

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO COMPONENTE BLASTEMATOSO DO TUMOR DE WILMS: COMPARAÇÃO ENTRE SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA

FÁBIO DE SIMONE PICCOLI

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. André Luiz Vettore de Oliveira

**Co-orientadora: Dra. Otávia Luisa S. Damas de
Caballero**

São Paulo

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo**

Piccoli, Fábio De Simone

Análise da expressão gênica do componente blastematoso do tumor de Wilms: comparação entre sensibilidade e resistência à quimioterapia / Fábio De Simone Piccoli -- São Paulo, 2005.

96p.

Dissertação(mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: André Luiz Vettore de Oliveira

Descritores: 1. TUMOR DE WILMS. 2. ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA. 3. QUIMIOTERAPIA. 4. RESISTÊNCIA A DROGAS NEOPLÁSICAS. 5. SAGE.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos menores Joice e Diego, pacientes do departamento de pediatria do Hospital do Câncer envolvidos neste estudo, e a seus pais, por terem tornado possível a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Marina e Walter, por toda uma vida de incentivo e apoio, pelo respeito e pela compreensão sempre presentes e por muitas vezes acreditarem em mim mais do que eu mesmo acreditaria e, ao meu irmão Pedro, não só pela mesma compreensão como também por um carinho todo especial comigo.

Agradeço especialmente ao meu orientador André, antes de qualquer coisa por toda a paciência e compreensão e por estar sempre à disposição e com boa vontade para que tudo caminhe da melhor maneira possível, ensinando e aprendendo.

Agradeço com enorme carinho à Otavia, minha co-orientadora e alguém por quem sempre terei uma enorme admiração, não só por ter me recebido no Ludwig de braços abertos, ensinando, respeitando e incentivando sempre como, sobretudo, pelo exemplo de Ser Humano que é.

Certamente encheria toda esta página agradecendo à Andréa Quintela pela imensurável ajuda em todos os sentidos, nas horas de aperto dentro e fora do laboratório como as inúmeras caronas, tão importantes por um período e, é claro, pelo carinho e grande amizade que pudemos construir. Muito obrigado!

Agradeço a todas as pessoas do Laboratório de Genética do Câncer pela maravilhosa companhia durante estes anos e por se tornarem minha família fora de casa! À Adriana por ter sido minha “dupla” em tantas situações desde nosso começo juntos no laboratório dividindo, dia a dia, dois anos de mestrado e amizade. Ao Daniel pelo ótimo convívio e por toda a ajuda e interesse neste e em todos os outros projetos. À Danielle pelo que me ensinou na minha chegada ao laboratório e, principalmente, pelo carinho e amizade nestes anos, tendo acompanhado toda a trajetória da minha vida pessoal e profissional neste período. Ao Fabrício por sua interminável disposição em ajudar e por sua companhia divertida e despretenciosa. À Letícia por sua amizade dentro e fora do laboratório e por sua maneira carinhosa fazer as coisas. À Luciane por sua companhia e por estar sempre disposta a ajudar, principalmente pelos palpites durante a escrita desta dissertação em resposta aos meus “Lú, leia este parágrafo pra mim?” À Roberta por sua alegria e bom humor e por ter me ajudado a aprender mais sobre SAGE afinal, “é ensinando que a gente aprende”. À Márcia por ter dividido comigo seus conhecimentos de SAGE e me

mostrando qual o melhor caminho entre uma tag e um gene e, é claro pela amizade, ótima companhia e por entender meu gosto musical e cinematográfico. À Mariana Brait por tudo o que já me ensinou no laboratório, pela ótima companhia nos dias, ou melhor, noites de 3º turno, por sua amizade e por ser esta pessoa tão “Show de Buelas”. À Mariana Maschietto pela companhia na condução dos nossos projetos, compartilhando dados e aprendendo juntos sobre a biologia dos tumores de Wilms. À Valéria Paixão pelos tão úteis empréstimos do laptop à perder de vista e pelos “toques de mestra” no dia a dia do laboratório, me ensinando, com seu jeito prático preciso de trabalhar, que biologia molecular é coisa séria mas não neurótica. À Maria Isabel pela ajuda bilingüe e disponibilidade com todos apesar da correria. À Dinamar e ao pequeno Daniel pelo ótimo convívio 2 em 1 e por sua seriedade profissional. À Fernanda pelos papos sérios de corredor e, da mesma maneira, pelos momentos hilários que proporciona. E agradeço aos recém chegados no laboratório, Alex, Benjamin, Cláudia, Erika, Luciana e Valéria, apesar do ainda pouco convívio, pela preocupação com o andamento da fase final deste trabalho.

À Andrea Trevisan agradeço desde por sua companhia nas intermináveis tardes ao fluxo de bactérias, pelas conversas pelos corredores do Ludwig e, por um dia, ter decidido fazer parte da minha vida, sendo sempre um ótima companhia desde então, trazendo sempre um colorido especial à rotina de todos nós.

Ao departamento de pediatria do Hospital do Câncer por tudo o que pude aprender durante minha residência médica, em especial à Dra. Beatriz de Camargo e ao Dr. Luiz Fernando Lopes por terem tornado possível a minha vinda para o Instituto Ludwig. À Dra. Beatriz agradeço ainda por ter acompanhado de perto este trabalho com idéias, sugestões, informações, incentivo e todo o seu conhecimento em tumores de Wilms, conseguindo despertar em mim um grande interesse por estes tumores.

À Dra. Simone Sredni por ter sido seu projeto de pós-doutorado o estopim para este e outros projetos relacionados aos tumores de Wilms, por toda a sua ajuda e participação no início deste trabalho, principalmente no preparo das amostras e, pelo sempre contagiante entusiasmo com seu trabalho.

À Dra. Helena Brentani e ao Luiz Paulo Camargo pela realização de toda a análise de bioinformática deste trabalho e pela grande disposição em gerar todos os dados necessários e por esclarecer todas as minhas dúvidas.

Ao Dr. Marcel Kool, do Departamento de Neurogenética da Universidade de Amsterdam pela importante colaboração com este trabalho.

À Dra. Dirce Carraro pela contribuição com este trabalho, gerando e discutindo os resultados.

Ao Dr. Fernando Augusto Soares do departamento de Anatomia Patológica pela importante colaboração, disposição e apoio neste trabalho.

