aqueles em que não informaram adequadamente foram classificados como “ignorados”.

3.3.2 Dados clínicos

Performance/status

Os pacientes foram classificados de acordo a classificação de Karnofski (1940) e Ecog (*European Cooperative Oncologic Group*, 1982) (Anexo 2).

Complicações

As complicações decorrentes do tratamento foram classificadas como precoces e tardias:

- A. Complicações precoces: ocorridas até o 30º dia de pós-operatório, sendo listadas as mais comuns: insuficiência renal aguda, íleo adinâmico, complicações de parede (deiscência ou infecção), cardiorespiratórias, tromboembólicas, fístulas urinárias, sangramento e outras.
- B. Complicações tardias: ocorridas após o primeiro mês de pós-operatório, sendo listadas as mais comuns: insuficiência renal, suboclusão, afecções de parede cirúrgica, hipertensão arterial e outras.

Recidiva tumoral

Classificou-se como recorrência o diagnóstico de lesões no retroperitônio ou a distância após a realização da nefrectomia. Nos casos de dúvida diagnóstica ou de lesão suspeita em topografias menos comuns, foi realizada biópsia para a confirmação da recorrência. Foram divididas quanto à topografia como:

- A. Recidiva local: recorrência da doença no leito operatório, nos casos de nefrectomia radical. Recorrência no rim remanescente ou na adrenal ipsilateral, nos casos de cirurgias poupadoras de néfrons.
- B. Metástase a distância: recorrência da doença nos pulmões, fígado, ossos, sistema nervoso central, rim contralateral e outros sítios menos freqüentes.

Tipo de tratamento empregado na recorrência

Os tratamentos realizados para as metástases foram classificados como: cirurgia exclusiva, radioterapia exclusiva, cirurgia associada à radioterapia, imunoterapia isolada (alfa-interferon ou interleucina-2), imunoterapia associada à quimioterapia ou conduta expectante.

3.3.3 Dados anatomopatológicos

A Macroscopia

Tamanho tumoral

Considerou-se, em centímetros, o maior eixo tumoral durante a realização do exame anatomopatológico, de acordo com o estadiamento TNM (SOBIN e WITTEKIND 2004).

Lateralidade

Os tumores foram classificados conforme sua localização: rim direito, esquerdo ou ambos.

Topografia renal

A topografia foi definida quanto à localização do tumor no pólo superior, medial, inferior ou em mais de um pólo renal.

B Microscopia

Revisão de lâminas

Foram revisadas as lâminas originais dos exames anatomopatológicos de todos os casos por um único patologista e selecionadas aquelas com áreas mais representativas de malignidade e tecido renal normal para a confecção do TMA.

Os tumores tiveram a sua graduação de malignidade histológica definida segundo os critérios de FURHMAN et al. (1982):

- Grau 1: células com núcleo pequeno de até 10 μ m, com contornos arredondados uniformes e com nucléolo imperceptível ou não visualizado;
- Grau 2: núcleos grandes com aproximadamente 15 μ m, com contornos irregulares e com nucléolo visível com grande aumento (400x);
- Grau 3: núcleos grandes com aproximadamente 20 μ m, com contornos irregulares e com nucléolo visível ao menor aumento;
- Grau 4: núcleos bizarros e multilobulados e com acúmulo de densa cromatina.

Para a classificação dos subtipos histológicos foi empregada a classificação do consenso de 2004 (BRUDER et al. 2004). Essa é a nova classificação utilizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Os CCR foram classificados quanto ao tipo histológico como:

- Carcinoma convencional
 - o Células claras
 - o Granular
 - o Misto
- Carcinoma renal papilífero ou cromofílico
- Carcinoma renal cromofóbico

- Carcinoma dos ductos coletores
- Carcinoma medular
- Carcinoma relacionado ao TFE3 gene
- Carcinoma renal cístico multilobular
- Carcinoma renal inclassificável

Invasão venosa microscópica

Foi considerada presente quando foram encontradas células neoplásicas isoladas ou agrupadas em lúmen vascular com hemáceas e com revestimento endotelial e podendo haver fibras musculares lisas. Assim, os tumores foram classificados como tendo invasão vascular hemática presente ou ausente.

Acometimento do seio renal ou tecido perinefrético

Caracterizado pela presença de células neoplásicas invadindo diretamente a gordura perirrenal, ou por nódulos tumorais em meio à gordura, não limitados ao lúmen vascular ou linfático.

Acometimento da glândula adrenal

Caracterizado pela infiltração de células neoplásicas na adrenal ipsilateral à neoplasia primária.

Acometimento linfonodal regional e número de linfonodos

Considerado positivo (pN+) quando o exme anatomopatológico demonstrou o envolvimento neoplásico. Considerado como negativo (pN-) quando pelo menos um linfonodo estava livre de comprometimento neoplásico ao exame anatomopatológico.

Os casos em que não foram identificados linfonodos foram classificados como “ignorados” (pNx).

Margens cirúrgicas

Os pacientes em que todos os limites de resseção do espécime cirúrgico estiveram livres de comprometimento neoplásico foram considerados como tendo margens cirúrgicas livres. Se em um dos limites da peça cirúrgica havia células neoplásicas, esse paciente foi considerado como tendo margens comprometidas.

3.3.4 Estadiamento

Para o estadiamento foram empregados os sistemas TNM propostos pela UICC (SOBIN e WITTEKIND 2004). Estudou-se também a classificação de Robson (ROBSON et al. 1969). Quanto ao estadiamento clínico TNM 2004, os pacientes foram classificados em quatro estádios, a saber: I, II, III e IV. Estádios clínicos I e II foram considerados como tumores localizados, enquanto os estádios III e IV corresponderam a tumores localmente avançados ou metastáticos. Em relação ao estadiamento de Robson, os pacientes foram classificados nos seguintes estádios: I, II, IIIa, IIIb, IIIc, e IV. (Anexo 3).

3.3.5 Situação clínica ao final do estudo

Situação clínica do paciente verificada na data do último seguimento. Os pacientes foram classificados quanto à situação clínica como:

- Vivos assintomáticos: pacientes tratados do CCR sem evidência clínica, laboratorial e radiológica de atividade da doença;

- Vivos com câncer em atividade: pacientes que, após a nefrectomia, mantiveram evidência clínica, laboratorial ou radiológica da doença ou que apresentaram recidiva durante o seguimento;
- Mortos por câncer: pacientes que morreram decorrente do CCR ou de causa diretamente relacionada ao seu tratamento;
- Mortos por doença não relacionada ao câncer: pacientes que morreram por causa não relacionada ao CCR ou a seu tratamento;
- Perdidos de vista: pacientes que não retornaram à consulta num período de tempo igual ou maior ao dobro do estipulado para o seu retorno e com os quais não foi possível estabelecer contato para informações no decorrer do estudo. O limite máximo de pacientes perdidos de vista aceitável foi estabelecido em 20%.

3.3.6 Sobrevida livre de doença

A sobrevida livre de doença (SLD) foi determinada pelo período de tempo, em meses, decorrido entre a data da nefrectomia e a data do diagnóstico da recidiva ou do último seguimento. Para o cálculo da SLD, foram excluídos os pacientes portadores de metástases ao diagnóstico, assim como aqueles com margens positivas após a cirurgia.

3.3.7 Sobrevida global

A sobrevida global (SG) foi definida pelo período de tempo, em meses, decorrido entre a data da nefrectomia e a data do óbito ou do último seguimento.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos prontuários foram digitados e arquivados em um banco de dados com auxílio do programa “Excel 7.0 for Windows”. Na análise estatística, foi empregado o software *Statistical Package for Social Science* (SPSS) for Windows. A mensuração das variáveis quantitativas foi expressa pelas médias e respectivos desvios-padrão, e as variáveis qualitativas, pelas respectivas frequências absolutas e relativas.

Para avaliar a concordância entre os métodos de hibridização *in situ* e imunoistoquímico foi utilizada a estatística Kappa. Na correlação entre as variáveis, foi empregado o teste do “qui-quadrado” e caso houvesse casela menor que cinco, optaria-se pelo teste de Fisher (“bicaudal”). Nas análises de sobrevida global e intervalo livre de doença, foi empregada a técnica de Kaplan-Meier. A significância foi avaliada pelo teste de Logrank. Para a análise múltipla das sobrevidas foi empregado o modelo de riscos proporcionais de Cox. As variáveis selecionadas para o processo de modelagem múltipla foram as que atingiram $p < 0,20$ na análise univariada. Permaneceram no modelo múltiplo as variáveis com $p < 0,05$ ou com significância próxima a esse valor. A proporcionalidade dos riscos foi avaliada através dos gráficos $\ln - \ln [s(t)]$. A medida de risco estimada foi a razão das funções de risco (*hazard ratio* –HR), que é a exponencial dos coeficientes de regressão do modelo múltiplo.

3.5 ASPECTOS ÉTICOS

Por se tratar de estudo retrospectivo, não houve necessidade de elaboração de termo de consentimento pós-informado. Esse projeto foi submetido à Comissão de ética em Pesquisa do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital A.C. Camargo e aprovado por ela (parecer nº 833/06, de 04/10/2006). O pesquisador comprometeu-se em manter sigilo sobre a identificação dos pacientes.

4 RESULTADOS

4.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Sessenta e oito pacientes (61,8%) eram do sexo masculino e 42 (38,2%) eram mulheres. A idade média ao diagnóstico foi de 54,96 e mediana de 55 anos, com variação de 23 a 82 anos. Metade dos pacientes tinha idade entre 45 e 59 anos. Predominou a raça branca em 97 dos pacientes analisados (88,2%). Em 44 pacientes (40,0%) o diagnóstico foi incidental, enquanto 66 (60,0%) demonstravam alguma sintomatologia. Dezesseis pacientes (14,5%) apresentavam metástases ao diagnóstico. Os três sintomas mais frequentes foram: dor lombar (18,2%), hematúria (16,4%) e emagrecimento (8,2%). Um único paciente apresentou a tríade clássica de hematúria, dor lombar e massa palpável. Entre os pacientes sintomáticos, o tempo médio desde o início dos sintomas e o diagnóstico foi de 3,33 meses, variando de 0 a 48 meses. Somente três pacientes (2,7%) tinham antecedentes familiares de CCR.

Tabela 1 - Número e porcentagem de pacientes segundo dados epidemiológicos.

<i>VARIÁVEL</i>	<i>CATEGORIA</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Idade	23-44	20	18,2
	45-59	55	50
	60-82	35	31,8
Sexo	Masculino	68	61,8
	Feminino	42	38,2
Raça	Branca	97	88,2
	Não branca	13	11,8
Diagnóstico incidental	Sim	44	40,0
	Não	66	60,0
Metástase ao diagnóstico	Não	94	85,5
	Sim	16	14,5
Sintomas	Não	44	40
	Dor lombar	20	18,2
	Hematúria	18	16,4
	Emagecimento	9	8,2
	Febre	2	1,8
	Massa palpável	3	2,7
	Outros	17	14,3
CCR familiar	Não	107	97,3
	Sim	3	2,7
TOTAL		110	100

4.2 DADOS CLÍNICOS

Em relação ao Karnofski, 83 pacientes (75,4%) apresentavam índices superiores a 90. Oitenta e quatro pacientes (76,4%) eram Ecog 0. Predominaram as nefrectomias radicais, que foram realizadas em 82 pacientes (74,5%). As complicações cirúrgicas precoces e tardias ocorreram em 19 (17,5%) e 14 pacientes (12,7%), respectivamente. O tempo médio de duração das cirurgias foi de 216 minutos, com variação de 60 a 395 minutos. O tempo médio de internamento foi de 5,5 dias, com tempo de internamento variando de 1 até 60 dias. Trinta e um pacientes (28,2%) apresentaram recorrência local ou a distância. Os principais sítios de recorrência tumoral foram: pulmão (22,7% das recorrências), osso (22,7%), local (9,7%) e rim contralateral (9,7%), que ocorreram, respectivamente, em 7, 7, 3 e 3 pacientes. Entre os tratamentos utilizados na recorrência, predominaram a radioterapia (29%), a cirurgia (25,8%) e a imunoterapia (9,7%).

Tabela 2 - Número e porcentagem de pacientes segundo os dados clínicos.

<i>VARIÁVEL</i>	<i>CATEGORIA</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Karnofski	60 – 70	8	7,3
	80	19	17,3
	90	49	44,5
	100	34	30,9
Ecog	0	84	76,4
	1-2	26	23,6
Tipo de cirurgia	Nefrectomia radical	82	74,5
	Nefrectomia parcial	28	25,5
Complicações cirúrgicas precoces	Não	91	82,7
	IRA	5	4,5
	Cardiovasculares	3	2,7
	Íleo prolongado	2	1,8
	Outras	9	8,1
Complicações cirúrgicas tardias	Não	96	87,3
	IRC	6	5,5
	Parede abdominal	2	1,8
	HAS	1	0,9
	Outras	5	4,5
Recorrência	Não	79	71,8
	Sim	31	28,2
Local da recorrência	Pulmão	7	22,7
	Osso	7	22,7
	Local	3	9,3
	Rim contralateral	3	9,3
	Outros/mais de um sítio	10	36
Tratamento da recorrência	Radioterapia	9	29
	Cirurgia	8	25,8
	Imunoterapia	3	9,7
	Outros/combinações	4	12,8
	Sem tratamento	7	22,7
TOTAL		110	100

4.3 DADOS ANATOMOPATOLÓGICOS

Macroscopia

O tamanho médio dos tumores foi de 7,38 cm. Os tamanhos variaram de 2 a 24 cm. Em aproximadamente 50% dos casos, a neoplasia renal apresentava tamanho inferior a sete centímetros. O rim esquerdo foi o mais acometido em 57 casos (51,8%), seguido do rim direito em 51 pacientes (46,4%) Em relação à localização no parênquima renal, 39,9% das neoplasias estavam no pólo superior e em outros 39,9% mais de um pólo estava acometido.

Tabela 3 - Número e porcentagem de pacientes segundo as características anatomopatológicas macroscópicas do tumor.

<i>VARIÁVEL</i>	<i>CATEGORIA</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Tamanho tumoral patológico	T1a	24	21,8
	T1b	30	27,3
	T2	19	17,3
	T3a	16	14,5
	T3b	17	15,5
	T4	4	3,6
Lateralidade	Direito	51	46,4
	Esquerdo	57	51,8
	Bilateral	2	1,8
Topografia renal	Pólo superior	39	35,5
	Pólo médio	13	11,8
	Pólo inferior	19	17,3
	Mais de um pólo	39	35,5
TOTAL		110	100

Microscopia

Conforme a graduação de Fuhrman, predominaram tumores de baixo grau, 65 (59,1%), *versus* alto grau, 45 (40,9%). Fuhrman grau I foi encontrado em 18 (16,4%) neoplasias, grau II em 47 (42,7%), grau III em 27 (24,5%) e grau IV em 18 (16,4%).

O subtipo histológico mais freqüente foi o subtipo de células claras presente em 71 (64,5%) das neoplasias, seguido do subtipo cromóforo, 14 (12,7%), e papilífero, 12 (10,9%). Invasão venosa microscópica foi encontrada em 27 neoplasias (24,5%). Em 25 dos pacientes (22,7%) havia invasão de tecido perinefrético ou de seio renal, caracterizando-os como portadores de neoplasia avançada localmente (pT3a). A glândula adrenal e as margens cirúrgicas estavam acometidas em 9,1% (dez pacientes) dos casos analisados.

A maioria dos pacientes não apresentou linfonodos histologicamente positivos no produto de nefrectomia (59,1%) e foi estadiada como pN0. Em 33 pacientes (30%) não havia linfonodos na peça cirúrgica (Nx). Doze pacientes (10,9%) apresentaram linfonodos histologicamente positivos e foram considerados como pN1 (6,4%) e pN2 (4,5%).

Tabela 4 - Número e porcentagem de pacientes segundo as características anatomopatológicas microscópicas do tumor.