Ao Dr. Wilson Araújo da Silva jr. e à Dalila Lucíola Zanette da Fundação Hemocentro da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por todo o processo de identificação e classificação das *tags* geradas e, à Anemari Ramos Dinarte dos Santos por toda a paciência e dedicação em me ensinar a construir uma biblioteca de SAGE e pela disponibilidade em discutir todas as “pedras” no meio do caminho.

Ao Dr. Luiz Fernando Lima Reis, presidente do pós-graduação, pela qualidade deste curso e um especial obrigado à Ana Maria Kuninari e Márcia Hiratani pela enorme simpatia, paciência e tolerância comigo e por tantos “galhos quebrados” nestes dois anos.

À equipe da biblioteca, Suely Francisco, Rosinéia A. Carneiro e Francyne P. G. de Lima pela ajuda na obtenção dos artigos e informações e pelo competente trabalho, em especial à Suely pelo “pente fino” na finalização desta dissertação.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME), sobretudo à Sra. Irde Contesini pela ajuda com os prontuários dos pacientes.

Ao Dr. Ricardo Renzo Brentani, diretor do Instituto Ludwig e presidente do Hospital do Câncer pelas exelentes condições de trabalho.

Aos membros da banca de qualificação desta dissertação Dra. Beatriz de Camargo, Dra. Maria Rita Passos Bueno, Dr. Wilson da Silva júnior e Dr. Luiz Fernando Lopes, pelas correções e sugestões durante o andamento deste projeto.

Aos membros da banca examinadora desta dissertação por aceitarem o convite e pela disposição em ler e argüir este trabalho.

Agradeço à todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Piccoli FS. **Análise da expressão gênica do componente blastematoso do tumor de Wilms: comparação entre sensibilidade e resistência à quimioterapia.** São Paulo; 2005. [Dissertação de mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O tumor de Wilms (TW), apesar de raro, corresponde à neoplasia maligna primária do rim mais freqüente da infância. Exemplo de neoplasia que tem se beneficiado com a evolução do tratamento, o TW pode, atualmente, ser curado em 80 a 90% dos casos. Uma vez atingidos estes altos índices de cura, os atuais protocolos terapêuticos têm sido desenhados com o objetivo de reduzir o tratamento e, com isso, os riscos de complicações secundárias para os pacientes que cursam com bom prognóstico e já vivenciam uma expectativa de cura superior a 80%, restringindo as terapias mais intensas ao pequeno grupo (10 a 20%) de maus respondedores. O TW é uma neoplasia embrionária constituída por três tipos histológicos principais, dos quais o componente blastematoso é o que melhor se aplica ao estudo da resposta terapêutica. Apesar de ser caracterizada por uma alta agressividade, esta variante apresenta, na grande maioria das vezes, uma alta sensibilidade à quimioterapia (QT), sendo este um dos principais fatores responsáveis pelo bom prognóstico destes tumores. Entretanto, em alguns casos, o componente blastematoso mostra-se resistente à quimioterapia e, por associarem agressividade tumoral à resistência quimioterápica, tumores com estas características têm sido associados à grande parte das falhas terapêuticas e, provavelmente, responsáveis por um pior prognóstico. Logo, a identificação ao diagnóstico, de pacientes potencialmente bons e maus respondedores ao tratamento torna-se de grande importância por possibilitar a

implementação, o mais precoce possível, de uma terapêutica mais individualizada. As diferenças entre sub-tipos tumorais são geralmente acompanhadas por mudanças no perfil de expressão de diferentes genes, o que faz da análise de expressão gênica uma ferramenta de grande interesse, uma vez que possibilita a identificação de um perfil de expressão único para cada tumor. Nesse projeto buscamos, através da construção de bibliotecas de *SAGE*, a identificação de diferenças na expressão gênica entre as variantes sensíveis e resistentes à quimioterapia do componente blastematoso do TW, que possam estar relacionadas à resistência quimioterápica. Para isto, foram construídas duas bibliotecas de *SAGE* de tecido microdissecado de TW de componente blastematoso, uma delas proveniente de tumor com características de quimiossensibilidade e outra de tumor com características de quimiorresistência, tendo sido geradas 64.365 e 62.317 *tags*, respectivamente. Uma segunda biblioteca de TW quimiorresistente foi utilizada na análise da expressão diferencial dos genes em relação à biblioteca de TW quimiossensível. A análise dos genes diferencialmente expressos e de suas características biológicas, possibilitou a identificação de 11 genes hiper-expressos (*GNG2*, *GNA13*, *CRABP2*, *GAS6*, *RNF130*, *IGFBP4*, *SPARC*, *MAT2A*, *RAP1B*, *HSPA8* e *SERPINH1*) e 3 hipo-expressos (*MCM7*, *FSCN1* e *EI24*) nos TW quimiorresistentes, envolvidos em processos biológicos relacionados, direta ou indiretamente, à resposta quimioterápica como apoptose, manutenção do citoesqueleto, proliferação e diferenciação celular, replicação e reparo do DNA e regulação do ciclo celular. A diferenciação ao diagnóstico entre blastema sensível e resistente à QT pode ser de grande utilidade na abordagem terapêutica dos TW por permitir um maior conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta quimioterápica destes tumores e

com isso possibilitar, não só uma estratificação destes indivíduos em grupos de risco baseados na resposta quimioterápica individual para um direcionamento terapêutico precoce, como também, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais individualizadas e de novos alvos terapêuticos.