<i>VARIÁVEL</i>	<i>CATEGORIA</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Grau fuhrman	I	18	16,4
	II	47	42,7
	III	27	24,5
	IV	18	16,4
Subtipo histológico	Células claras	71	64,5
	Papilífero	12	10,9
	Cromóforo	14	12,7
	TFE3 GENE	2	1,8
	Ductos coletores	1	0,9
	Inclassificável	10	9,1
Invasão venosa microscópica	Não	83	75,5
	Sim	27	24,5
Invasão seio renal, tecido perinefrético	Não	85	77,3
	Sim	25	22,7
Invasão adrenal	Não	100	90,9
	Sim	10	9,1
Margens cirúrgicas	Livres	100	90,9
	Comprometidas	10	9,1
N patológico	N0	65	59,1
	N1	7	6,4
	N2	5	4,5
	Nx	33	30
TOTAL		110	100

4.4 ESTADIAMENTO

Segundo o estadiamento TNM (2004), a maioria dos pacientes foi estadiada como portadora de doença localizada, pois 68 pacientes (61,8%) eram EC I e II. Doenças avançadas localmente e metastáticas foram detectadas em 26 (23,6%) e 16 pacientes (14,5%), respectivamente. De maneira semelhante, no estágio de Robson predominaram os tumores localizados em 67 pacientes (60,9%).

Tabela 5 - Número e porcentagem de pacientes de acordo com o estadiamento TNM (SOBIN e WITTEKIND 2004) e ROBSON (1969).

<i>VARIÁVEL</i>	<i>CATEGORIA</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Estádio clínico TNM	I	54	49,1
	II	14	12,7
	III	26	23,6
	IV	16	14,5
Estádio de Robson	I	67	60,9
	II	17	15,5
	IIIa	16	14,5
	IIIb	6	5,5
	IIIc	1	0,9
	IV	3	2,7
TOTAL		110	100

4.5 EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO GENE PTEN E DA PROTEÍNA AKT

A expressão imunoistoquímica do PTEN e da proteína Akt total e fosforilada foi possível de ser analisada em 110 (100%) das amostras tumorais constituintes no *array*. Predominou a hipoexpressão para o PTEN, que foi encontrada em 97 amostras (88,2%). Somente em 13 amostras (11,8%), o PTEN estava hiperexpresso.

Em relação à proteína Akt fosforilada, 77 pacientes (70%) apresentaram hipoexpressão à reação imunoistoquímica, e 33 pacientes (30%) apresentaram hiperexpressão. De maneira igual à proteína Akt fosforilada, o Akt total estava hipoexpresso em 77 pacientes (70%) e hiperexpresso em 33 (30%).

Tabela 6 - Número e porcentagens dos resultados obtidos com as reações imunoistoquímicas.

<i>VARIÁVEL</i>	<i>CATEGORIA</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
PTEN	Hipoexpresso	97	88,2
	Hiperexpresso	13	12,8
Akt fosforilado	Hipoexpresso	77	70
	Hiperexpresso	33	30
Akt total	Hipoexpresso	77	70
	Hiperexpresso	33	30
TOTAL		110	100

4.6 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

A pesquisa de hibridização *in situ* do gene PTEN foi realizada inicialmente nos 110 pacientes que constavam no TMA; porém, somente em 53 amostras (48,2%) foi possível analisar a reação proposta por diferentes motivos técnicos. Nos 53 casos passíveis de análise, foram identificados 21 casos (44,7%) de deleção, incluindo 18 casos de deleção hemizigótica (Figura 3) e três casos de deleção homozigótica.

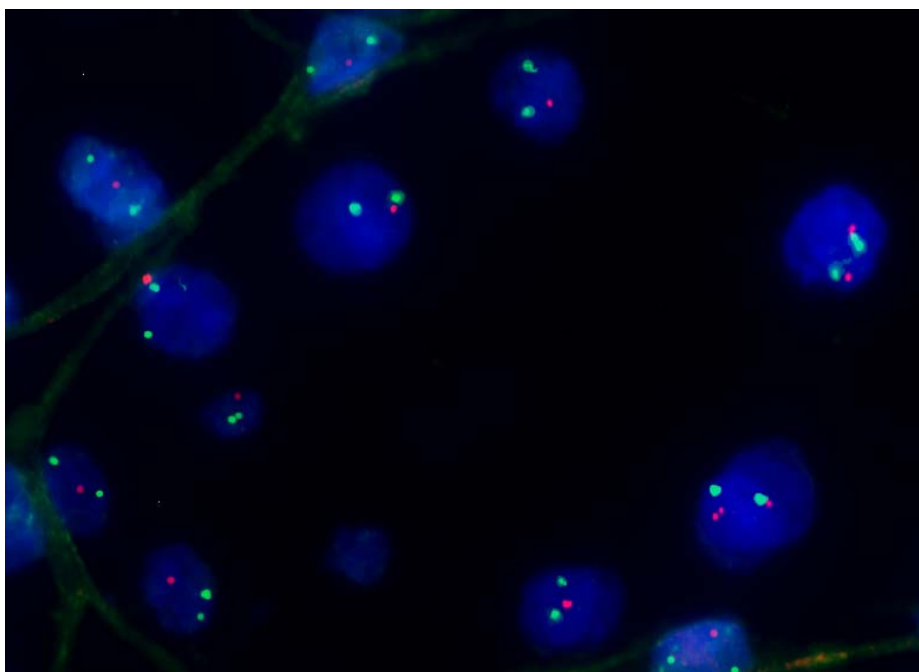


Figura 3 – Deleção hemizigótica identificada pela presença de único sinal vermelho para o locus 10q23 (PTEN) e dois sinais verdes para CEP 10.

Menos freqüentes, foram monossomia ou trissomia (Figura 4), presentes em 11 pacientes (10%).

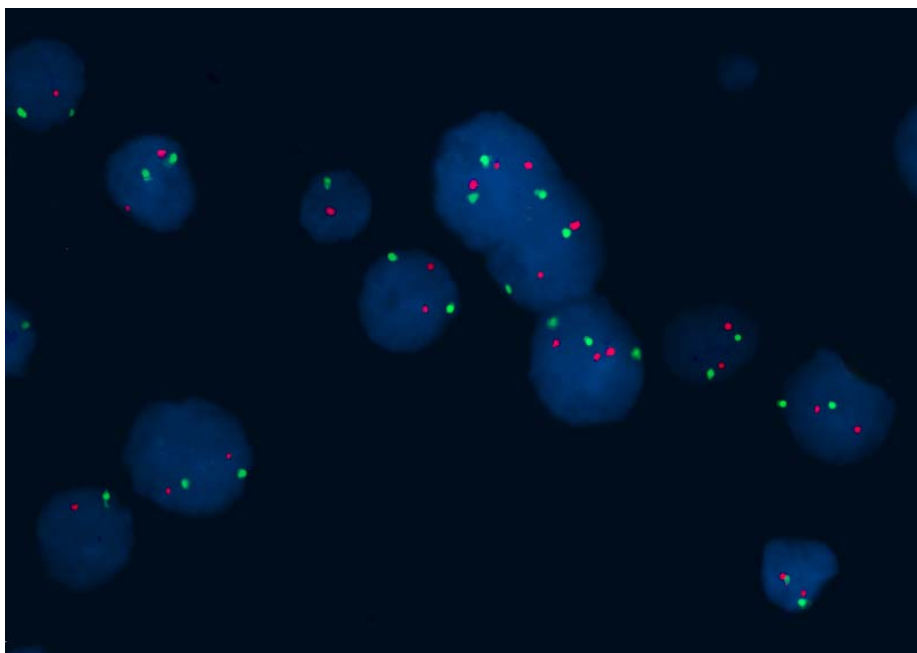


Figura 4 – Identificação de trissomia pela presença de três sinais vermelhos (10q23/PTEN) e três verdes (CEP 10).

Em 21 amostras (39,6%), a reação de hibridização foi normal para o PTEN(Figura 5). Entre as 53 amostras positivas para o FISH, 30 amostras (56,6%) apresentavam deleção e 23 amostras (43,4%) não apresentavam deleção.

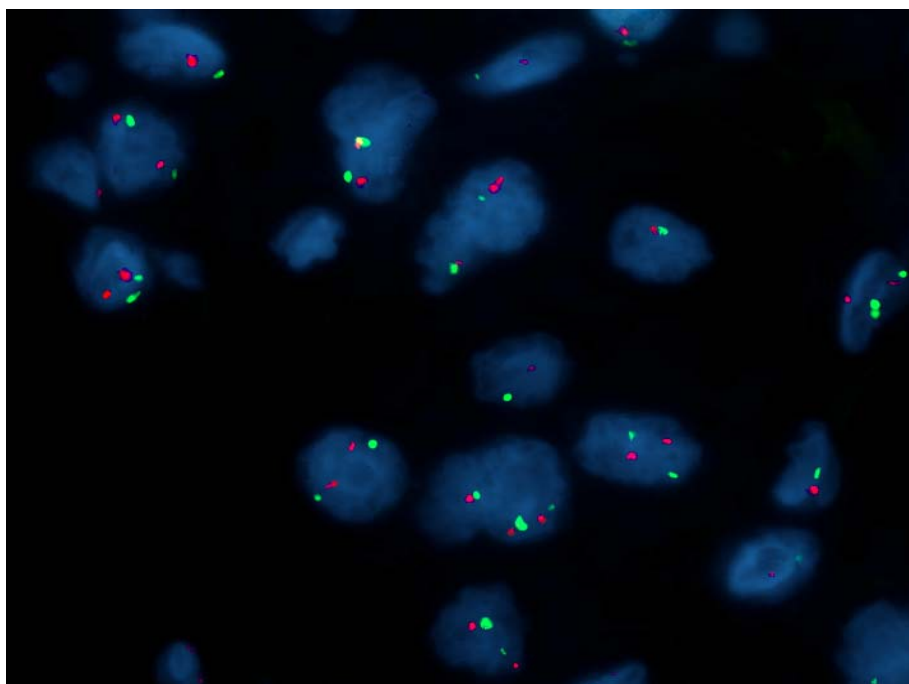


Figura 5 - Imagem normal do gene PTEN pela presença de dois sinais vermelhos (10q23 /PTEN locus) e dois sinais verdes (CEP 10).

Tabela 7 - Número e porcentagem de pacientes de acordo com reação de hibridização.

<i>VARIÁVEL</i>	<i>CATEGORIA</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Deleção hemizigótica	Sim	18	34,0
Deleção homozigótica	Sim	3	5,7
Normal		21	39,6
Monossomia	Sim	9	17,0
Trissomia	Sim	2	3,8
TOTAL		53	100

4.7 ANÁLISE DA CONCORDÂNCIA ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA E REAÇÃO DE HIBRIDIZAÇÃO PARA O PTEN

Houve concordância bruta em 32 dos 53 casos analisados (60,4%), sendo 25 casos com PTEN hipoexpresso à imunoistoquímica e deleção à hibridização, e sete casos com PTEN hiperexpresso e ausência de deleção à hibridização *in situ*. No entanto, a estatística Kappa mostrou que essas duas técnicas têm concordância baixa e não significativa (Kappa=0,146; p=0,235). Em cinco casos (9,4%), houve hiperexpressão à imunoistoquímica e deleção à hibridização. Por outro lado, em 16 casos (30,2%) com hipoexpressão IIQ, não havia deleção à hibridização.

4.8 ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA AKT FOSFORILADA COM O GENE PTEN

Entre os 77 pacientes com proteína Akt fosforilada hipoexpressa, 65 (84,4%) apresentavam PTEN hipoexpresso, enquanto em 12 pacientes (15,6%) havia hiperexpressão do PTEN. Entre os 33 pacientes com Akt hiperexpresso, 32 pacientes (97%) apresentavam hipoexpressão do PTEN à imunoistoquímica e somente um paciente apresentava PTEN hiperexpresso (3%).

A hiperexpressão da proteína Akt não se associou significativamente com a hipoexpressão do PTEN (OR=0,169, p=0,235), apesar da maior probabilidade de proteína Akt fosforilada hiperexpressa ser dos pacientes com o gene PTEN hipoexpresso à IIQ.

Não houve diferenças entre as frequências de casos positivos para o Akt total e fosforilado. A análise imunoistoquímica do Akt total permitiu definir que a hiperexpressão da proteína Akt não ocorreu por aumento do total de Akt ativado, mas sim, decorrente de fosforilação.

4.9 SITUAÇÃO CLÍNICA AO FINAL DO SEGUIMENTO

O tempo de seguimento dos pacientes variou de 0 a 178 meses com mediana de 28,5 meses e média de 41,95 meses. Foram registradas 31 recorrências da doença (28,2%), sendo sete casos no pulmão (22,6%), sete no osso (22,6%), três casos de recidiva local (9,7%), três no rim contralateral (9,7%), um no fígado (3,2%), um no sistema nervoso central (3,2%) e dois em outros sítios (6,5%). Em 22,5% havia mais de um sítio de recorrência tumoral.

Ocorreram 31 óbitos (31,7%), dos quais 27 (87%) pelo câncer. Ao final do seguimento havia 68 pacientes (61,8) vivos e sem doença, sete (6,4%) vivos com doença, 35 óbitos (31,7%) e quatro pacientes (3,6%) perdidos de vista.

4.10 ANÁLISE DA SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

4.10.1 Dados epidemiológicos

Sintomatologia ao diagnóstico foi a única variável que apresentou significância estatística na SLD, sendo que os pacientes sem sintomatologia apresentaram taxas de sobrevida maiores do que aqueles com sintomatologia

($p=0,035$). Diagnóstico incidental também foi selecionado para a análise múltipla pelo modelo de Cox, pois apresentou $p<0,200$.

Tabela 8 - Taxas de sobrevida livre de doença em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, segundo as variáveis epidemiológicas.

VARIÁVEL	CATEGORIA	N*	SLD (Prob. em 5 anos - %)	P (Log rank)
Idade	23-44	15	54,6	0,697
	45-59	44	76,9	
	60-82	29	80,1	
Sexo	Masculino	53	77,1	0,651
	Feminino	35	72,0	
Raça	Branca	78	76,4	0,978
	Não branca	10	62,5	
Diagnóstico incidental	Não	38	85,9	0,063**
	Sim	50	67,1	
Sintomas	Não	37	87,8	0,035**
	Sim	51	66,7	
CCR familiar	Não	85	76,1	0,574
	Sim	3	50,0	

* Excluídos os pacientes com informação incompleta

** Variáveis selecionadas para o modelo de Cox

4.10.2 Dados clínicos

Apesar das menores taxas de sobrevida livre de doença ser observada entre os pacientes com Ecog 0 ou índices de Karnofski inferiores a 80, o *performance status* não foi uma variável significativa na SLD, assim como nenhuma outra variável clínica foi selecionada para o modelo múltiplo.

Tabela 9 - Taxas de sobrevida livre de doença em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, segundo as variáveis clínicas.

VARIÁVEL	CATEGORIA	N*	SLD (Prob. em 5 anos - %)	P (Log rank)
Karnofski	60 – 70	6	40,0	0,208
	80	12	73,3	
	90	40	79,1	
	100	30	74,5	
Ecog	0	71	76,5	0,392
	1-2	17	67,7	
Tipo de cirurgia	Nefrectomia radical	67	61,2	0,102
	Nefrectomia parcial	21	85,7	
Complicações cirúrgicas precoces	Não	73	74,4	0,587
	Sim	15	80,2	
Complicações cirúrgicas tardias	Não	78	75,2	0,926
	Sim	10	75,0	

* Excluídos os pacientes com informação incompleta

4.10.4 Dados anatomopatológicos

Entre os dados anatomopatológicos macroscópicos, apresentaram diferenças significativas nas curvas de sobrevida livre de doença o tamanho tumoral patológico e a topografia renal, sendo selecionados para a análise de Cox. Os pacientes portadores de tumores de até sete centímetros (pT1b) tiveram maior SLD em relação aos portadores de tumores maiores que sete cm (85% versus 59,1%). Os tumores pT3b determinaram as menores taxas de SLD, 77,0% em 5 anos. A topografia renal, também foi significante na análise única para o cálculo da SLD. Reflete

indiretamente o tamanho tumoral renal, sendo que, pacientes com tumores acometendo mais de um pólo tiveram menor SLD em relação aos demais ($p=0,048$).

Tabela 10 - Taxas de sobrevida livre de doença em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, segundo as variáveis anatomopatológicas macroscópicas.

<i>VARIÁVEL</i>	<i>CATEGORIA</i>	<i>N*</i>	<i>SLD</i> (<i>Prob. em 5 anos - %</i>)	<i>P</i> (<i>Log rank</i>)
Tamanho tumoral patológico	T1a	21	83,2	<0,001**
	T1b	29	93,3	
	T2	16	93,3	
	T3a	13	92,3	
	T3b	9	77,0	
Lateralidade	Direito	38	68,7	--
	Esquerdo	49	79,1	
	Bilateral	1	--	
Topografia renal	Pólo superior	34	84,9	0,048**
	Pólo médio	10	----	
	Pólo inferior	18	61,1	
	Mais de um pólo	26	58,6	

* Excluídos os pacientes com informação incompleta

** Variáveis selecionadas para o modelo de Cox

O dado anatomopatológico microscópico que mostrou significância estatística nas curvas de SLD e que foi selecionado para o modelo múltiplo foi invasão de seio renal/tecido perinefrético. Invasão venosa microscópica também foi selecionada, pois apresentou $p<0,200$. A presença de invasão de gordura renal ou seio renal configura ao menos, no estadiamento TNM para pacientes portadores de tumores T3a, independentemente do *status* linfonodal ou metastático a distância e esses são pacientes sabidamente de pior evolução em relação àqueles portadores de tumores localizados ($\leq pT2$).

Tabela 11 - Taxas de sobrevida livre de doença em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, segundo as variáveis anatomopatológicas microscópicas.

<i>VARIÁVEL</i>	<i>CATEGORIA</i>	<i>N*</i>	<i>SLD</i> (Prob. em 5 anos - %)	<i>P</i> (Log rank)
Grau Fuhrman	Baixo grau I e II	58	77,7	0,364
	Alto grau III e IV	39	69,6	
Subtipo histológico	Células claras	58	73,3	0,257
	Papilífero	9	76,2	
	Cromóforo	12	--	
	TFE3 GENE	2	--	
	Inclassificável	7	50,0	
Invasão venosa	Não	72	78,9	0,076
Microscópica	Sim	16	57,4	
Invasão seio renal, tecido perinefrético	Não	71	82,6	<0,001**
	Sim	17	47,1	
Invasão adrenal	Não	83	76,0	0,882
	Sim	5	0,00	
N patológico	N0	56	78,9	0,407
	N+	5	50	
	Nx	27	71,3	

* Excluídos os pacientes com informação incompleta

** Variáveis selecionadas para o modelo de Cox

4.10.4 Estadiamento

Os estadiamentos TNM e Robson apresentaram diferenças significativas nas curvas de sobrevida livre de doença, sendo selecionado unicamente o TNM para o modelo múltiplo. Os tumores localizados (EC I e II) apresentaram SLD em 5 anos de 95,5% e 71,3%, respectivamente, sendo significativamente maiores as taxas

observadas nos tumores avançados localmente ou metastáticos (EC III e IV) com, respectivamente, de 61,8% e 22,9% ($p < 0,001$).

Tabela 12 - Taxas de sobrevida livre de doença em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, segundo os estadiamentos.

<i>VARIÁVEL</i>	<i>CATEGORIA</i>	<i>N*</i>	<i>SG</i> (<i>Prob. em 5 anos</i> - %)	<i>P</i> (<i>Log rank</i>)
Estádio clínico TNM	I	54	95,5	<0,001**
	II	14	71,3	
	III	26	61,8	
Estádio de Robson	I	67	86,8	<0,001
	II	17	71,6	
	IIIa	16	42,9	
	IIIb	6	33,3	
	IIIc	1	--	
	IV	3	0,00	

* Excluídos os pacientes com informação incompleta

** Variáveis selecionadas para o modelo de Cox

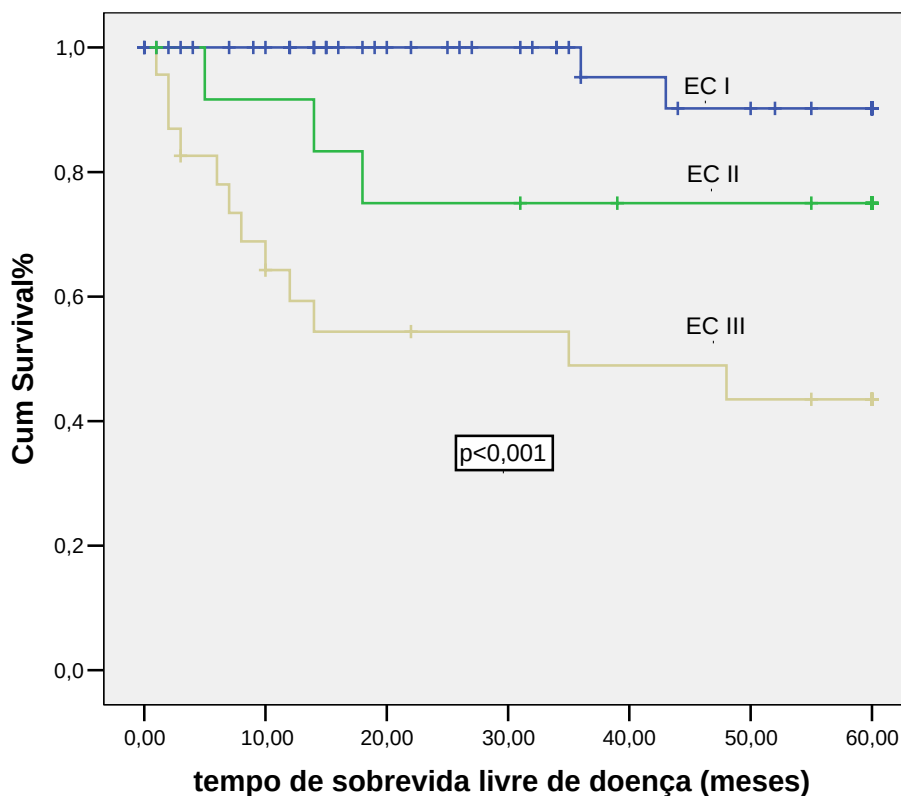


Figura 6 - Curva de sobrevida livre de doença de acordo com o estágio clínico TNM.

4.10.5 Imunoistoquímica e Hibridização *in situ* (FISH)

Hipoexpressão do PTEN ou hiperexpressão do Akt, não influenciaram negativamente a SLD dos pacientes, apesar deles demonstrarem menores taxas de sobrevida em relação aos pacientes com PTEN hiperexpresso ou Akt hipoexpresso ($p=0,272$ e $p=0,705$, respectivamente).

Tabela 13 - Taxas de sobrevida livre de doença em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, conforme a expressão imunoistoquímica do PTEN e Akt.

VARIÁVEL	CATEGORIA	N*	SLD (Prob. em 5 anos - %)	P (Log rank)
PTEN	Hipoexpresso	82	73,3	0,272
	Hiperexpresso	6	86,0	
Akt fosforilado	Hipoexpresso	62	76,8	0,705
	Hiperexpresso	26	66,3	

* Excluídos os pacientes com informação incompleta

Embora existam diferenças entre as taxas de sobrevida livre de doença entre os pacientes com deleção (hemizigótica, homozigótica ou monossomia) à reação de hibridização *in situ* e os pacientes sem deleção (trissomia ou normal), com respectivamente 84,7% *versus* 70,3%, elas não apresentaram significância estatística, pois apresentaram $p=0,344$.

Tabela 14 - Taxas de sobrevida livre de doença em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, conforme a presença ou ausência de deleção à hibridização.

VARIÁVEL	CATEGORIA	N*	SLD (Prob. em 5 anos - %)	P (Log rank)
FISH	Sem deleção	18	84,7	0,344
	Com deleção	24	70,3	

4.11 ANÁLISE DA SOBREVIDA GLOBAL

4.11.1 Dados epidemiológicos

Desse grupo de variáveis, diagnóstico incidental, metástases ao diagnóstico e sintomas ao diagnóstico, mostraram diferenças significativas nas curvas de sobrevida global (Tabela 15) e foram selecionadas para o modelo de Cox. A sobrevida global de pacientes com diagnóstico incidental da neoplasia renal foi de 84,1% em 5 anos *versus* 60% dos pacientes sintomáticos. Sintomatologia ao diagnóstico também foi indicativo de pior sobrevida global em 5 anos ($p=0,004$), assim como a presença de metástases ($p<0,001$).

Tabela 15 - Taxas de sobrevida global em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, segundo as variáveis epidemiológicas.

<i>VARIÁVEL</i>	<i>CATEGORIA</i>	<i>N*</i>	<i>SG</i> (Prob. em 5 anos - %)	<i>P</i> (Log rank)
Idade	23-44	20	73,7	0,331
	45-59	55	76,9	
	60-82	35	56,6	
Sexo	Masculino	68	66,2	0,405
	Feminino	42	73,9	
Raça	Branca	97	69,0	0,822
	Não branca	13	66,7	
Diagnóstico incidental	Não	66	60,0	0,004**
	Sim	44	84,1	
Metástase ao diagnóstico	Não	94	77,9	<0,001**
	Sim	16	0,0	
Sintomas	Não	44	40,0	0,004**
	Sim	66	60,0	
CCR familiar	Não	107	70,0	0,819
	Sim	3	50,0	

* Excluídos os pacientes com informação incompleta

** Variáveis selecionadas para o modelo de Cox

4.11.2 Dados clínicos

As variáveis clínicas que demonstraram significância estatística na análise de Kaplan-Meier para a sobrevida global e que foram selecionadas para o modelo de Cox foram: *performance status* (Karnofski e Ecog) e recorrência tumoral. Quanto menor foi o *performance status* ao Karnofski, menor foi a sobrevida global

($p < 0,001$). Pacientes com Ecog 0 tiveram sobrevida global de 78,2% em cinco anos versus 31% dos pacientes Ecog 1 e 2 ($p = 0,001$). A presença de falha/recorrência tumoral também foi determinante de menor sobrevida global (35,9% x 86,2%, $p = < 0,001$).

Tabela 16 - Taxas de sobrevida global em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, segundo as variáveis clínicas.

<i>VARIÁVEL</i>	<i>CATEGORIA</i>	<i>N*</i>	<i>SG</i> (Prob. em 5 anos - %)	<i>P</i> (Log rank)
Karnofski	60 – 70	8	30	<0,001**
	80	19	33,8	
	90	49	68,9	
	100	34	95,5	
Ecog	0	84	78,2	0,001**
	1-2	26	31,0	
Tipo de cirurgia	Nefrectomia radical	82	66,2	0,294
	Nefrectomia parcial	28	78,1	
Complicações cirúrgicas precoces	Não	91	68,5	0,637
	Sim	19	71,3	
Complicações cirúrgicas tardias	Não	96	69,2	0,670
	Sim	14	68,2	
Recorrência	Não	79	86,2	<0,001**
	Sim	31	35,9	

* Excluídos os pacientes com informação incompleta

** Variáveis selecionadas para o modelo de Cox

4.11.3 Dados anatomopatológicos

As variáveis macroscópicas (Tabela 17) que mostraram diferenças significativas nas curvas de sobrevida global e que foram submetidas à análise múltipla foram: tamanho tumoral patológico e topografia renal. Nessa série, 24 pacientes (21,8%) apresentaram pT1a; 30, (27,3%) pT1b; 19, (17,3%) pT2; 33, (30%) pT3; e 4, (3,6%) pT4. O tamanho tumoral patológico foi uma variável significativa na sobrevida global dos pacientes na análise univariada, sendo observada maior sobrevida para os pacientes portadores de tumores até sete centímetros com sobrevida em cinco anos de 95,8% para pT1a e 86,3% para T1b, *versus* 71,5%, 57,1%, 46,3% e 0% para os tumores pT2, pT3a, pT3b e pT4, respectivamente. Pacientes portadores de tumores renais acometendo mais de um pólo apresentaram menor taxa de SG em 5 anos: 47,7% ($p=0,001$). A variável topografia renal está relacionada diretamente com o tamanho tumoral patológico.

Tabela 17 - Taxas de sobrevida global em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, segundo as variáveis anatomopatológicas macroscópicas.

<i>VARIÁVEL</i>	<i>CATEGORIA</i>	<i>N*</i>	<i>SG</i> <i>(Prob. em 5 anos - %)</i>	<i>P</i> <i>(Log rank)</i>
Tamanho tumoral patológico	T1a	24	95,8%	<0,001**
	T1b	30	86,3%	
	T2	19	71,5%	
	T3a	16	57,1%	
	T3b	17	46,3%	
	T4	4	0%	
Lateralidade	Direito	51	66,0	0,666
	Esquerdo	57	62,0	
	Bilateral	2	0,00	
Topografia renal	Pólo superior	39	84,6	0,001**
	Pólo médio	13	60,6	
	Pólo inferior	19	85,7	
	Mais de um pólo	39	47,7	
*	Excluídos os pacientes com informação incompleta			
**	Variáveis selecionadas para o modelo de Cox			

Em relação à sobrevida global e aos dados anatomopatológicos microscópicos, mostraram-se estatisticamente significativos para o modelo múltiplo: grau de Fuhrman, subtipo histológico, invasão venosa microscópica, invasão do seio renal/tecido perinefrético e N patológico.

Pacientes portadores de tumores de baixo grau tiveram maior SG em relação aos pacientes que tinham tumores de alto grau (77,9% x 56,6%, respectivamente). Tumores cromóforos foram, entre os subtipos histológicos, os que apresentaram a maior sobrevida global, pois não houve mortes relacionadas a esse subtipo. Houve menor sobrevida global em 5 anos para os pacientes portadores de invasão venosa microscópica e seio/gordura renal. Pacientes portadores de tumores sem

acometimento histológico linfonodal (pN0) ou aqueles em que não havia linfonodos no espécime cirúrgico (pNx) tiveram maior sobrevida em relação aos pacientes portadores de N+ ($p=0,001$).

Tabela 18 - Taxas de sobrevida global em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, segundo as variáveis anatomopatológicas microscópicas.

VARIÁVEL	CATEGORIA	N*	SG (Prob. em 5 anos - %)	P (Log rank)
Grau Fuhrman	Baixo grau I e II	65	77,9	0,010**
	Alto grau III e IV	45	56,6	
Subtipo histológico	Células claras	71	67,5	0,028**
	Papilífero	12	73,3	
	Cromóforo	14	100	
	TFE3 Gene	2	50,0	
	Inclassificável	1	45	
Invasão venosa microscópica	Não	83	76,8	0,001**
	Sim	27	49,0	
Invasão seio renal, tecido perinefrético	Não	85	73,9	0,016**
	Sim	25	53,3	
Invasão adrenal	Não	100	70,6	0,582
	Sim	10	39,4	
Margens cirúrgicas	Livres	100	70,9	0,086
	Comprometidas	10	57,1	
N patológico	N0	65	78,9	<0,001**
	N+	12	28,1	
	Nx	33	68,1	

* Excluídos os pacientes com informação incompleta

** Variáveis selecionadas para o modelo de Cox

4.11.4 Estadiamento

Entre as variáveis que influenciaram a sobrevida global estão: estadiamento clínico TNM 2004 e estágio de Robson. A sobrevida global foi maior entre os pacientes portadores de tumores localizados em relação aos demais (91,7% e 71,3% x 59,5 e 22,9%, respectivamente). Apesar do estágio de Robson ter sido estatisticamente significativo na sobrevida global, ele não foi selecionado para o modelo múltiplo.