SUMMARY

Piccoli FS. **[Molecular Characterization of Chemo Sensitive and Chemo Resistant Wilms' Tumor Blastemal Type Using SAGE Libraries.]** São Paulo; 2005. [Dissertação de mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Wilms' Tumor (WT) is the most common primary malignant neoplasia of the kidney in childhood. WT is one of the best examples of malignant tumor in which effectiveness of treatment has markedly progressed, being, nowadays, cured in 80 to 90% of all the cases. Since cure rates are satisfactory, the current treatment protocols have been designed aiming a therapy and risk of secondary effects reduction for patients undergoing good prognosis and who are experiencing cure expectancies above 80%, focusing the most severe treatment only on the smaller group (10 to 20%) of poor responders. Wilms' Tumor is an embryonal tumor classically composed of three cellular components, from which the blastemal component is the most suitable for therapeutic response studies. Although highly aggressive, this component usually presents great sensibility to chemotherapy leading to good prognosis. Nevertheless, the blastemal component is found in some cases to be resistant to chemotherapy and, for associating tumor aggressiveness to chemotherapeutic resistance, tumors of this type have been associated to most therapeutic failures, being probably responsible for a bad prognosis. Thus, to identify good and bad chemo-responders becomes of great importance for early implementation of individualized therapeutics. Differences among tumor subtypes are generally accompanied by changes in the expression profile of a variety of genes, what makes the analysis of gene expression a tool of great interest. In this study we

used SAGE analysis to identify differences in gene expression among sensitive and resistant to chemotherapy variants of blastemal WT. Two SAGE libraries were constructed from microdissected blastemal WT tissues, one originated from a tumor characterized as chemo-sensitive and the other one, from a tumor characterized as chemo-resistant, from which 64,365 and 62,317 tags were generated, respectively. Data from a second chemo-resistant library, constructed by another group, were added to the analysis of differentially expressed genes in comparison to the chemo-sensitive library. The analysis of gene expression based on bioinformatic data and their biological characteristics allowed us to identify 11 over-expressed genes (*GNG2*, *GNA13*, *CRABP2*, *GAS6*, *RNF130*, *IGFBP4*, *SPARC*, *MAT2A*, *RAP1B*, *HSPA8* and *SERPINH1*) and 3 under-expressed genes (*MCM7*, *FSCN1* and *EI24*) in chemo-resistant tumors. These genes are involved in different biologic processes that could be, directly or indirectly, related to chemotherapy response as apoptosis, cytoskeleton maintenance, cellular proliferation and differentiation, DNA replication and repair and cell cycle regulation.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	Dois exemplos de gráfico demonstrando as distribuições das frequências de <i>tags</i> entre duas classes hipotéticas de bibliotecas.	41
Figura 2	Avaliação da integridade das amostras de RNA extraídas.	44
Figura 3	Avaliação da presença de DNA genômico nas amostras de RNA através da amplificação de um fragmento do gene <i>hMLH1</i> .	45
Figura 4	Avaliação da eficiência da reação de síntese dos cDNAs através da amplificação de um fragmento do gene <i>NOTCH2</i> .	46
Figura 5	Fluxograma ilustrando o processo de seleção das <i>tags</i> e posterior comparação de suas frequências entre as bibliotecas.	50
Figura 6	<i>Venn Diagram</i> da intersecção das comparações QS x QR e QS x QR2, mostrando a distribuição dos genes identificados como diferencialmente expressos entre elas.	51

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1	Estadiamento clínico simplificado do TW	5
Tabela 2	Esquema terapêutico para TW unilaterais segundo o protocolo <i>SIOP 2001</i> .	14
Tabela 3	Esquema terapêutico para TW segundo <i>NWTSG</i> .	15
Tabela 4	Endereços eletrônicos dos <i>Web-sites</i> utilizados no processo de análise dos aspectos biológicos dos genes-candidatos selecionados.	42
Tabela 5	Concentrações dos RNAs extraídos das amostras de TW Quimiossensível e Quimiorresistente.	44
Tabela 6	Análise das <i>tags</i> presentes nas biblioteca de <i>SAGE</i> construídas no estudo, em número absoluto de <i>tags</i> .	47
Tabela 7	Lista dos 23 genes hiper-expressos e dos 13 genes hipo-expressos nos tumores de Wilms quimiorresistentes (QR e QR2), provenientes da intersecção entre as comparações QSxQR e QSxQR2.	53
Tabela 8	Lista dos genes com expressão não-concordante entre as duas bibliotecas de TW quimiorresistentes em relação à biblioteca QS, provenientes da intersecção entre as comparações QSxQR e QSxQR2.	54
Tabela 9	Lista dos 14 genes diferencialmente expressos nos TWQR selecionados após a análise de suas características biológicas.	56

LISTAS DE ABREVIATURAS

AR	ácido-retinóico
ATP	adenosina tri-fosfato
ATRA	ácido trans-retinóico
cDNA	DNA complementar
CESH	<i>Comparative Expressed Sequence Hybridization</i>
CGAP	<i>Cancer Genome Anatomy Project</i>
CGH	<i>Comparative Genomic Hibridization</i>
cGy	centigrays
DEPC	di-etil pirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	deoxinucleotídeos tri-fosfato
DTT	ditiotretol
E	<i>bayes error rate</i>
EDTA	ácido etileno-diamino-tetraacético
FWT1	<i>Familial Wilms Tumor 1</i>
FWT2	<i>Familial Wilms Tumor 2</i>
GCBTTW	Grupo Cooperativo Brasileiro para o Tratamento do Tumor de Wilms
GDP	guanosina di-fosfato
GTP	guanosina tri-fosfato
Hsps	<i>Heat shock proteins</i>
Kb	quilobase
kV	quilovolts
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LOH	<i>Lost of heterozigosity</i>
M	molar
M:F	relação masculino - feminino
MDR	<i>Multi Drug Resistance</i>
mL	mililitro
mM	milimolar

MRPs	<i>Multidrug Resistance Proteins</i>
NWTS	<i>National Wilms Tumor Study</i>
NWTSG	<i>National Wilms Tumor Study Group</i>
ohm	ohms
pb	par de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pmoles	picomoles
q.s.p.	quantidade suficiente para
QR	biblioteca de TW Quimiorresistente
QR2	biblioteca de TW Quimiorresistente 2 (<i>Collaborative Study Brazil-Netherlands</i>)
QS	biblioteca de TW Quimiossensível
QT	quimioterapia
RN	restos nefrogênicos
RNA	ácido ribonucléico
RNIL	restos nefrogênicos intra-lobares
RNPL	restos nefrogênicos peri-lobares
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase PCR</i>
SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
SG	sobrevida global
SIOP	<i>Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique</i>
SLE	sobrevida livre de eventos
TAE	tris-ácido acético-EDTA
TW	tumor de Wilms
TWQR	tumor de Wilms quimiorresistente
TWQS	tumor de Wilms quimiossensível
U	unidade
UKCCSG	<i>United Kingdom Children's Cancer Study Group</i>
µF	microFaradays
µg	micrograma
µL	microlitro