Tabela 19 - Taxas de sobrevida global em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, segundo os estadiamentos.

<i>VARIÁVEL</i>	<i>CATEGORIA</i>	<i>N*</i>	<i>SG</i> (<i>Prob. em 5 anos</i> - %)	<i>P</i> (<i>Log rank</i>)
Estádio clínico TNM	I	54	91,7	<0,001**
	II	14	71,3	
	III	26	59,5	
	IV	16	22,9	
Estádio de Robson	I	67	84,0	<0,001
	II	17	67,4	
	IIIa	16	42,9	
	IIIb	6	33,3	
	IIIc	1	--	
	IV	3	0,00	

* Excluídos os pacientes com informação incompleta

** Variáveis selecionadas para o modelo de Cox

4.11.5 Análise imunoistoquímica PTEN e Akt e reação de hibridização *in situ*

As expressões imunoistoquímicas do gene PTEN e da proteína Akt não foram estatisticamente significativas na sobrevida global dos pacientes.

Tabela 20 - Taxas de sobrevida global em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, conforme a expressão imunoistoquímica do PTEN e Akt fosforilado.

VARIÁVEL	CATEGORIA	N*	SLD (Prob. em 5 anos - %)	P (Log rank)
PTEN	Hipoexpresso	97	69,1	0,816
	Hiperexpresso	13	74,6	
Akt fosforilado	Hipoexpresso	77	68,7	0,934
	Hiperexpresso	33	71,2	

* Excluídos os pacientes com informação incompleta

Embora existam diferenças entre as taxas de sobrevida global entre os pacientes com deleção à reação de hibridização *in situ* e os pacientes sem deleção, sendo respectivamente, 75,7% *versus* 82,8%, elas não apresentaram significância estatística, pois apresentaram $p=0,468$.

Tabela 21 - Taxas de sobrevida global em 5 anos pelo método de Kaplan-Meier, conforme a presença ou ausência de deleção à hibridização.

VARIÁVEL	CATEGORIA	N*	SLD (Prob. em 5 anos - %)	P (Log rank)
FISH	Sem deleção	23	82,8	0,468
	Com deleção	30	75,7	

* Excluídos os pacientes com informação incompleta

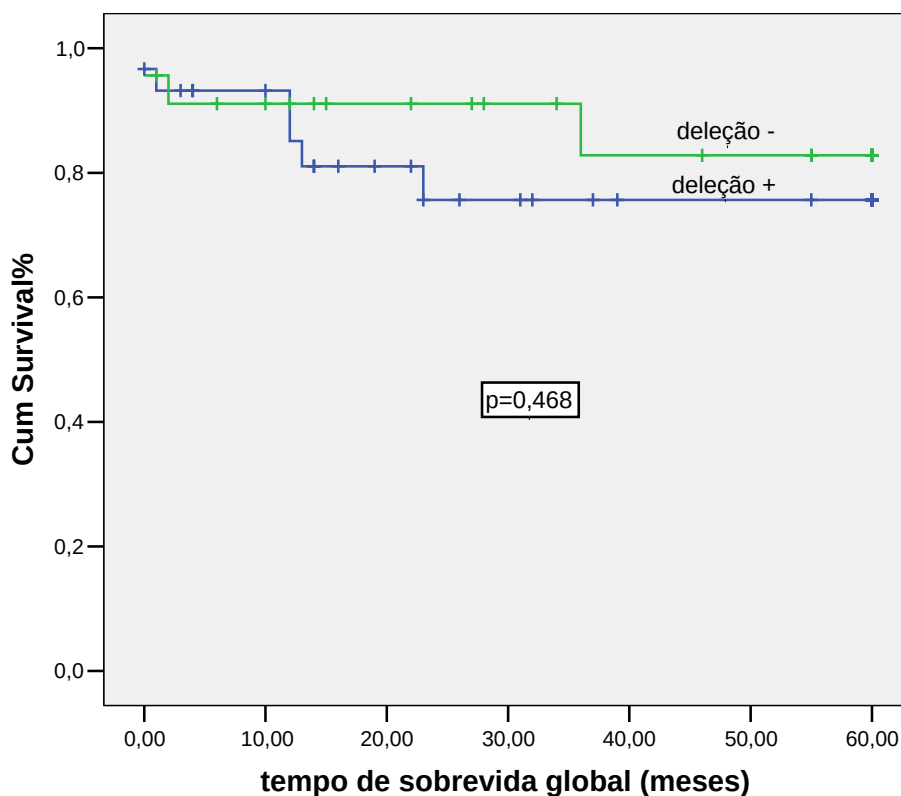


Figura 7 – Curva de sobrevida global em 5 anos conforme a presença ou ausência de deleção à hibridização.

4.12 ANÁLISE PELO MODELO DE COX

4.12.1 Sobrevida livre de doença

Para a sobrevida livre de doença em análise múltipla, somente os estádios clínicos II e III demonstraram significância estatística (HR=4,34 e 12,85; $p=0,02$ e $0,01$, respectivamente), independentemente de sintomatologia ao diagnóstico, topografia renal, invasão venosa microscópica e invasão do seio renal/gordura renal.

Tabela 22 - Sobrevida livre de doença em 5 anos de acordo com o modelo múltiplo.

<i>VARIÁVEL</i>	<i>CATEGORIA</i>	<i>HR</i>	<i>P</i>
Estádio clínico TNM 2004	I	<i>Baseline</i>	
	II	4,34	0,02
	III	12,85	0,01
Sintomatologia ao diagnóstico	Não	<i>Baseline</i>	
	Sim	2,491	0,155
Topografia renal	Superior		0,413
	Médio		0,984
	Inferior	4,340	0,099
	Mais de um pólo	2,405	0,237
Invasão venosa microscópica	Não	<i>Baseline</i>	
	Sim	0,748	0,258
Invasão seio renal/gordura renal	Não	<i>Baseline</i>	
	Sim	1,958	0,287

4.12.3 Sobrevida global

Pela análise múltipla, a sobrevida global dos pacientes foi influenciada, independentemente, pelas seguintes variáveis: estágio clínico IV (HR=7,095; p=0,011), Ecog 1 e 2 (HR=0,28; p=0,01), Karnofski 60/70 (p=0,042), 80 (HR=15,436; p=0,009) e 90 (HR=13,051; p=0,017), sintomatologia ao diagnóstico (HR=3,380; p=0,037), alto grau de Fuhrman (HR=2,421; p=0,057) e recorrência tumoral (HR=3,380; p=0,029). O gene PTEN, através da reação de FISH e IIQ, foi testado em análise múltipla para a sobrevida livre de doença e global, e não houve diferença nas sobrevidas livre de doença (p=0,473 e 0,984, respectivamente) e global (p=0,286 e p=0,524, respectivamente).

Tabela 23 - Sobrevida global em 5 anos de acordo com o modelo múltiplo.

<i>VARIÁVEL</i>	<i>CATEGORIA</i>	<i>HR</i>	<i>P</i>
Estádio clínico TNM	I	<i>Baseline</i>	
	II	1,2	0,829
	III	2,294	0,250
	IV	7,095	0,007
Margens cirúrgicas comprometidas	Não	<i>Baseline</i>	
	Sim	1,217	0,754
Grau Fuhrman	Baixo grau	<i>Baseline</i>	
	Alto grau	2,421	0,057
Sintomatologia ao diagnóstico	Não	<i>Baseline</i>	
	Sim	3,380	0,037
ECOG	0	<i>Baseline</i>	
	1+2	0,28	0,010
Karnofski	60/70	15,436	0,042
	80	13,051	0,009
	90	0,964	0,017
	100	<i>Baseline</i>	0,054
Recorrência	não	<i>Baseline</i>	
	sim	3,380	0,029

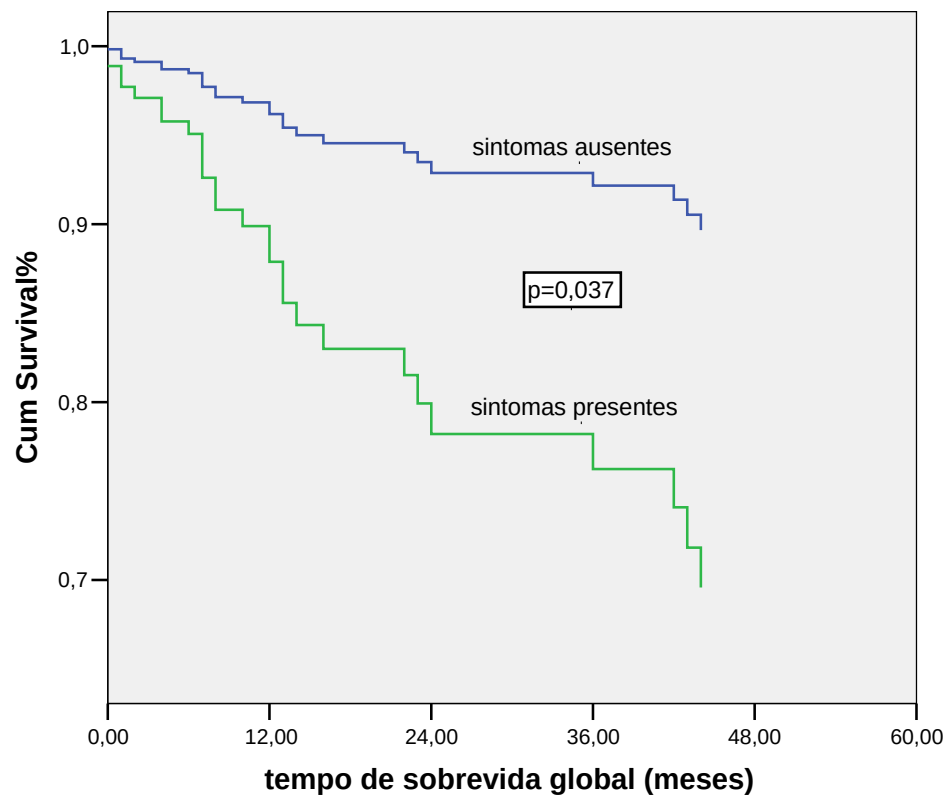


Figura 8 – Curva de sobrevida global pelo modelo múltiplo segundo sintomatologia ao diagnóstico.

5 DISCUSSÃO

O sexo não é um fator prognóstico reconhecido na sobrevida dos pacientes portadores de neoplasia renal. Segundo DHOTE et al. (2000) e GODLEY e ATAGA (2000), os homens são duas vezes mais acometidos que as mulheres.

Em 768 pacientes portadores de carcinoma de células renais tratados cirurgicamente com intenção curativa, ONISHI et al. (2002) não encontraram diferença estatisticamente significativa na sobrevida global entre os sexos; porém, quando os resultados foram ajustados somente pelo subtipo histológico de células claras, houve melhor prognóstico para as mulheres ($p=0,012$). NOMOTO et al. 1999 também demonstraram melhor prognóstico e sobrevida para as pacientes do sexo feminino, por associar-se mais freqüentemente com tumores de menor grau histológico e menores taxas de recorrência.

Neste presente estudo, a neoplasia renal teve freqüência predominante no sexo masculino (61,8%) e semelhante às descritas na literatura. Diferentemente aos achados de ONISHI et al. (2002) e NOMOTO et al. (1999), pacientes do sexo feminino não apresentaram taxas de sobrevida inferiores aos pacientes do sexo masculino. Uma possível explicação para menor sobrevida observada por esses autores em relação ao sexo masculino reside no fato de esses pacientes apresentarem tumores de maior tamanho e estágio mais avançado ao diagnóstico e, conseqüentemente, pior prognóstico.

O CCR acomete geralmente indivíduos com idade entre 50 e 70 anos com idade média ao diagnóstico de 60 anos na forma esporádica e 40 anos nas formas hereditária ou familiar (KIRKALI e OBEK 2003).

Acredita-se que pacientes mais jovens (idade < 40 anos) sejam portadores de tumores mais indiferenciados ao diagnóstico e piores respondedores aos tratamentos adjuvantes ou neoadjuvantes: porém, a idade como um fator prognóstico em neoplasia renal permanece controversa.

Nesta série, a idade média ao diagnóstico foi de 55 anos e 20% dos pacientes apresentavam idade inferior a 45 anos. Idade não foi um fator de pior prognóstico nas taxas de sobrevida global ($p=0,331$) e livre de doença ($p=0,697$) apesar de os pacientes com idade inferior a 44 anos apresentarem menor SLD em 5 anos em relação aos pacientes com idade entre 45 e 59 anos e idade superior a 60 anos, sendo as taxas 54,6%, 76,4% e 80,1%, respectivamente.

Para GRIFFITHS et al. (2002), idade mais jovem ao diagnóstico foi determinante de menor sobrevida em relação aos pacientes de maior idade, pois o diagnóstico foi mais incidental em pacientes mais velhos pela realização mais rotineira de exames de imagem por outros motivos médicos, resultando no diagnóstico de tumores de menor tamanho, assintomáticos e de melhor prognóstico.

De maneira contrária aos resultados de GRIFFITHS et al. (2002) e contando com uma casuística superior, VERHOETS et al. (2004) demonstraram maior sobrevida para os pacientes com idade inferior a 40 anos após a análise dos resultados de 12 instituições européias no tratamento do CCR, selecionando um total de 4474 casos e estratificando-os pela idade em: ≤ 40 , >40 e <60 , >60 e <80 , ≥ 80 . A sobrevida câncer específica em cinco anos dos pacientes com idade menor que 40

anos foi estatisticamente superior aos demais e, respectivamente, de 85% x 74% x 70% x 69%.

O *performance status*, através da graduação de Karnofski e Ecog, faz uma avaliação do impacto que a neoplasia causa na saúde global dos pacientes. Nos 110 pacientes analisados neste estudo, o PS foi avaliado inicialmente através do Karnofski e posteriormente convertido pelo autor nos índices de Ecog por meio de uma escala (Anexo 2).

Apesar de critérios subjetivos serem utilizados na definição do Karnofski e Ecog, o *performance status* foi um fator prognóstico significativo nas sobrevidas livre de doença e global, semelhantemente aos achados de UNO et al. (2004) e KARAKIEWICZ et al. (2007). UNO et al. (2004) analisaram retrospectivamente 482 pacientes submetidos à nefrectomia com intenção curativa, e o Ecog foi o principal fator prognóstico na sobrevida desses pacientes, seguido em ordem decrescente por invasão vascular venosa, grau histológico e modo de infiltração tumoral. Em 2570 pacientes portadores de CCR tratados, KARAKIEWICZ et al. (2007) demonstraram que o *performance status* avaliado através do Ecog foi, em análise multivariada, um fator prognóstico significativo na sobrevida câncer específica, pois pacientes com Ecog 1 tiveram um risco de morte por câncer 3,4 vezes maior que pacientes Ecog 0.

Nesta série, o *performance status* foi importante somente na sobrevida global no modelo múltiplo. Pacientes com Ecog 1 ou 2 tiveram 28% mais chance de morte que os pacientes Ecog 0 (HR=0,28, p=0,010), assim como pacientes com Karnofski inferior a 90% tiveram menor sobrevida global em relação a índices superiores (p=0,007). O Ecog apresentou valor prognóstico similar ao Karnofski e tem a vantagem de ser composto por cinco itens, demonstrando maior praticidade.

O *performance status* é o principal fator prognóstico em pacientes portadores de CCR metastático, sendo importante na seleção de pacientes candidatos a nefrectomia citorrredutora e interleucina em altas doses. Nesta série, o PS foi um fator prognóstico nas sobrevidas de pacientes portadores de metástase a distância ou não, demonstrando que pode ser estendido para outros estádios e não somente aplicado ao estágio clínico IV.

Os tumores renais crescem, geralmente, sem produzir sintomas devido à sua localização retroperitoneal. Quando atingem dimensões maiores é que ocasionam sintomas como dor ou sangramento urinário, bem como a invasão de estruturas vizinhas. Alguns autores têm encontrado a presença de sintomatologia ao diagnóstico como um fator de pior prognóstico (HARADA et al. 2005; KARAKIEWICZ et al. 2006).