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O Tumor de Wilms	1
1.2	O Tratamento do Tumor de Wilms	7
1.3	Alterações Genéticas no Tumor de Wilms	16
1.4	Análise da Expressão Gênica	22
1.5	Resistência Quimioterápica	24
2	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivo geral	28
2.2	Objetivos específicos	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Aspectos Éticos	29
3.2	Casuística	29
3.2.1	Tumor de Wilms Quimiossensível	30
3.2.2	Tumor de Wilms Quimiorresistente	30
3.3	Colaboração Internacional	31
3.4	Material Biológico	32
3.5	Preparo do RNA	33
3.6	Síntese de cDNA	34
3.7	<i>SAGE</i>	36
3.8	Seleção dos Genes Diferencialmente Expressos	37
3.8.1	Análises de Bioinformática	37
3.8.1.1	Extração, Quantificação, Identificação e Classificação das <i>tags</i>	38
3.8.1.2	Análise das <i>tags</i>	39
3.8.2	CrITÉRIOS Biológicos	42

4	RESULTADOS	43
4.1	Obtenção das amostras de RNA	43
4.2	Análise das Bibliotecas de <i>SAGE</i>	47
4.2.1	Extração e Identificação das <i>tags</i>	47
4.2.2	Seleção dos Genes Diferencialmente Expressos	48
4.2.2.1	Análise Biológica dos Genes Diferencialmente Expressos	54
4.3	Genes Selecionados	57
4.3.1	Genes hiper-expressos nos tumores de Wilms quimiorresistentes	57
4.3.2	Genes hipo-expressos nos tumores de Wilms quimiorresistentes	63
5	DISCUSSÃO	66
6	CONCLUSÕES	85
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

ANEXOS

Anexo 1 Autorização para a utilização das amostras pela Comissão de Ética em Pesquisa de Hospital do Câncer A. C. Camargo

Anexo 2 Modelo do termo de informação e consentimento do Hospital do Câncer A. C. Camargo

1 INTRODUÇÃO

1.1 O TUMOR DE WILMS

O tumor de Wilms (TW) ou nefroblastoma é uma neoplasia maligna primária do rim que acomete cerca de sete em cada milhão de crianças com idade inferior a 15 anos (STILLER e PARKIN 1990; BIRCH e BRESLOW 1995; GRUNDY et al. 2002), correspondendo a 98% dos tumores renais malignos na infância (BOWN et al. 2002) e a cerca de 6% do total de neoplasias malignas nesta população (STILLER e PARKIN 1990; LAI e TAY 1997; GRUNDY et al. 2002). Algumas diferenças podem ser observadas em sua distribuição mundial sendo ligeiramente mais freqüente em populações de origem negra, com uma incidência superior a 10 / 1.000.000 casos para negros norte-americanos e nigerianos (STILLER e PARKIN 1990) enquanto que uma menor incidência é descrita para populações de origem asiática, com cerca de 3 / 1.000.000 casos (STILLER e PARKIN 1990; DUCORE et al. 2004; HUNG et al. 2004). O Brasil é apontado como um dos países com maior incidência mundial de TW, tendo como referência a cidade de São Paulo cuja incidência anual de TW é de cerca de 7 casos por milhão de crianças (PARKIN et al. 1988; STILLER e PARKIN 1990). Em cerca de 95% dos casos, os tumores de Wilms são unilaterais, acometendo geralmente ambos os sexos na mesma proporção. Mais de 70% dos casos são diagnosticados antes dos cinco anos de idade, com um pico de incidência no segundo ano (STILLER e PARKIN 1990) e com uma idade média ao diagnóstico menor para os meninos do que para as meninas (41,5 e 46,9

meses, respectivamente) (GRUNDY et al. 2002). Para as populações de origem asiática, sobretudo provenientes do leste da Ásia, outras diferenças quanto à sua distribuição podem também ser observadas. Além de mais raro nesta população, observa-se um predomínio da incidência de TW em meninos, com uma relação M:F de até 1,5:1 e em crianças mais jovens, onde até 42% dos casos ocorrem em crianças menores de 1 ano em comparação a cerca de 15% em outras populações (GRUNDY et al. 2002). Estas variações na incidência mundial do TW, mais relacionadas a fatores étnicos do que geográficos, apontam para um maior envolvimento de fatores genéticos do que ambientais na gênese do TW (PRITCHARD-JONES e HAWKINS 1997; FUKUZAWA et al. 2004).

Ainda que a grande maioria dos tumores de Wilms seja unilateral e de ocorrência esporádica, 5 a 10% são bilaterais e 1 a 2% apresentam história familiar de TW sugerindo uma origem germinativa (PRITCHARD-JONES e HAWKINS 1997; DOME e COPPES 2002; GRUNDY et al. 2002). Nestes casos, a idade de aparecimento do tumor é mais precoce, sendo de 29,5 e 32,6 meses para meninos e meninas, respectivamente (GRUNDY et al. 2002) e estão mais frequentemente associados a malformações congênitas, principalmente do trato gênito-urinário e a síndromes genéticas. A associação com síndromes genéticas ocorre em cerca de 2% dos TW, sendo que as mais freqüentes são a *síndrome de WAGR*, caracterizada por TW, aniridia, malformações do trato gênito-urinário e retardo mental; a *síndrome de Denys-Drash*, caracterizada por esclerose mesangial difusa com falência renal precoce, disgenesia gonadal XY e risco aumentado de TW; e a *síndrome de Beckwith-Wiedemann*, caracterizada por um supercrescimento que pode variar de gigantismo a hemihipertrofia, visceromegalia, macroglossia, hiperglicemia

hiperinsulinêmica e predisposição ao desenvolvimento de neoplasias embrionárias, dentre elas o TW (PRITCHARD-JONES e HAWKINS 1997; GRUNDY et al. 2002; STRONG 2003). Outras síndromes menos freqüentes também podem estar acompanhadas de TW, como as *síndromes de Perlman, Frasier, Sotos, Simpson-Golabi-Behemel* e *Bloom*. Anomalias isoladas como aniridia esporádica, hemihipertrofia e malformações gênito-urinárias podem também ser acompanhadas de TW sem, contudo, caracterizar uma síndrome. As anomalias gênito-urinárias estão presentes em 4,5 a 7,5% dos pacientes com TW unilateral e em 13,4% dos casos de tumor bilateral (WIENER et al. 1998).