Neste presente estudo, um único paciente apresentou a tríade clássica de hematúria, dor lombar e massa palpável no flanco, que segundo KIRKALI e OBEK (2003), está presente em até 10% dos pacientes, notando-se apesar de que dor lombar que corresponde a 30% dos sintomas, e hematúria, a 27,3%, tenham sido os sintomas mais freqüentes. A tríade, geralmente, está relacionada à ocorrência de tumores avançados ao diagnóstico.

HARADA et al. (2005) e KARAKIEWICZ et al. (2006) demonstraram menores taxas de sobrevida, em modelo múltiplo, para os pacientes portadores de sintomas ao diagnóstico em relação aos pacientes assintomáticos ao diagnóstico inicial.

Hoje em dia, mais de 50% das neoplasias renais são detectadas em fase assintomática e de maneira incidental (DHOTE et al. 2000; PANTUCK et al. 2001; FICARRA et al. 2003).

Nesta série, a maioria dos pacientes (60%) eram portadores de sintomas ao diagnóstico. Esse número reflete a influência de dois fatores: a casuística deste estudo é composta por pacientes tratados nesta instituição desde 1980 até o presente, quando a maioria dos tumores renais era diagnosticada tardiamente, assim como não era rotineira a solicitação de exames de imagem por outros motivos médicos, como se faz atualmente. Segundo CHOW et al. (1999), entre os anos de 1986 e 1994 houve uma duplicação na indicação de exames complementares como tomografias e ressonâncias, resultando em maior número de tumores renais diagnosticados assintomáticos e incidentalmente.

Na análise univariada e pelo modelo de Cox, sintomatologia ao diagnóstico foi um fator que afetou significativamente a sobrevida global em análise univariada e múltipla ($p=0,004$ e $p=0,037$, respectivamente). Os pacientes com sintomas ao diagnóstico tiveram SG em 5 anos de 60% *versus* 84,1% para os pacientes assintomáticos. A sobrevida livre de doença não foi influenciada no modelo múltiplo por sintomatologia ao diagnóstico.

Diversos autores têm demonstrado o impacto do diagnóstico incidental de tumores renais na sobrevida dos pacientes (SWEENEY et al 1996; PANTUCK et al. 2001; FICARRA et al. 2003; LEIBOVICH et al. 2004). Nos 110 pacientes analisados, 44 (40%) apresentaram diagnóstico incidental e a sobrevida global desses pacientes foi estatisticamente maior em relação aos pacientes sintomáticos ao diagnóstico (84,1% x 60%, $p=0,004$). De maneira semelhante à sintomatologia ao

diagnóstico, o diagnóstico incidental foi uma variável independente na sobrevida global dos pacientes, estando mais frequentemente associado à presença de tumores de melhor prognóstico, localizados e assintomáticos.

Cerca de 2% a 4% dos tumores renais diagnosticados são hereditários (MAYNARD e OHN 2004). Nesta série, três pacientes (2,7%) apresentaram carcinoma de células renais hereditário, diagnosticado clinicamente. Não houve diferenças nas taxas de sobrevidas livre de doença e global entre os pacientes com ou sem tumor hereditário, apesar da maior frequência de multifocalidade e bilateralidade observada em tumores renais hereditários.

LAM et al. (2005) demonstraram que metástases ao diagnóstico estão presentes em 20% a 30% dos pacientes portadores de neoplasia renal. Segundo MOTZER et al. (1999), a presença de metástases ao diagnóstico determinou sobrevida em 5 anos inferior a 10%, quando comparado a 64% dos pacientes sem metástases ao diagnóstico (LIPWORTH et al. 2006). Para SAWCZUK e POLLARD (1999), a mortalidade chega a 50% em seis meses após o diagnóstico.

Neste presente estudo, a frequência de metástase ao diagnóstico foi inferior à encontrada na literatura e presente em 16 pacientes (14,5%). Pode ser que a menor frequência de metástases observada neste estudo seja decorrente da maior ocorrência de tumores em estágio localizado e não associados a achados adversos como: invasão de gordura perirrenal, invasão vascular ou acometimento linfonodal. A sobrevida global em 1,3 e 5 anos foi, respectivamente, de 47,1%, 31,4% e 0%. Nos pacientes sem metástases ao diagnóstico a SG foi de 76,2% em 5 anos. Na análise univariada, metástase ao diagnóstico foi uma variável significativa na sobrevida global, pois apresentou $p < 0,001$.

O tratamento principal da neoplasia renal consiste na ressecção completa do tumor, que pode ser realizada através de nefrectomia radical ou parcial. Segundo SCHLOMER et al. (2006), a nefrectomia parcial corresponde a 31% a 42% dos procedimentos cirúrgicos e está indicada para tumores com tamanho inferior a quatro centímetros (pT1a). Nesta série, nefrectomia parcial foi realizada em 28 pacientes (25,5%) está de acordo com a frequência de tumores pT1a e foi observada em 24 casos (21,8%). Os quatro casos restantes em que foi realizada a nefrectomia parcial, foram tumores com tamanho entre quatro e sete centímetros, mas sem invasão de sistema coletor e localizados em pólo renal superior ou inferior, possibilitando a ressecção parcial renal. A nefrectomia radical foi realizada em 82 pacientes (74,5%), e continua sendo a principal e mais freqüente modalidade terapêutica no tratamento do CCR.

Não houve diferenças estatisticamente significativas nas sobrevidas global e livre de doença em relação ao procedimento cirúrgico, embora tenha sido observada uma tendência para maior SG nos pacientes submetidos à nefrectomia parcial em relação à nefrectomia radical (78,1% *versus* 66%, $p=0,294$). Essa tendência observada é decorrente do fato de nefrectomia parcial estar indicada no tratamento de tumores menores e localizados sem linfonodomegalia no intraoperatório.

Complicações cirúrgicas precoces e tardias ocorreram com frequências semelhantes, sendo insuficiência renal a complicação mais freqüentemente observada. As taxas de sobrevida global e livre de doença dos pacientes não foram afetadas pela presença de complicações cirúrgicas precoces ou tardias ($p=0,637$ e $0,670$; $0,587$ e $0,926$, respectivamente).

Diversos autores têm demonstrado que insuficiência renal crônica (IRC) ocorre mais frequentemente após nefrectomia radical quando comparada à nefrectomia parcial (LEIBOVICH et al. 2004; LESAGE et al. 2007). Neste estudo, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois tipos de cirurgia em relação às complicações cirúrgicas precoces ($p=0,084$) ou tardias ($p=0,341$). Portanto, a nefrectomia radical não determinou maior ocorrência de IRC em relação ao procedimento parcial.

Nesta série, 31 pacientes (31,7%) apresentaram recorrência sistêmica ou local. Para SAWCZUK e POLLARD (1999), metástases durante o seguimento ocorrem em de 30% a 40% dos pacientes portadores de tumores renais tratados com intenção curativa. Segundo MEJEAN et al. (2003); SENGUPTA et al. (2005) e TOYODA et al. (2006), pulmão e osso são os sítios metastáticos mais frequentes, sendo cirurgia, radioterapia e imunoterapia as principais modalidades terapêuticas empregadas na doença metastática.

Neste estudo, os sítios mais frequentes foram: pulmão (22,6%), osso (22,6%) e local (9,7%). Em 29% dos casos havia mais de um sítio metastático. Radioterapia, cirurgia e imunoterapia foram os principais tratamentos empregados na recorrência e que, no futuro, podem vir a ser modificados pela recente incorporação das terapias baseadas em alvos moleculares no tratamento da doença metastática e que têm produzido taxas de resposta superiores aos tratamentos oncológicos convencionais (SCHOFFSKI et al. 2006).

A sobrevida global dos pacientes portadores de doença recorrente foi significativamente inferior à sobrevida dos pacientes que não apresentaram recorrência (76,2% versus 34,8%, $p<0,001$). A presença de recorrência tumoral

após tratamento cirúrgico radical curativo foi um fator independente de pior prognóstico na sobrevida global ($p=0,029$). A pior sobrevida para os pacientes com recorrência tumoral é explicada pela falta de tratamento eficaz da recidiva, já que, em muitas vezes, a cirurgia de resgate não é possível e a neoplasia renal é resistente a tratamentos oncológicos convencionais.

Não foram encontrados estudos que demonstrassem a importância da topografia da neoplasia renal nas sobrevidas global e livre de doença de pacientes portadores de CCR. Nos 110 pacientes analisados, a topografia da lesão renal foi um fator significativo nas sobrevidas global ($p=0,001$) e livre de doença ($p=0,048$), pela análise univariada. Em modelo múltiplo, após o ajuste com o estadiamento clínico patológico, não foi uma variável significativa. A topografia renal está relacionada com o tamanho tumoral, sendo que as menores sobrevidas foram observadas nos tumores que acometiam mais de um pólo renal e, conseqüentemente, apresentavam maior tamanho em relação aos tumores que acometiam um único pólo.

A classificação histológica proposta por FURHMAN et al. (1982) é a mais utilizada nos Estados Unidos e na Europa (FICARRA et al. 2005). Ela faz uma avaliação do tamanho, formato e conteúdo do núcleo e nucléolo. Varia de grau 1 a 4 conforme aumentam as desproporções entre célula e núcleo e surgem irregularidades no formato e conteúdo celular (FURHMAN et al. 1982).

Apesar de a graduação de Fuhrman estar sujeita às variações intra e inter observadores e também à grande heterogeneidade das neoplasias renais, é um dos principais fatores prognósticos no CCR, em conjunto com o estadiamento clínico e anatomopatológico.

Atualmente, os tumores malignos renais são classificados em baixo grau, graus 1 e 2, e alto grau, graus 3 e 4 com a finalidade de reduzir a variância intraobservadores. Segundo AL-AYNATI et al. (2003) houve redução de 53% na variância intraobservadores com a classificação dos tumores renais em alto e baixo grau (HSU et al. 2004; FICARRA et al. 2005).

Neste estudo, predominaram os tumores de baixo grau: presentes em 65 pacientes (59,1%), enquanto 45 pacientes (40,5%) eram portadores de tumores de alto grau. O predomínio de tumores de baixo grau nesta série pode ser explicado pela maior ocorrência de tumores localizados e de dimensões menores (EC I e II), pois segundo GUDBJARTSSON et al. (2005), tumores de alto grau estão associados freqüentemente a tumores maiores e metastáticos (EC III e IV). As sobrevidas foram de 77,9% e 56,6%, respectivamente, para os pacientes com tumores de baixo grau e alto grau ($p=0,010$). Em modelo múltiplo, o grau 4 de Fuhrman foi um fator independente de pior prognóstico na sobrevida global ($p=0,057$), pois atingiu o limite da significância.

FUHRMAN et al. (1982) demonstraram diferentes taxas de sobrevida entre os graus 1, 2, 3 e 4 sendo, respectivamente, de 64%, 34%, 31% e 10%. GUDBJARTSSON et al. (2005) confirmaram a importância prognóstica do grau de Fuhrman na sobrevida livre de doença de 629 pacientes portadores de CCR tratados por cirurgia. As sobrevidas em cinco anos para os graus 1, 2, 3 e 4 foram, respectivamente, de 87,3%, 70,5%, 49,5% e 14,5%. O grau 4 de Fuhrman foi um fator independente de pior prognóstico na SLD desses pacientes.

Apesar de os tumores sólidos renais terem sofrido modificações em sua classificação histológica em 2004 pelo melhor conhecimento histológico, citológico

e molecular das neoplasias renais (BRUDER et al. 2004), o impacto do subtipo histológico nas sobrevidas dos pacientes portadores de CCR é controverso.

O subtipo de células claras é o mais freqüente, correspondendo a 70% - 80% dos subtipos, o papilífero é o segundo subtipo mais freqüente com 10 - 20%, o cromóforo com 5%, inclassificável com 5% e o carcinoma dos ductos coletores corresponde a 1% (AMIN et al. 2002; CINDOLO et al. 2005; LAM et al. 2005). Diversos autores têm demonstrado pior prognóstico para a variante de células claras em relação aos demais subtipos (CHEVILLE et al. 2003; KONTAK e CAMPBELL. 2003; FICARRA et al. 2006).

Nesta série, a freqüência entre os diferentes subtipos foi diferente das encontradas na literatura, já que tumores cromóforos foram mais freqüentes que papilíferos. Essa diferença observada deve-se ao acaso e em alguns casos o patologista dispunha de uma única lâmina para a revisão não possibilitando que outros cortes fossem feitos para a confirmação histológica. O subtipo de células claras esteve presente em 71 pacientes (64,5%), papilífero em 12 pacientes (10,9%), cromóforo em 14 pacientes (12,7%), inclassificável em 10 pacientes (9,1%), TFE3 gene em dois pacientes (1,8%) e ductos coletores em 1 paciente (0,9%).

As taxas de sobrevida global em cinco anos foram respectivamente para os subtipos: 67,5%, 73,3%, 100%, 50%, 45% e 0%. O subtipo histológico foi uma variável significativa na sobrevida global dos 110 pacientes, não sendo confirmada no modelo de Cox após o ajuste com o estágio clínico patológico. Em casuísticas de 377, 628 e 4.053 pacientes tratados cirurgicamente, AMIN et al. (2002), GUDBJARTSSON et al. (2005) e PATARD et al. (2005), respectivamente, não encontraram associação entre subtipo histológico e sobrevida no modelo múltiplo.

Entre os subtipos histológicos, os pacientes portadores de tumores cromófbos tiveram as maiores sobrevidas atingindo 100% em 5 anos, iguais às demonstradas por AMIN et al. (2002) e FICARRA et al. (2006). Para muitos autores, o subtipo cromófbico apresenta o melhor prognóstico em relação aos demais subtipos (MOCH et al. 2000; AMIN et al. 2002; CINDOLO et al. 2005).

Para VAN POPPEL et al. (1997), a invasão venosa microscópica é um dos principais fatores prognósticos e determinantes da sobrevida de pacientes submetidos à nefrectomia radical curativa e está presente em 25% - 28% das neoplasias renais (VAN POPPEL et al. 1997).

GONÇALVES et al. (2004) analisaram a influência da invasão venosa microscópica na sobrevida de 95 pacientes portadores de neoplasia renal localizada, tratados cirurgicamente. Em 24 pacientes (25%) havia invasão venosa microscópica. Recorrência tumoral foi observada em 12 pacientes (50%) que apresentavam invasão venosa microscópica e em quatro pacientes (6%) que não a apresentavam. No modelo múltiplo, invasão venosa microscópica foi uma variável independente na sobrevida livre de doença dos pacientes analisados.

No grupo de 110 pacientes analisados, invasão venosa microscópica esteve presente em 27 pacientes (24,5%), com frequência semelhante à encontrada por VAN POPPEL et al. (1997) e GONÇALVES et al. (2004). Os pacientes com invasão venosa microscópica tiveram sobrevida global em 5 anos de 49% versus 76,8% entre aqueles que não a apresentavam. A sobrevida livre de doença em 5 anos foi de 44,6% para os pacientes com invasão venosa microscópica e 73,6% para os pacientes sem invasão venosa microscópica. A análise univariada mostrou que a presença de

invasão venosa microscópica foi determinante de menor sobrevida livre de doença ($p=0,002$) e global ($p=0,001$).

A pesquisa de invasão venosa microscópica é um procedimento simples e não é influenciada por fatores subjetivos como a gradação de Fuhrman e *performance status*. A hematoxilina-eosina é, na maioria das vezes, suficiente para determinar a presença ou a ausência de invasão. Em casos de dúvida, a imunoistoquímica ajuda a esclarecer através de anticorpos anti-VIII ou anti-CD34 (LANG et al. 2004).

Há duas classificações utilizadas no estadiamento do CCR: o TNM modificado em 2004 (SOBIN e WITTEKIND 2004), e a classificação de Robson proposta inicialmente em 1969 (ROBSON et al. 1969) (Anexo 3). Apesar de a classificação de Robson ter como vantagem a sua praticidade, ela apresenta limitações por incluir no mesmo estágio tumores de prognósticos e condutas diferentes. Por esse motivo não foi selecionada para o modelo múltiplo.

A classificação TNM é mais utilizada e faz uma avaliação do tamanho do tumor primário (T), extensão de doença linfonodal (N) e presença ou ausência de metástases (M). Pacientes com mesmo tamanho tumoral podem apresentar variações das classificações N e M, diferenciando-os de acordo com o prognóstico. Em 2002 ela sofreu modificações, quando promoveu principalmente a subdivisão do estágio I em T1a (tumores de até 4cm) e T1b (tumores de 4cm a 7cm), e os tumores T3 reclassificados em T3a e T3b.

Nesta série, cerca de 50% dos tumores tratados apresentavam tamanho de até sete centímetros, e taxas de sobrevida global em cinco anos de 95,8% e 86,3%, para tumores pT1a e pT1b, respectivamente. Essas taxas foram significativamente maiores em relação aos tumores pT2, pT3a, pT3b e pT4, sendo, 71,5%, 57,1%,

46,3% e 0%, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com os achados de UNO et al. (2004) e ISHIMURA et al. (2004b), nos quais, o tamanho tumoral patológico foi uma variável significativa nas sobrevidas global e livre de doença dos pacientes em análise univariada ($p < 0,001$), mas não confirmando sua significância no modelo múltiplo.

Semelhante aos resultados de PANTUCK et al. (2001) e HYUNG et al. (2005), os tumores renais menores (até 7 cm) e localizados (pT1a, pT1b), apresentaram maior sobrevida em relação aos tumores maiores e com achados adversos como invasão direta de glândula adrenal, invasão venosa ou metástase linfonodal.

A importância do tamanho tumoral nas taxas de sobrevida é controversa e deve ser considerada mais nos tumores localizados (EC I e II TNM) em que não há outros fatores de pior prognóstico. O tamanho tumoral está fortemente associado ao estágio patológico.

A presença de doença linfonodal histologicamente positiva (pN+) ou metastática (M1) é determinante de pior prognóstico (PANTUCK et al. 2003b). Linfonodos histologicamente positivos estão presentes em 2% a 10% dos carcinomas renais e a sobrevida em cinco anos destes pacientes varia de 11 a 35% (PANTUCK 2003b; LAM et al. 2005; KARAKIEWICZ et al. 2007).

Entre os 110 pacientes analisados neste estudo, 65 pacientes (59,1%) eram pN0, 33 pacientes (30,0%) pNx e 12 pacientes (10,9%) apresentavam pN+. KARAKIEWICZ et al. (2007) identificaram 241 pacientes (9,4%) com linfonodos histologicamente positivos entre 2570 pacientes tratados e com frequência semelhante à encontrada no presente estudo.

A frequência elevada de pNx é justificada pela linfadenectomia não ser um procedimento padrão no tratamento do CCR, pois um único estudo prospectivo e randomizado com 772 pacientes portadores de neoplasia renal localizada não demonstrou aumento nas sobrevidas global e livre de doença em 5 anos nos pacientes tratados com linfadenectomia retroperitoneal além da nefrectomia (BLOM et al. 1999). A frequência de pNx pode chegar até 40% dos pacientes (CHEVILLE et al. 2003).

As taxas de sobrevida global em 5 anos para os pacientes pN0, pNx e pN+ foram de 78,9%, 68,1% e 28,1%, respectivamente. Na análise univariada, o *status* linfonodal patológico foi um fator significativo nas taxas de sobrevida global, não confirmando sua significância através do modelo múltiplo. Analisando somente os pacientes pN0 e pNx, não houve diferença significativa entre as taxas de sobrevida global ($p=0,485$), e isso reflete a capacidade do cirurgião em julgar corretamente a necessidade de realizar ou não a linfadenectomia no intra-operatório a partir da identificação de tumores de maior risco para metástase linfonodal, que correspondem àqueles maiores de cinco centímetros, necróticos e não incidentais ao diagnóstico.

Em 2385 pacientes avaliados, CHEVILLE et al. (2003) encontraram 800 pacientes (40,3%) pNx, 1082 pacientes (54,5%) pN0 e 103 pacientes (5,2%) portadores de linfonodos histologicamente positivos. Em análise univariada, a presença de pN+ foi fator de pior prognóstico na sobrevida livre de doença dos pacientes ($HR=3,34$; $p<0,001$).

No presente estudo, 54 pacientes (49,1%) foram estadiados como estágio clínico I (EC I), 14 pacientes (12,7%) como EC II, 26 pacientes (23,6%) EC III e 16 pacientes (14,5%) como EC IV. O estadiamento TNM (SOBIN e WITTEKIND

2004) foi uma variável estatisticamente significativa nas sobrevidas livre de doença e global, na análise univariada e múltipla. O maior risco de morte foi observado entre os pacientes portadores de estádios III e IV. Certamente, o estágio TNM é a variável de maior valor prognóstico no CCR, assim como em outras neoplasias.

GUDBJARTSSON et al. (2005) encontraram taxas de sobrevida livre de doença de 92,9%, 79,8%, 54,6% e 11,4% para os estádios I, II, III e IV, respectivamente. O estágio clínico TNM 2004 foi uma variável independente na SLD dos 628 pacientes analisados.

A imunoistoquímica faz uma avaliação da proteína mediante uma reação antígeno-anticorpo. Para a análise dos resultados, é importante a padronização das reações e da leitura das lâminas, como também dos escores que são atribuídos aos resultados, para reduzir variações interobservadores e permitir a comparação dos resultados entre diferentes instituições.

PALLARES et al. (2005) também demonstraram a importância da escolha correta do anticorpo no estudo IIQ. Em 95 amostras de neoplasia de endométrio presentes no TMA, um único anticorpo anti-PTEN demonstrou maior correlação com as alterações moleculares do mesmo gene detectadas através de reação de polimerase em cadeia entre quatro anticorpos testados.

Neste presente estudo, hipoexpressão do PTEN foi encontrada em 97 amostras (88,2%) dos 110 analisados, com frequência superior à encontrada na literatura. Somente 13 pacientes (11,8%) apresentaram expressão positiva e normal para o PTEN. Essa frequência de hipoexpressão IIQ do PTEN em CCR é observada em neoplasias endometriais, em que alterações do PTEN são encontradas em até 80% dos casos (PALLARES et al. 2005).

Perda de antigenicidade do material deve ser considerada como um potencial fator de prejuízo à reação, pois o formol tamponado a 10% que melhor preserva as características antigênicas teciduais foi incorporado como rotina na instituição na fixação das peças cirúrgicas a partir de 1996, sendo esse estudo constituído por pacientes tratados desde 1980.

Neste presente estudo, houve correlação baixa e não significativa entre a IIQ e hibridização *in situ* para o PTEN ($\kappa=0,146$, $p=0,235$). Nesta análise, a falta de correlação entre os métodos testados deve ser interpretada com cautela, pois a reação de hibridização foi passível de leitura em cerca de metade dos 110 casos inicialmente testados. Houve concordância bruta em 32 casos, pois, em 25 em que havia deleção do PTEN, havia hipoexpressão à IIQ, e em 7 casos sem deleção a expressão IIQ do PTEN estava normal. Deleção do PTEN não ocasionou a maior hipoexpressão imunoistoquímica observada.

A hipoexpressão IIQ do PTEN pode ser explicada parcialmente, pois o gene PTEN também não foi investigado quanto à presença de mutação e de eventos epigenéticos, principalmente a metilação que são importantes mecanismos de inativação. Além disso, a imunoistoquímica do PTEN não é influenciada por um pseudogene localizado no cromossomo 9p21 e que apresenta 98% de mesma sequência nucleotídica ao verdadeiro PTEN, diferentemente da pesquisa de mutação e metilação em que o pseudogene pode interferir na análise dos resultados (SALVENSEN et al. 2004).

Alguns estudos demonstram correlação entre a hipoexpressão imunoistoquímica do PTEN e a ação do TGF β 1 e da quinase CK2. Segundo EBERT et al. (2002), o PTEN é controlado pelo TGF β 1, e, em carcinoma de pâncreas, houve

correlação entre hipoexpressão IIQ do PTEN e hiperexpressão do TGF β 1. Pode ser que a elevada frequência de hipoexpressão do PTEN observada em CCR seja decorrente da maior atividade do TGF β 1 comocidentificado em câncer de pâncreas. Para VAZQUEZ et al. (2000), a proteína PTEN é regulada por quinases, principalmente a quinase CK2. A maior atividade dessa quinase pode causar maior fosforilação da porção terminal da proteína e conseqüente redução de sua atividade, podendo resultar em maior hipoexpressão IIQ.

Em relação às taxas de sobrevida, a hipoexpressão do PTEN não afetou com significância estatística a SG e a SLD, embora tenha sido identificada uma tendência para menor sobrevida entre os pacientes portadores de hipoexpressão IIQ. A sobrevida global em 5 anos dos pacientes com hipoexpressão foi de 69,1%, comparados a 74,6% dos pacientes com hiperexpressão ($p=0,816$). Em relação à sobrevida livre de doença, apesar dos resultados não serem significativos, não ocorreram recidivas nos pacientes com expressão positiva ($p=0,272$) e a sobrevida foi de 86%, enquanto nos pacientes com expressão negativa a SLD foi de 73,3% ($p=0,272$).

Apesar de contar com uma casuística inferior e composta por 67 pacientes, LEE et al. (2003) demonstraram em análise univariada menor sobrevida para os pacientes portadores de hipoexpressão imunoistoquímica do PTEN. A metodologia de análise IIQ foi semelhante à empregada nesta série. Somente o estágio TNM foi significativo no modelo de Cox ($p<0,001$).

O Akt é uma das proteínas controladas pelo PTEN, e sua hiperexpressão imunoistoquímica nas neoplasias pode ser decorrente de ação de diferentes

estímulos, entre eles, alterações do gene PTEN (HILL e HEMMINGS 2002; ATHKINS et al. 2004; BEUVINK et al. 2005; LAM et al. 2005).

HORIGUCHI et al. (2003) avaliaram a expressão da proteína Akt fosforilada em 48 amostras tumorais de pacientes portadores de CCR. Hiperexpressão de Akt foi identificada em 18 amostras (37,5%) e hipoexpressão em 30 (62,5%). A hiperexpressão do Akt correlacionou-se com tumores metastáticos e alto grau histológico ($p=0,004$ e $p=0,03$, respectivamente). Em análise univariada, a sobrevida câncer específica foi influenciada negativamente pela hiperexpressão da proteína Akt ($p=0,01$). Neste estudo, não foi verificado o *status* do gene PTEN.

Neste presente estudo, das 110 amostras de CCR analisadas, 77 amostras (60%) apresentavam o Akt hipoexpresso e em 33 (40%) o Akt estava hiperexpresso à imunohistoquímica. A frequência de Akt hiperexpresso foi semelhante à encontrada por HORIGUCHI et al. (2003) e próxima dos 40%.

Há diferentes formas de ativação da proteína Akt, e por esse motivo utilizam-se dois anticorpos para sua análise (HORIGUCHI et al. 2003; HARA et al. 2005). O anticorpo anti-Akt total faz uma avaliação da proteína Akt total ativa e inativa, enquanto o anticorpo anti-Akt fosforilado avalia somente se a hiperexpressão da proteína é decorrente de sua fosforilação. Nos casos com a proteína Akt hiperexpressa, a positividade pode ser decorrente da maior quantidade de proteína Akt total, assim como por aumento da fosforilação, que é importante na carcinogênese. No presente estudo, o Akt total apresentou a mesma frequência que o Akt fosforilado, demonstrando que os casos hiperexpressos não foram conseqüentes do aumento total de Akt, mas sim de sua fosforilação.

A expressão da proteína Akt fosforilada não foi um fator significativo nas sobrevidas global e livre de doença, na análise univariada, apesar de os pacientes com proteína Akt fosforilada hiperexpressa terem apresentado sobrevida livre de doença em 5 anos de 66,3% comparados aos pacientes com Akt hipoexpresso de 76,8% em 5 anos ($p=0,705$).

HARA et al. (2005), em 45 neoplasias renais analisadas através de Western Blot, encontraram maior frequência de proteína Akt fosforilada e maior frequência de hipoexpressão do PTEN em relação ao tecido normal ($p<0,001$ e $p=0,0360$, respectivamente). A proteína Akt estava hiperexpressa nas amostras com hipoexpressão do PTEN, sendo significativo esse achado somente para o subtipo de células claras. Não foram correlacionados os resultados obtidos com as sobrevidas global e livre de doença.

Em neoplasias de endométrio e pulmão não de pequenas células, houve associação significativa entre a hipoexpressão IIQ do PTEN com a hiperexpressão do Akt (PALLARES et al. 2005; TANG et al. 2006).

Nesta série não houve associação significativa entre hiperexpressão da proteína Akt e hipoexpressão do PTEN à imunoistoquímica, apesar de que, dos 33 pacientes com proteína Akt hiperexpressa, 32 apresentavam PTEN hipoexpresso ($p=0,053$). Observou-se maior probabilidade dos pacientes com PTEN hipoexpresso à IIQ apresentarem Akt hiperexpresso. Neste estudo, a hipoexpressão do PTEN não foi uma possível causa para a maior ativação do Akt.

A CTPM (*carboxy terminal modulator protein*) é uma das proteínas que regulam normalmente a atividade do Akt, por reduzir a fosforilação do sítio 473 junto à membrana plasmática. Uma menor atividade dessa proteína pode resultar em

maior atividade da proteína Akt, assim como a menor atividade das proteínas SHIP (*SH2 containing inositol phosphatase*) que atuam de maneira semelhante à CTMP no controle normal do Akt (OSAKI et al. 2004).

O gene PI3KCA, localizado no cromossomo 3, codifica uma proteína com atividade quinase e chamada PI3K, que estimula a ação de outras proteínas efetoras/sinalizadoras do ciclo celular, através de seu segundo mensageiro PIP3.

Segundo SHAYESTEH et al. (1999), o ganho alélico do PI3KCA, identificado através de hibridização *in situ* em carcinoma de ovário, resultou em maior atividade transcricional do gene PI3KCA e em maior expressão do PI3K avaliada por meio de western blot. SAMUELS et al. (2004) demonstraram em carcinoma colorretal a presença de 32% de mutação do PI3KCA em 74 amostras analisadas através de reação de polimerase em cadeia. Em carcinoma de ovário, SCHRAMI et al. (2003) identificaram o ganho alélico no cromossomo 3 (PI3KCA) como a alteração genética mais freqüente e pesquisada através de CGH (*comparative genomic hybridization*). Para MA et al. (2000), a maior atividade do PI3K pode ser decorrente do estímulo da interleucina 4 através da ação da proteína quinase p85.

Assim, a presença de mutação, amplificação ou ganho alélico do PI3KCA pode resultar em maior atividade do PI3K e conseqüente amplificação ou ativação do Akt, ocasionando maior atividade proliferativa celular e resistência a apoptose (SHAYESTEH et al. 1999). Pode ser que alterações do gene PI3KCA e a maior atividade do PI3K sejam os mecanismos causadores da hiperexpressão de Akt observada no CCR.

A técnica de hibridização *in situ*, permite a avaliação do gene através da adição de sondas específicas, identificando alterações numéricas ou estruturais. É um

método mais sensível que a IIQ (JAMBHEKAR et al. 2006; LAMBROS et al. 2007). IQBAL et al. (1999) e BAROCAS et al. (2006) demonstraram a importância da técnica de hibridização *in situ* no diagnóstico dos diferentes subtipos histológicos no CCR.