O TW é uma neoplasia embrionária originada a partir de erros no processo de diferenciação celular durante a nefrogênese normal, culminando em uma estagnação da diferenciação celular em estágios precoces do desenvolvimento metanéfrico, na transição mesênquimo-epitelial (LAI e TAY 1997; LI et al. 2002). A persistência indevida de focos de tecido nefroblástico indiferenciado após a conclusão do processo normal de nefrogênese no período embrionário, conhecidos como restos nefrogênicos (RN), é indicativa de falhas na diferenciação normal das células renais embrionárias. Os restos nefrogênicos são considerados como lesões precursoras do TW, sendo encontrados em 25 a 40% dos TW esporádicos unilaterais e em cerca de 100% dos TW bilaterais (BECKWITH 1993; LAI e TAY 1997; PRITCHARD-JONES e HAWKINS 1997), enquanto que estão presentes em somente 1% dos rins não tumorais (GRUNDY et al. 2002). Sua localização no rim reflete o momento do processo de diferenciação celular em que a falha ocorreu e está relacionada à apresentação morfológica do tumor. Quando localizados no interior do lobo renal são denominados de RN intra-lobares (RNIL) e sugerem falhas em fases precoces do

desenvolvimento renal, estando mais associados a anomalias congênitas e a tumores ricos em elementos estromais. Quando localizados na periferia do lobo renal são denominados de RN peri-lobares (RNPL) e sugestivos de distúrbios tardios no desenvolvimento renal possuindo assim um potencial de diferenciação mais amplo, estando associados à presença de blastema e túbulos renais (PRITCHARD-JONES e HAWKINS 1997; LAI e TAY 1997; RAVENEL et al. 2001; GRUNDY et al. 2002; SCHUMACHER et al. 2003).

O TW é constituído por três tipos histológicos principais que mimetizam os diferentes estágios do desenvolvimento renal normal: blastema, epitélio e estroma ou mesênquima. O blastema é constituído por pequenas células redondas indiferenciadas, análogas às células primitivas do blastema metanéfrico dos embriões. Os elementos epiteliais se apresentam principalmente sob a forma de túbulos abortivos, estruturas glomerulares embrionárias, estruturas papilares e rosetas. Os elementos estromais geralmente são constituídos de tecido fibroconjuntivo frouxo ou mixóide, sendo que derivados mesodérmicos como músculo liso, músculo estriado, tecido adiposo, cartilagem ou osso, podem estar presentes. A distribuição destes três elementos histológicos no tumor é variável, todos podendo coexistir ou não em um mesmo espécime tumoral (tumores mono, di ou trifásicos), sendo que qualquer um dos três elementos pode predominar (LAI e TAY 1997; LI et al. 2002; GRUNDY et al. 2002). Além de diferenças estruturais, os componentes histológicos do TW apresentam diferentes comportamentos quanto à resposta terapêutica. Os componentes epitelial e estromal são pouco responsivos à quimioterapia, entretanto, costumam ser também pouco agressivos. Já, o componente blastematoso é caracterizado por ser altamente invasivo, freqüentemente associado a

estádios avançados da doença, porém costuma apresentar alta sensibilidade à quimioterapia (WEIRICH et al. 2001; BECKWITH et al. 1996).

O TW tem como principais fatores de prognóstico o padrão histológico e o estadiamento clínico (WIENER et al. 1998; WEIRICH et al. 2001), sendo estes, portanto, os fatores mais amplamente utilizados na identificação dos diferentes grupos de risco e assim, determinantes da terapia instituída. O estadiamento baseia-se na extensão da doença, sendo reconhecidos cinco estádios clínicos principais para os TW conforme exposto na Tabela 1.

Tabela 1 - Estadiamento clínico simplificado de TW.

Estádio I	Tumor restrito ao rim, completamente ressecado.
Estádio II	Tumor se estende além do rim, porém completamente ressecado. (restrito à loja renal)
Estádio III	Tumor se estende além do rim, ressecção incompleta, implantes peritoniais. (restrito ao abdome)
Estádio IV	Disseminação hematogênica / metástases à distância.
Estádio V	Tumor bilateral.

Do ponto de vista histológico, os TW são classificados em histologia favorável e desfavorável tendo como base a ausência ou presença de anaplasia, respectivamente. A anaplasia é definida pela presença de células com núcleo com grande aumento de tamanho em relação às células adjacentes (≥ 3 vezes), com várias figuras mitóticas multipolares (poliplóide) e com conteúdo aumentado de cromatina (hipercromasia). Dependendo de sua topografia, a anaplasia pode ser focal ou difusa. A anaplasia focal é caracterizada pela presença de células anaplásicas confinadas a

uma região bem delimitada dentro do tumor primário, não podendo ser encontradas em nenhum local fora do parênquima renal. Por outro lado, a anaplasia é considerada difusa quando é encontrada em mais de um local do tumor, quando está presente em qualquer local fora do parênquima renal ou quando é detectada por biópsia randômica (BECKWITH et al. 1996; FARIA et al. 1996; WIENER et al. 1998; GRUNDY et al. 2002). A anaplasia está presente em 5 a 10% dos casos de TW e tem grande importância prognóstica, estando relacionada principalmente à resistência quimioterápica devido à associação com mutações no gene *TP53* (BARDEESY et al. 1995). No entanto, o valor prognóstico da anaplasia está mais relacionado à sua distribuição do que à sua presença. Isto se deve ao fato de que a anaplasia focal, por estar restrita ao parênquima renal, faz com que o prognóstico tumoral, nestes casos, seja determinado pela ressecabilidade do tumor, possuindo desta maneira, o mesmo valor prognóstico dos casos não anaplásicos (histologia favorável). Os casos com anaplasia difusa, por outro lado, cursam com maiores índices de recaída e óbito independente do estadiamento (BECKWITH et al. 1996).

O uso da quimioterapia pré-operatória por alguns grupos de tratamento de TW tem permitido identificar diferentes padrões de resposta clínica e histológica à quimioterapia o que tem possibilitado atualmente, utilizar a resposta à quimioterapia pré-operatória como critério de classificação para os TW com provável importância prognóstica baseada no risco de recidiva tumoral (VUJANIC et al. 2002). No entanto, esta classificação não é adotada por todos os grupos de tratamento de TW e será melhor discutida a seguir.