Nesta série, dos 110 casos selecionados para a reação de hibridização *in situ*, a leitura dos resultados foi possível em 53 casos (48,2%) por diferentes motivos técnicos. Um dos maiores problemas observados neste estudo e referente ao FISH, foi a distinção entre o sinal específico e a coloração de fundo, já que fatores como concentração da sonda, digestão enzimática, e lavagem pós-hibridização podem determinar sua ligação com outros componentes teciduais. Para o sucesso da reação, é importante que sejam seguidos critérios rigorosos relativos à preservação do tecido, preparação da sonda e reagentes e otimização das condições da reação. Essas medidas permitem reduzir a interferência de fatores técnicos na análise dos resultados (VALENZUELA et al. 2006).

Nos 53 casos, deleção hemizigótica foi a alteração mais freqüente e presente em 18 casos (34,0%), seguido de monossomia em nove casos (17,0%), deleção homozigótica em três casos (5,7%) e trissomia em dois casos (3,8%). Em 21 casos (39,6%) a reação de hibridização foi normal. Deleção e trissomia do PTEN foram menos freqüentes em relação às freqüências descritas na literatura e foram de 45% e 3%, respectivamente (GESK et al. 2000). Monossomia esteve presente em nove amostras (17%), diferentemente dos achados de GESK et al. (2000) que não encontraram nenhum caso de monossomia em 23 carcinomas de células claras, analisados através de reação de hibridização *in situ*.

DAL CLIN et al. (1992) analisaram, através de reação de hibridização *in situ*, a frequência de trissomia do PTEN em 17 amostras de CCR provenientes de 17 pacientes submetidos à nefrectomia. Trissomia foi encontrada em cinco pacientes (30%). Tanto DAL CLIN et al. (1992), quanto GESK et al. (2000) não correlacionaram os achados ao FISH com a sobrevida ou fatores prognósticos em CCR.

Em glioblastoma multiforme deleção do PTEN foi determinante de menor sobrevida global no modelo múltiplo em 44 casos analisados (KORSHUNOV et al. 2005). Este presente estudo contou com mesma metodologia e tipo de sonda utilizada para o PTEN (centrômero e locus específica) a empregada por KORSHUNOV et al. (2005). Embora os pacientes portadores de deleção apresentassem menores taxas de sobrevida global e livre de doença em relação aos pacientes não portadores de deleção, essas diferenças observadas não foram estatisticamente significativas.

MOCH et al. (1996) encontraram 12% de monossomia em 41 amostras de CCR analisadas. As alterações cromossômicas detectadas nas 41 amostras de carcinoma renal de células claras e não metastáticos foram mais frequentes nos cromossomos 3p (56%), 9p e 13q (24% cada). Alterações do cromossomo 9p estiveram associadas à recorrência tumoral ($p=0,04$). Neste estudo, não foram detectadas alterações cromossômicas do PTEN.

VELICKOVIC et al. (2002) não identificaram nenhum caso de mutação do PTEN em 80 amostras de carcinoma renal de células claras, 27 papilíferos e 16 cromófbos. Perda de heterozigose foi a anormalidade mais frequente e presente em 37,5% do subtipo de células claras, 29,6% papilíferos e 87,5% dos cromófbos.

KONDO et al. (2001) encontraram cinco casos de mutação do gene PTEN em 68 amostras de carcinoma de células renais analisados através de seqüenciamento direto. Quatro amostras eram tumores de alto grau histológico e metastáticos ou com invasão da veia renal, sugerindo que mutações do gene PTEN seja, um evento raro e quando presente ocorra em uma fase tardia da carcinogênese renal. SUKOSD et al. (2001) não encontraram mutações do PTEN em 50 amostras de carcinoma renal de células claras pesquisadas através de reação de polimerase em cadeia.

Segundo ZYSMAN et al. (2002), mutações do PTEN estão presentes em até 85% dos adenocarcinomas de endométrio e em 55% das hiperplasias, sendo que a maioria das mutações ocorre em apenas um alelo. No entanto, 61% das neoplasias endometriais apresentam perda completa da expressão do PTEN à IIQ e, em 97%, há algum grau de perda parcial, sugerindo que outros mecanismos como a regulação epigenética através da metilação possam ser causadores da elevada hipoexpressão imunoistoquímica.

CHEUNG et al. (2003) pesquisaram em amostras de neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (NIC-H) e carcinoma da cérvix, o *status* do gene PTEN quanto à presença de mutação, metilação, LOH e imunoexpressão. Em 62 amostras, nenhum caso de mutação foi encontrado, assim como não houve casos positivos para LOH com os três marcadores testados. Metilação foi encontrada em 40% (4/10) das NIC-H e em 58% (36/62) dos carcinomas da cérvix. A imunoistoquímica de dez casos positivos para metilação do PTEN demonstrou ausência de expressão protéica do gene, enquanto, entre dez casos negativos para metilação, sete apresentam expressão positiva para o PTEN ($p < 0,05$). Embora a amostra tenha sido pequena, metilação foi o mecanismo causador dos casos com ausência de expressão protéica.

No carcinoma de células renais, o PTEN pode ser inativado por mutação, deleção ou hipermetilação. Como nem sempre estão presentes mutações na ausência da atividade transcricional de um gene e mutação do PTEN é um evento raro no CCR, detectada com frequências que variam de 0% a 7%, é importante que alterações epigenéticas também sejam pesquisadas para justificar a frequência elevada de hipoexpressão IIQ observada. A hipermetilação gênica é considerada uma via alternativa de inativação às mutações e perdas cromossômicas (deleções, perda de heterozigose). Até o presente, a frequência de hipermetilação da região promotora do gene PTEN em CCR é desconhecida.

O próximo passo será avaliar o gene PTEN quanto à presença de hipermetilação e correlacionar os achados encontrados com a imunoistoquímica, assim como aumentar os casos a serem analisados através de hibridização *in situ* para confirmar a ausência de correlação de deleção com hipoexpressão à imunoistoquímica. Apesar de não ter encontrado correlação entre a análise do gene e da proteína proposta com as sobrevidas global e livre de doença, acreditamos que este estudo tenha sido importante por demonstrar que os pacientes portadores de deleção ou hipoexpressão do PTEN, assim como hiperexpressão do Akt, tiveram tendência a menores taxas de sobrevida em relação aos pacientes sem essas alterações.

6 CONCLUSÃO

1. Houve concordância baixa e não significativa entre deleção do gene PTEN à reação de hibridização in situ com a baixa expressão imunoistoquímica do mesmo gene, assim como ausência de deleção ao FISH e expressão positiva à IHQ. Não houve associação imunoistoquímica entre hiperexpressão da proteína Akt com hipoexpressão do gene PTEN.
2. Foram fatores independentes para a sobrevida global em 5 anos: sintomatologia ao diagnóstico, *performance status* (Ecog 1 e 2, Karnofski 60/70, 80 e 90), estágio clínico IV, alto grau de Fuhrman e recorrência tumoral. No modelo múltiplo, a sobrevida livre de doença foi influenciada unicamente pelos estádios clínicos II e III.
3. Embora tenham sido demonstradas diferenças nas sobrevidas dos pacientes com deleção ou ausência de deleção ao FISH, elas não foram estatisticamente significativas.
4. Não houve diferenças estatisticamente significativas às taxas de sobrevida livre de doença e global em relação às reações imunoistoquímicas para o PTEN e proteína Akt de modo que pacientes com reação IHQ negativa para o PTEN ou positiva para a proteína Akt não tiveram sobrevidas estatisticamente menores em relação aos demais.

7 **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Al-Aynati M, Chen V, Salama S, Shuhaibar H, Treleaven D, Vincic L. Interobserver and intraobserver variability using the Fuhrman grading system for renal cell carcinoma. **Arch Pathol Lab Med** 2003; 127:593-6.

Amin MB, Tamboli P, Javidan J, et al. Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms. **Am J Surg Pathol** 2002; 28:281-91.

Atkins MB, Hidalgo M, Stadler WM, et al. Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2004; 22:909-18.

Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:921-9.

Barbalias GA, Liatsikos EN, Tsintavis A, et al. Adenocarcinoma of the kidney: nephron-sparing surgical approach vs. radical nephrectomy. **J Surg Oncol** 1999; 72:156-61.

Barocas DA, Mathew S, DelPizzo JJ, et al. Renal cell carcinoma subtyping by histopathology and fluorescence in situ hybridization on a needle-biopsy specimen. **BJU Int** 2006, 99:280-5.

Beuvink I, Boulay A, Fumagalli S, et al. The mTOR inhibitor RAD001 sensitizes tumor cells to DNA-damaged induced apoptosis through inhibition of p21 translation. **Cell** 2005; 120:747-59.

Blom JH, van Poppel H, Marechal JM, et al. Radical nephrectomy with and without lymph node dissection: preliminary results of the EORTC randomized phase III protocol 30881. EORTC genitourinary group. **Eur Urol** 1999; 36:570-5.

Bruder E, Passera O, Harms D, et al. Morphologic and molecular characterization of renal cell carcinoma in children and young adults. **Am J Surg Pathol** 2004; 28:1117-32.

Cairns P, Evron E, Okami K, et al. Point mutation and homozygous deletion of PTEN/MMAC1 in primary bladder cancers. **Oncogene** 1998; 16:3215-8.

Camp R L, Charette L A, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. **Lab Invest** 2000; 80 (12):1943-49.

Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. **Am J Surg Pathol** 2003; 27:612.

Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Chan LK, Heung MS, Chan CS, Cheung AY, Chung TK, Wong YF. Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasm. **Gynecol Oncol** 2004; 93:621-7.

Chow WH, Devessa SS, Warren JL. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. **JAMA** 1999; 281:1628-1631.

Cindolo L, Taille A, Zigeuner RE, et al. Chromophobe renal cell carcinoma: comprehensive analysis of 104 cases from multicenter european database. **Urology** 2005; 65:681-5.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature** 1995; 378:785-9.

Dal Clin P, Aly MS, Delabie J, et al. Trisomy 7 and trisomy 10 characterize subpopulations of tumor-infiltrating lymphocytes in kidney tumors and the surrounding kidney tissue. **Proc Natl Acad Sci USA** 1992; 89:9744-8.

Dhote R, Coeuret MP, Thiounn N, Debre B, et al. Risk factors for adult renal cell carcinoma: a systematic review and implications for prevention. **Br J Urol** 2000; 86:20-7.

Ebert MP, Fei G, Schandl L. Reduced PTEN expression in the pancreas overexpressing transforming growth factor beta1. **Br J Cancer** 2002; 86:257-62.

Ficarra V, Prayer-Galetti T, Novella G, et al. Incidental detection beyond pathological factors as prognostic predictor of renal cell carcinoma. **Eur Urol** 2003; 43:663-9.

Ficarra V, Martignoni G, Maffei N, et al. Original and reviewed nuclear grading according to the Fuhrman system: a multivariate analysis of 388 patients with conventional renal cell carcinoma. **Cancer** 2005; 103:68-75.

Ficarra V, Martignoni G, Galfano A, et al. Prognostic role of the histologic subtypes of renal cell carcinoma after slide revision. **Eur Urol** 2006; 50:786-93.

Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. **Am J Surg Pathol** 1982; 6:655-63.

Garcia JA, Rini BI. Recent progress in the management of advanced renal cell carcinoma. **CA Cancer J Clin** 2007;57:112-25.

Gericke A, Munson M, Ross AH. Regulation of PTEN phosphatase. **Gene** 2006; 341:1-11.

Gesk S, Siebert R, Wacker HH, et al. Lack of deletions of the PTEN/MMAC1 and MXI1 loci in renal cell carcinoma by interphase cytogenetics. **Cancer Genet Cytogenet** 2000; 118:87-8.

Goncalves PD, Srougi M, Dall'lio MF, Leite KR, Ortiz V, Hering F. Low clinical stage renal cell carcinoma: relevance of microvascular tumor invasion as a prognostic parameter. **J Urol** 2004; 172:470-4.

Griffiths DF, Verghese A, Golash A, et al. Contribution of grade, vascular invasion and age to outcome in clinically localized renal cell carcinoma. **BJU Int.** 2002; 90:26-31.

Gudbjartsson T, Thoroddsen A, Petursdottir V, Hardarson S, Magnusson J, Einarsson GV. Effect of incidental detection for survival of patients with renal cell carcinoma: results of population-based study of 701 patients. **Urology.** 2005; 66:1186-91.

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 S, Oya M, Mizuno R, et al. Akt activation in renal cell carcinoma: contribution of a decreased PTEN expression and the induction of apoptosis by an Akt inhibitor. **Ann Oncol** 2005; 16:928-933.

Harada K, Sakai I, Ishimura T, Inoue TA, Hara I, Miyake H. Clinical symptoms in localized renal cell carcinoma reflect its invasive potential: comparative study between incidentally detected and symptomatic diseases. **Urol Oncol** 2006; 24:201-6.

Hill MM, Hemmings BA. Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy. **Pharmacol Ther** 2002; 93:243-51.

Horiguchi A, Oya M, Uchida A, Marumo K, Murai M. Elevated AKT activation and its impact on clinicopathological features of renal cell carcinoma. **J Urol** 2003; 169:710-3.

Hsu RM, Chan DY, Siegelman SS. Small renal cell carcinomas: correlation of size with tumor stage, nuclear grade and histologic subtype. **AJR** 2004; 182:551-7.

Hyung KL, Seligson D, Liu X, et al. Using tumor markers to predict the survival of patients with metastatic renal cell carcinoma. **J Urol** 2005; 173:1496-501.

Ishimura T, Sakai I, Hara I, Eto H, Miyake H. Microscopic venous invasion in renal cell carcinoma as a predictor of recurrence after radical surgery. **Int J Urol** 2004a; 11:264-8.

Ishimura T, Sakai I, Harada K, Hara I, Eto H, Miyake H. Clinicopathological features of recurrence after radical surgery for nonmetastatic renal cell carcinoma. **Int J Clin Oncol** 2004b; 9:369-72.

Iqbal MA, Akhtar M, Dayel FA, et al. Use of FISH analysis for diagnosis of renal cell carcinoma. **Ann Saudi Med** 1999; 19:495-500.

Jambhekar NA, Bagwan IN, Ghule P, et al. Comparative analysis of routine histology, immunohistochemistry, reverse transcriptase polymerase chain reaction, and fluorescence in situ hybridization in diagnosis of Ewing family of tumors. **Arch Pathol Lab Med** 2006; 130:1813-8.

Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. **Hum Mol Genet** 2001; 10:657-62.

Karakiewicz PI, Trinh QD, de la Taille A, et al. ECOG performance status 0 or 1 and symptom classification do not improve the ability to predict renal cell carcinoma-specific survival. **Eur J Cancer** 2007; 43:1023-9.

Kim HL, Belldegrun AS, Freitas DG, et al. Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis. **J Urol** 2003; 170:1742-6.

Kirkali Z, Obek C. Clinical aspects of renal cell carcinoma. **EAU Update Series** 2003; 1:189-96.

Kondo K, Yao M, Kobayashi K, et al. PTEN/MMAC1/TEP1 mutations in human primary renal cell carcinomas and renal carcinoma cell lines. **Int J Cancer** 2001; 91:219-24.

Kononen J, Buddendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med** 1998; 4:844-7.

Kontak JA, Campbell SC. Prognostic factors in renal cell carcinoma. **Urol Clin North Am.** 2003; 30:467-80.

Korshunov A, Sycheva R, Gorelyshev S, Golanov A. Clinical utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in nonbrainstem glioblastomas of childhood. **Mod Pathol** 2005; 18:1258-63.

Lam JS, Pantuck AJ, Belldegrun AS, Figlin RA. Protein expression profiles in renal cell carcinoma: staging, prognosis, and patient selection for clinical trials. **Clin Cancer Res** 2007; 13:703s-708s.

Lam JS, Shvarts O, Leppert JT, Figlin RA, Belldegrun AS. Renal cell carcinoma 2005: new frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy. **J Urol** 2005; 173:1853-62.

Lambros MB, Natrajan R, Reis-Filho JS. Chromogenic and fluorescent in situ hybridization in breast cancer. **Hum Pathol** 2007; 38:1105-22.

Lang H, Lindner V, de Fromont M, et al. Multicenter determination of optimal interobserver agreement using the Fuhrman grading system for renal cell carcinoma: assessment of 241 patients with > 15-year follow-up. **Cancer** 2005; 103:625-9.

Lee JS, Kim HS, Kim YB, Lee MC, Park CS. Expression of PTEN in renal cell carcinoma and its relation to tumor behavior and growth. **J Surg Oncol** 2003; 84:166-172.

Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. Nephron sparing surgery for appropriately selected renal cell carcinoma between 4 and 7 cm results in outcome similar to radical nephrectomy. **J Urol** 2004; 171:1066-70.

Lesage K, Joniau S, Fransis K, Van Poppel H. Comparison between open partial and radical nephrectomy for renal tumours: perioperative outcome and health-related quality of life. **Eur Urol** 2007; 51:614-20.

Leslie NR, Downes CP. PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. **Biochem J** 2004; 382:1-11.

Liou S, Shi T, Duan ZH, Sadhukhan P, et al. Microarray gene expression profiling and analysis in renal cell carcinoma. **BMC Urology** 2004; 4:9.

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

Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-AKT pathway in human cancer: Rationale and promise. **Cancer Cell** 2003; 4:257-62.

Ma YY, Wei SJ, Lin YC, et al. PI3KCA as an oncogene in cervical cancer. **Oncogene** 2000; 19:2739-44.

Maynard MA, Ohh M. Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible factor in kidney cancer. **Am J Nephrol** 2004; 24:1-13.

Meili R, Sasaki AT, Firtel RA. Who rocks PTEN. **Nat Cell Biol** 2005; 7(4): 334-5.

Méjean A, Oudard S, Thiounn N. Prognostic factors of renal cell carcinoma. **J Urol** 2003; 169:821-7.

Merseburger AS, Anastasiadis AG, Hennenlotter J, et al. Tissue microarrays: applications in urological cancer research. **World J Urol** 2006; 24:579-84.

Moch H, Presti JC Jr, Sauter G, et al. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization are associated with clinical outcome in renal cell carcinoma. **Cancer Res** 1996; 56:27-30.

Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, et al. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by CDNA microarray screening in renal cell carcinoma. **Am J Pathol** 1999; 154:981-6.

Moch H, Gasser T, Amin MB, Torhorst J, Sauter G, Mihatsch MJ. 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.

Morita R, Saito S, Ishikawa J, et al. Common regions of deletion on chromosomes 5q, 6q, and 10q in renal cell carcinoma. **Cancer Res** 1991; 51:5817-20.

Motzer RJ, Bukowski RM. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2006; 24:5601-8.

Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. **J Clin Oncol** 1999; 17:2530-40.

Mouraviev V, Joniau S, Van Poppel H, Polascik TJ. Current status of minimally invasive ablative techniques in the treatment of small renal tumours. **Eur Urol** 2007; 51:328-36.

Nocito A, Kononen J, Kalioniemi O P, Sauter G. Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. **Int J Cancer** 2001; 94:1-5.

Nomoto T, Nakagawa S, Sugimoto K, et al. Prognostic factors in a patients with renal cell carcinoma. **Jpn J Urol** 1999; 90:602-7.

Onishi T, Oishi Y, Goto H, Yanada S, Abe K. Gender as a prognostic factor in patients with renal cell carcinoma. **BJU Int** 2002; 90:32-6.

Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-AKT pathway: Its functions and alterations in human cancer. **Apoptosis** 2004; 9:667-76.

Pallares J, Bussaglia E, Martinez-Guitarte JL, et al. Immunohistochemical analysis of PTEN in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with a comparison of four commercial antibodies in correlation with molecular abnormalities. **Mod Pathol** 2005; 18:719-27.

Pantuck AJ, Zisman A, Belldegrun AS. The changing natural history of renal cell carcinoma. **J Urol** 2001; 166:1611-23.

Pantuck AJ, Zeng G, Belldegrun AS, Figlin A. Pathobiology, prognosis, and target therapy for renal cell carcinoma: exploiting the hypoxia-induced pathway. **Clin Cancer Res** 2003a; 9:4641-52.

Pantuck AJ, Zisman A, Dorey F, et al. Renal cell carcinoma with retroperitoneal lymph nodes: a role of lymph node dissection. **J Urol** 2003b; 169:2076-83.

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

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.

Puc J, Keniry M, Li HS, Pandita TK, et al. Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. **Cancer Cell** 2005; 7:193-204.

Robson JS. Advances in the treatment of renal disease. **Practitioner** 1969; 203:483-93.

Rimm DL, Camp CB, Charette L, et al. Amplification of tissue by construction of tissue microarrays. **Exp Mol Pathol** 2001; 703:255-64.

Sakurada A, Suzuki A, Sato M, et al. Infrequent genetic alterations of the PTEN/MMAC1 gene in Japanese patients with primary cancers of the breast, lung, pancreas, kidney, and ovary. **Jpn J Clin Oncol** 2007; 37:197-200.

Salama ME, Guru K, Stricker H, et al. pT1 substaging in renal cell carcinoma: validation of the 2002 TNM staging modification of malignant renal epithelial tumors. **J Urol** 2005; 173:1492-5.

Samuels Y, Velculescu VE. Oncogenic mutations of PI3KCA in human cancers. **Cell Cycle** 2004; 10:1221-4.

Samuels Y, Ericson K. Oncogenic PI3K and its role in cancer. **Curr Opin Oncol** 2006; 18:77-82.

Sansal I, Sellers WR. The Biology and Clinical Relevance of the PTEN Tumor Suppressor Pathway. **J Clin Oncol** 2004; 22:2954-63.

Sawczuk IS, Pollard JC. Renal cell carcinoma: should radical nephrectomy be performed in the presence of metastatic disease? **Curr Opin Urol** 1999; 9:377-81.

Schoffski P, Dumez H, Clement P, et al. Emerging role of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of advanced renal cell cancer: a review. **Ann Oncol** 2006; 17:1-12.

Schlomer B, Figenshau RS, Yan Y, Venkatesh R, Bhayani SB. Pathological features of renal neoplasms classified by size and symptomatology. **J Urol** 2006; 176:1317-20.

Schrami P, Schwerdtfeger G, Burkhalter F, et al. Combined array comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis suggest PAK1 at 11q13.5-q14 as a critical oncogene target in ovarian cancer. **Am J Pathol** 2003; 163:985-92.

Sengupta S, Zincke H. Lessons learned in the surgical management of renal cell carcinoma. **Urology** 2005; 66:36-42.

Shayesteh L, Lu y, Kuo WL, et al. PI3KCA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. **Nat Genet** 1999; 21:99-102.

Shergill IS, Rao AR, Anjum FH, Arya M, Patel HR, Mundy AR. Tissue microarrays and their relevance to the urologist. **J Urol** 2006; 175:19-26.

Sobin LH, Wittekind C. **TNM classificação de tumores malignos**. Trad. de A L A Eisenberg. 6 ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004. Rim; p.200-3.

Staehler M, Haseke N, Schoeppler G, et al. Modern therapeutic approaches in metastatic renal cell carcinoma. **Eur Urol** 2007; 5:26-37.

Skates S, Iliopoulos O. Molecular markers for early detection of renal cell carcinoma: investigative approach. **Clin Cancer Res** 2004; 10:6296-301.

Sukosd F, Digon B, Fischer J, Pietsch T, Kovacs G. Allelic loss at 10q23.3 but lack of mutation of PTEN/MMAC1 in chromophobe renal cell carcinoma. **Cancer Genet Cytogenet** 2001; 128:161-3.

Sweeney JP, Thornhill JA, Graiger R, et al. incidentally detected renal cell carcinoma: pathological features, survival trends and implications for treatment. **Br J Urol** 1996; 78:351.

Takahashi M, Rhodes DR, Furge KA, et al. Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2001; 98:9754-9.

Tang JM, He QY, Guo RX, Chang XJ. Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis. **Lung Cancer**. 2006; 51:181-91.

Teng DH, Hu R, Lin H, et al. MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens metastatic renal cell carcinoma of bone. **Eur Urol** 2006; 52:1-7.

Uno M, Fujimoto Y, Takada T, et al. RCC Research Group. Prognostic factors for survival of patients after curative surgery for renal cell carcinoma: multivariate analysis of 482 cases. **Int J Clin Oncol** 2004; 9:510-4.

Valenzuela MGS, Almeida FCS, Matizonkas LF, et al. Hibridização in situ com sonda não radioativa para mRNA: princípios e aplicações. **J Bras Patol Med Lab** 2006; 42:207-13.

Van Poppel H, Vandendriessche H, Boel K, et al. Microscopic vascular invasion is the most relevant prognosticator after radical nephrectomy for clinically nonmetastatic renal cell carcinoma. **J Urol** 1997; 158:45-9.

Vazquez F, Grossman SR, Takahashi Y. Phosphorylation of PTEN tail regulates protein stability and function. **Mol Cell Biol** 2000; 20:5010-8.

Velickovic M, Delahunt B, McIver B, Grebe SK. Intragenic PTEN/MMAC1 loss of heterozygosity in conventional (clear-cell) renal cell carcinoma is associated with poor patient prognosis. **Mod Pathol** 2002; 15:479-85.

Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. **J Mol Diagn** 2006; 8:141-51.

Verhoest G, Veillard D, Guille F, et al. Relationship between Age at Diagnosis and Clinicopathologic Features of Renal Cell Carcinoma. **Eur Urol** 2007; 51:1298-305.

Wymann PM, Marone R. Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location and scaffolding. **Curr Opin Cell Biol** 2005; 17:141-9.

Yoshimoto M, Cutz JC, Nuin PA, et al. Interphase FISH analysis of PTEN in histologic sections shows genomic deletions in 68% of primary prostate cancer and 23% of high-grade prostatic intra-epithelial neoplasias. **Cancer Genet Cytogenet** 2006; 169:128-37.

Zysman MA, Chapman W, Bapat B. Considerations when analyzing the methylation status of PTEN tumor suppressor gene. **Am J Pathol** 2002; 160:795-800.

Anexo 1 – Formulário de coleta de dados

1. Nome
2. RGH
3. Data de admissão
4. Idade
5. Raça (1) branca (2) não branca
6. Sexo (1) masculino (2) feminino
7. Karnofski
8. Ecog
9. Sintomatologia ao diagnóstico
(0) não (1) hematúria (2) dor lombar (3) perda de peso (4) febre (5) massa (6) outros
10. Tempo de evolução em meses
11. Tumor incidental (0) não (1) sim
12. Metástase ao diagnóstico (0) não (2) sim
13. Tumor familiar (0) não (1) sim
14. Tipo de cirurgia (1) nefrectomia radical (2) nefrectomia parcial
15. Margens cirúrgicas (0) negativas (1) positivas
16. Data da cirurgia
17. Tempo de cirurgia
18. Tempo de internamento
19. Complicações cirúrgicas precoces (0) não (1) insuficiência renal aguda (2) íleo prolongado (3) infecção de parede (4) cardiorespiratória (5) tromboembólicas (6) fístulas urinárias (7) sangramento (8) outras
20. Complicações cirúrgicas tardias (0) não (1) insuficiência renal crônica (2) suboclusão intestinal (3) afecções de parede (4) hipertensão arterial (5) outras
21. Tamanho tumoral em centímetros
22. Lateralidade (1) rim direito (2) esquerdo (3) bilateral
23. Topografia (1) polo superior (2) pólo medial (3) pólo inferior (4) mais de um pólo renal

24. Subtipo histológico (1) células claras (2) pailífero (3) cromóforo (4) ductos coletores (5) TTE3 gene (6) inclassificável
25. Grau de Fuhrman (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4 (5) ignorado
26. Invasão venosa microscópica (1) não (2) sim
27. Infiltração: (1) cápsula (2) gordura (3) seio renal (3) pélvis/ureter (4) artéria renal (5) veia renal (6) veia cava inferior infrad. (7) veia cava inferior suprad. (8) adrenal
28. Número de linfonodos dissecados
29. Número de linfonodos comprometidos
30. Número da lâmina
31. Estádio tamanho tumoral patológico (1) T1a (2) T1b (3) T2 (4) T3a (5) T3b (6) T3c (7) T4
32. Estádio linfonodal patológico (1) N0 (2) N1 (3) N2 (4) Nx
33. Estádio clínico TNM (1) EC I (2) EC II (3) EC III (4) EC IV
34. Estádio de Robson (1) I (2) II (3) IIIa (4) IIIb (5) IIIc (6) IV
35. Recidiva tumoral (0) não (1) local (2) pulmão (3) ossos (4) fígado (5) cérebro (6) rim contralateral (7) outros
36. Data da recidiva
37. Tratamento da recidiva (0) não (1) cirurgia (2) radioterapia (3) cirurgia + radioterapia (4) imunoterapia (5) imunoterapia + quimioterapia (6) outros
38. Data do último seguimento
39. Status: (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morte por câncer (4) morte por outras causas (5) perdido de vista

Anexo 2 – Performance status

KARNOFSKI

- 100 – Normal, sem queixas
- 90 – Normal, queixas menores
- 80 – Normal, alguns sintomas
- 70 – Cuida-se sozinho, incapacitado
- 60 – Requer assistência
- 50 – Assistência considerável, freqüentes cuidados médicos
- 40 – Incapacitado requer assistência especial
- 30 – Incapacitado, hospitalização
- 20 – Muito doente, requer assistência permanente
- 10 – Moribundo
- 0 – Morto

ECOG

- 0 – Ativo, Karnofski 90-100
- 1 – Restrições, cuida-se sozinho, Karnofski 70-80
- 2 – Incapacitado, deambula, cuida-se sozinho, Karnofski 50-60
- 3 – Somente cuidados pessoais, sentado, deitado >50%, Karnofski 30-40
- 4 – Inativo, dependente, acamado, Karnofski 10-20.

Anexo 3 – Estadiamento

TNM (UICC/AJCC) -2002 (CID-O 64)

Tx – Tumor primário não pode ser avaliado

T0 – Não há evidência de tumor primário

T1 – Tumor menor que 7 cm no seu maior eixo, limitado ao rim

T1A – Tumor de até 4 cm

T1B – Tumor de tamanho entre 4 cm e 7cm em sua maior dimensão

T2 – Tumor maior que 7 cm no seu maior eixo, mas limitado ao rim

T3 – Tumor estende-se às veias maiores ou invade adrenal ou gordura perirenal sem ultrapassar a fáscia de Gerota

T3a – Adrenal, seio renal e tecidos peri-nefréticos

T3b – Trombo na v. renal ou v. cava inferior abaixo do diafragma

T3c – Trombo na v. cava inferior acima do diafragma

T4 – Tumor ultrapassa a fáscia de Gerota

N0 – Ausência de acometimento linfonodal regional

N1 – Acometimento de um linfonodo regional

N2 – Acometimento de mais de um linfonodo regional

Nx- Linfonos regionais não avaliáveis

M1 – Metástase a distância

Grupamento por estádios:

Estádio I	T1	N0	M0
Estádio II	T2	N0	M0
Estádio III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0,N1	M0
	T3a	N0,N1	M0
	T3b	N0,N1	M0

	T3c	N0,N1	M0
Estádio IV	T4	N0,N1	M0
	Qualquer T	N2	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

ESTADIAMENTO DE ROBSON

- I: Tumor restrito ao rim, sem ultrapassar a cápsula renal
- II: Tumor acometendo a gordura perirrenal sem ultrapassar a cápsula de gerota
- III: Presença de trombo venoso tumoral envolvendo macroscopicamente a veia renal ou a veia cava inferior ou linfonodos regionais
 - IIIa: Acometimento da veia renal ou veia cava infradiafragmática
 - IIIb: Acometimento de linfonodos regionais
 - IIIc: Acometimento de veia renal ou veia cava inferior e de linfonodos regionais concomitantemente
- IV: Invasão de órgãos adjacentes, exceto adrenal ipsilateral ou metástases a distância.