1.2 O TRATAMENTO DO TUMOR DE WILMS

O tratamento do TW tem mostrado sinais de sucesso ao longo de sua história. No início do século XX, quando a única forma de tratamento para estes tumores era a cirurgia, a sobrevida dos pacientes não ultrapassava os 10%. Melhorias na abordagem cirúrgica foram as primeiras responsáveis por um aumento da sobrevida, porém, foi a introdução de novas modalidades terapêuticas, como a radioterapia nos anos 40 e a quimioterapia na década de 60, que possibilitou o grande aumento dos índices de sobrevida atingindo, atualmente, índices de cura superiores a 80% com a utilização de esquemas terapêuticos combinando estas três modalidades (GODZINSKI et al. 1995).

O TW foi o primeiro tumor sólido maligno a se mostrar responsivo à quimioterapia, com o uso da actinomicina D como terapia adjuvante à ressecção cirúrgica do tumor (FARBER 1966). Através de dois estudos envolvendo crianças com TW metastático, FARBER et al. (2002) observaram que 100% dos pacientes com TW analisados, submetidos somente à ressecção cirúrgica do tumor evoluíram para óbito nos períodos observados, enquanto que pacientes que receberam terapia adjuvante com actinomicina D concomitante à radioterapia apresentaram sobrevida livre de doença de até 50 meses após o diagnóstico. Frente aos primeiros resultados observados para a actinomicina D, outras drogas passaram a ser testadas mostrando-se eficazes no tratamento do TW, sobretudo a vincristina, proposta por SUTOW* et al. (1963) para o tratamento de TW metastático com excelentes resultados. O uso conjunto da actinomicina D e da vincristina foi o foco do primeiro ensaio clínico do

* Autor não referenciado no banco de dados (MedLine). Autor referenciado: MACMAHON.

National Wilms Tumor Study Group (NWTSG-1) em 1969 e, devido aos bons resultados alcançados por este ensaio clínico, estas se tornaram as principais drogas utilizadas para o tratamento do TW (D'ANGIO et al. 1976).

Ensaio clínicos sucessivos foram e continuam sendo desenvolvidos com o objetivo de otimizar a abordagem terapêutica do TW, atualmente centralizados em dois grandes grupos principais, o norte-americano *National Wilms Tumor Study Group* (NWTSG), hoje chamado *Children Oncology Group* (COG), e o europeu *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique* (SIOP). Ambos os grupos adotam esquemas quimioterápicos muito semelhantes, com a utilização das mesmas drogas, sendo o principal ponto de divergência entre eles a realização ou não de tratamento quimioterápico pré-operatório. Enquanto que pelo NWTSG é realizada a ressecção cirúrgica do tumor como primeira abordagem terapêutica, a SIOP adota a realização de quimioterapia pré-operatória (GODZINSKI et al. 1995; WIENER et al. 1998; PRITCHARD-JONES 2002; BECKWITH 2002; D'ANGIO 2003). Dois outros grupos para o tratamento dos TW devem ser também mencionados por sua importância: o grupo brasileiro denominado Grupo Cooperativo Brasileiro para o Tratamento do Tumor de Wilms (GCBTTW) e o grupo inglês denominado *United Kingdom Children's Cancer Study Group* (UKCCSG). Estes dois grupos adotam seus próprios protocolos de tratamento, porém ambos estão inseridos no atual estudo e ensaio clínico adotado pela SIOP.

O tratamento para o TW, independente do protocolo adotado, baseia-se, em linhas gerais, na utilização da actinomicina D e da vincristina para todos os estádios, com o acréscimo de outros quimioterápicos como a doxorrubicina, a ciclofosfamida

e o etoposide e da radioterapia para os estádios mais avançados e/ou de histologia desfavorável, como pode ser visto nas Tabelas 2 e 3.

A quimioterapia (QT) pré-operatória para o TW foi inicialmente proposta como terapia neoadjuvante, alternativa à radioterapia pré-operatória através do protocolo de estudo e ensaio clínico SIOP-5 de 1977. Por se consagrar como facilitadora da remoção cirúrgica do tumor, possibilitando a redução do volume tumoral e a diminuição do risco de ruptura intra-operatória sem a exposição aos efeitos radioterápicos, a QT pré-operatória passou a ser realizada para todos os pacientes a partir do estudo subsequente SIOP-6 em 1980 (DE KRAKER et al. 2004). O esquema quimioterápico pré-operatório adotado pela *SIOP* para tumores unilaterais não metastáticos (estádios clínicos I a III) consiste na administração de vincristina semanal e de actinomicina D quinzenal por um período de quatro semanas após o qual é reavaliada radiologicamente a resposta do tumor, seguida de sua ressecção cirúrgica. Neste momento o tumor é então estadiado quanto à sua extensão e é realizada a análise histológica de todo o espécime tumoral considerando a presença de necrose e a composição histológica do tumor. Um determinado tipo histológico é considerado predominante quando constitui mais de 2/3 (> 65%) da população de células tumorais remanescentes (VUJANIC et al. 2002). Em casos específicos, sobretudo em casos de tumor bilateral (estádio V), a quimioterapia pré-operatória pode ser estendida por mais quatro semanas e, para os tumores metastáticos (estádio IV), ela é acrescida de doxorrubicina e tem duração de seis semanas (Tabela 2) (DE KRAKER et al. 2004).

Os resultados dos mais recentes ensaios clínicos finalizados pelo *NWTSG* (NWTSG-5) e pela *SIOP* (SIOP 93-01) demonstraram que ambos os grupos atingiram

índices de sobrevida bastante elevados, com uma sobrevida global (SG) em 4 anos de 95% (NWT5-5) e 90% (SIOP 93-01) para tumores de estádios I a III e de 81% para ambos os grupos considerando os estádios I a IV (D'ANGIO 2003; DE KRAKER et al. 2004).

Uma vez atingidos índices de cura tão expressivos e considerando a toxicidade das drogas utilizadas, principalmente para os estádios mais avançados como as cardiopatias secundárias ao uso da doxorubicina e as seqüelas da radioterapia como alterações de crescimento e desenvolvimento, infertilidade e disfunções obstétricas e risco de neoplasias secundárias (D'ANGIO 2003), surge a preocupação com a exposição desnecessária de uma grande parte dos pacientes aos efeitos deletérios de um tratamento muitas vezes excessivo, ao passo que poderiam se beneficiar com uma terapia mais branda e com uma menor morbidade, sem aumentar os riscos de recidiva da doença. Para isto, torna-se de fundamental importância poder diferenciar, no momento do diagnóstico, os tumores mais sujeitos a falhas terapêuticas e que devem receber esquemas terapêuticos mais agressivos, daqueles tumores que podem receber uma terapia mínima necessária para manter os índices de cura.

Neste sentido, com o objetivo de aumentar a sobrevida dos portadores de TW através da diminuição da intensidade do tratamento para os pacientes de melhor prognóstico e do direcionamento das terapias mais agressivas àqueles de pior prognóstico, os atuais ensaios clínicos desenvolvidos pelos grupos colaborativos de estudo do TW têm buscado identificar fatores de prognóstico mais sensíveis que possibilitem a determinação de novos grupos de risco relacionados à resposta terapêutica e ao risco de recaída a partir de características próprias de cada espécime

tumoral, possibilitando assim o desenvolvimento de uma terapia mais individualizada (WIENER et al. 1998; BOCCON-GIBOD et al. 2000; PRITCHARD-JONES 2002; DE KRAKER et al. 2004).

Com o aumento da eficácia do tratamento adjuvante para os TW, resultando na situação atual onde os elevados índices de sobrevida são observados inclusive para tumores metastáticos, não mais a agressividade, mas sim a resposta à terapia torna-se o mais importante fator determinante da sobrevida (BECKWITH et al. 1996), uma vez que reflete a capacidade de resposta das células tumorais aos agentes terapêuticos a que são expostas estando elas localizadas ou disseminadas. Portanto, neste momento, quando se busca melhorar a sobrevida dos portadores de TW através do desenvolvimento de terapias mais individualizadas, o conhecimento da resposta terapêutica tumoral torna-se essencial. No entanto, os fatores de prognóstico disponíveis atualmente, como o estadiamento e a presença de anaplasia, são limitados em gerar informações relacionadas à resposta individual ao tratamento. O estadiamento fornece informações principalmente relacionadas à agressividade tumoral como o poder de invasão e de disseminação metastática, sendo informativo acerca da resposta terapêutica somente se realizado após uma prévia exposição do tumor a agentes quimioterápicos. Já, a presença de anaplasia está mais intimamente relacionada à resistência quimioterápica, porém, pelo fato da anaplasia focal estar restrita ao parênquima renal e por isso vinculada à ressecabilidade do tumor, somente os casos de anaplasia difusa é que efetivamente caracterizam um grupo de pior prognóstico. E considerando a raridade dos TW anaplásicos, a anaplasia difusa como fator de prognóstico acaba por ter um impacto restrito na sobrevida se levarmos em conta a totalidade dos casos de TW.

É justamente neste momento, devido à escassez de fatores de prognóstico relacionados à resposta terapêutica, que a quimioterapia pré-operatória ganha importância. Por servir como um teste *in vivo* de resposta quimioterápica, a QT pré-operatória fornece informações diretas quanto à resposta quimioterápica de cada indivíduo, permitindo uma estratificação dos pacientes em grupos de risco de falha terapêutica e, com isso, auxiliando na definição da QT pós-operatória a ser instituída (WEIRICH et al. 2001).

Tendo como base a resposta à quimioterapia pré-operatória, a *SIOP* propôs, em 1994, uma classificação para os tumores renais da infância (DELEMARE et al. 1996), a partir da qual foi desenvolvido o estudo e ensaio clínico SIOP-9 cujo objetivo era analisar os diferentes componentes histológicos do TW quanto aos efeitos da QT pré-operatória e sua implicação prognóstica. Através deste estudo, foi possível observar que o componente blastematoso é, dentre os componentes histológicos do TW, o de maior impacto no prognóstico por ser o mais relacionado tanto à agressividade tumoral quanto à resistência quimioterápica. A agressividade natural destes tumores pode ser observada por sua maior associação a estádios avançados. No entanto, na maioria dos casos, esta agressividade é compensada por uma alta sensibilidade à quimioterapia, observada pelos altos índices de necrose tumoral após a exposição à QT pré-operatória, o que parece ser responsável pelo ótimo prognóstico associado a estes tumores. Entretanto, em cerca de 10 a 20% dos casos, o componente blastematoso está presente e predominante no momento da cirurgia, indicando uma resistência natural à quimioterapia realizada na etapa pré-operatória, sendo estes os tumores que mais freqüentemente associam-se à recidiva. Por este motivo, os tumores deste tipo, caracterizados por uma associação entre

agressividade e resistência quimioterápica, têm sido vistos, pela *SIOP*, como os de pior prognóstico dentre os demais subtipos (BECKWITH 2002; VUJANIC et al. 2002; WEIRICH et al. 2001).

Os resultados observados no estudo SIOP-9 deram origem à classificação adotada pelo atual protocolo de estudo e ensaio clínico SIOP 2001, que é estruturado na histologia e estadiamento tumoral após quimioterapia pré-operatória onde, para fins terapêuticos, três tipos principais de TW são reconhecidos: 1- *tumores de baixo risco*, caracterizados principalmente pelos tumores identificados como completamente necróticos, nos quais não são encontradas células tumorais viáveis (<1%), correspondendo provavelmente aos tumores com alta sensibilidade à quimioterapia. Quando limitados ao rim, estes tumores não recebem nenhuma outra terapêutica além da QT pré-operatória e cirurgia, caso contrário, recebem QT pós-operatória menos agressiva, somente com actinomicina D e vincristina, sem radioterapia; 2- *tumores de risco intermediário*, representados pelos TW com predomínio epitelial e estromal (no mínimo 2/3 do tecido tumoral viável), tumores dos tipos misto (tumor viável remanescente composto por pelo menos dois dos três componentes) e regressivo (tumores com menos de 1/3 de tecido tumoral viável) ou tumores com anaplasia focal. Este grupo, representado principalmente por tumores com baixo potencial metastático, cujo prognóstico parece estar relacionado ao seu estadiamento, recebem, quando limitados à loja renal, também QT pós-operatória menos agressiva, somente com actinomicina D e vincristina, sem radioterapia; e 3- *tumores de alto risco*, representados pelos TW com anaplasia difusa e pelos TW de predomínio blastematoso, caracterizado pela persistência do componente blastematoso após a QT pré-operatória. Este grupo corresponde aos tumores

aparentemente resistentes à quimioterapia recebendo, conseqüentemente, terapia pós-operatória agressiva com a inclusão de outros agentes quimioterápicos e da radioterapia (Tabela 2).

Tabela 2 - Esquema terapêutico para TW unilaterais segundo o protocolo SIOP 2001.

Pré – operatório		Pós – operatório		
Estadiamento Clínico	QT	Estadiamento Clínico	QT	RxT
Tumores localizados (E I – III)	V + A 4 semanas	BR	Nenhuma	Não
		EI	RI	V + A
		AR	V + A + D	Não
		BR	V + A	Não
		E II	RI	V + A (+ D)*
		AR	VP + C + D + CTX	Sim
		BR	V + A	Não
		E III	RI	V + A (+ D)*
		AR	VP + C + D + CTX	Sim
		RC	E I / II	V + A + D
Tumores metastáticos (E IV)	V + A + D 6 semanas	E III	V + A + D	Sim
		RP	E I / II	VP + C + D + CTX
		E III	VP + C + D + CTX	Sim
		AR	E I – III	VP + C + D + CTX
		AR	E I – III	VP + C + D + CTX

A: actinomicina D; AR: alto risco; BR: baixo risco; C: carboplatina; CTX: ciclofosfamida; D: doxorubicina, sendo que * corresponde à randomização entre V+A com ou sem doxorubicina; E: estágio; QT: quimioterapia; V: vincristina; VP: etoposide; RC: ressecção tumoral completa; RI: risco intermediário; RP: ressecção tumoral parcial; RxT: radioterapia.

Tabela 3 - Esquema terapêutico para TW segundo NWTSG.

Estadiamento Clínico	Quimioterapia pós-operatória	Radioterapia
E I e II HF E I HD (AF/AD)	V + A	Não
E III e IV HF E II – IV HD (AF)	V + A + D	Sim
E II – IV HD (AD)	V + A + D + CTX + VP	Sim

A: actinomicina D; AD: anaplasia difusa; AF: anaplasia focal; CTX: ciclofosfamida; D: doxorubicina; E: estágio; HD: histologia desfavorável; HF: histologia favorável; V: vincristina; VP: etoposide.

Como se pode ver, o TW é uma neoplasia que possui uma histologia peculiar, composto por diferentes tipos histológicos com comportamentos bastante distintos, sobretudo quanto à resposta terapêutica. Apesar das diferentes abordagens terapêuticas já instituídas para o TW, os índices de cura são atualmente bastante expressivos mostrando que os TW são, na maioria das vezes, sensíveis ao tratamento e que muitos pacientes podem se beneficiar de uma terapia mais branda, com um menor risco de seqüelas, sem que isso comprometa sua sobrevida. No entanto, cerca de 20% dos pacientes são refratários aos esquemas terapêuticos disponíveis e acabam por sucumbir à doença, sendo a resistência quimioterápica a principal responsável pelas falhas terapêuticas. Sabe-se hoje que o componente blastematoso é, dentre os componentes histológicos do TW, o de maior impacto no prognóstico, uma vez que é o mais invasivo e pode ser sensível ou resistente à QT. Portanto, para a identificação de novos e mais sensíveis fatores de prognóstico, que permitam uma identificação precisa dos pacientes bons e maus respondedores ao tratamento, é necessário saber mais sobre a biologia deste componente tumoral, buscando compreender melhor os mecanismos envolvidos no processo de resistência quimioterápica.

1.3 ALTERAÇÕES GENÉTICAS NO TUMOR DE WILMS

Sabe-se hoje que diversos eventos genéticos estão envolvidos na gênese do TW, eventos estes que acabam por interferir na função de genes relacionados aos processos de proliferação e de diferenciação celular levando, conseqüentemente, ao desenvolvimento tumoral e seu fenótipo. Diferentes genes envolvidos direta ou indiretamente nestes processos já foram identificados e parece haver, na gênese do TW, uma participação preferencial de genes supressores de tumor com perda de função do que da ativação de oncogenes (GRUNDY et al. 2002).

Algumas características presentes nos tumores de Wilms, como a existência de variações em sua distribuição populacional e etária, a presença de tumores uni e bilaterais e de casos com historia familiar e sua associação com diferentes anomalias congênitas e síndromes genéticas foram de fundamental importância para a identificação das alterações genéticas relacionadas a estes tumores. A associação dos TW com anomalias como a aniridia permitiu a detecção de uma região cromossômica comum a genes relacionados a estas características que foi posteriormente identificada como sendo a região 11p, região esta freqüentemente deletada na maioria dos TW por perda de heterozigose (*LOH*) (STRONG 2003). Dois *locus* independentes em 11p se mostraram relacionados aos TW: 11p13 e 11p15.

A análise da região 11p13 em indivíduos com *síndrome de WAGR* levou à identificação do primeiro e principal gene relacionado à patogênese do TW, o gene *WT1* e, a deleção de 11p13 nestes pacientes permitiu a localização de outros genes localizados contiguamente nesta região como é o caso do gene *PAX6*, responsável

pela aniridia, presente nesta síndrome (DOME e COPPES 2002; GRUNDY et al. 2002). O gene *WT1*, geralmente considerado um gene supressor de tumor, codifica um fator de transcrição do tipo *zinc finger* e atua como regulador de transcrição durante a diferenciação renal regulando a transcrição de diversos outros genes. Sua expressão é necessária para a sobrevivência e diferenciação do blastema metanéfrico durante o desenvolvimento gênito-urinário e na interação com genes envolvidos na determinação sexual. Ainda que 30 a 40% dos tumores de Wilms apresentem perda de heterozigose (*LOH*) na região de *WT1*, somente cerca de 15% apresentam mutações em *WT1*, muito mais frequentes em tumores de predomínio estromal, sendo este um evento pouco significativo para os tumores de predomínio blastematoso (SCHUMACHER et al. 2003). Apesar de necessitar da perda funcional dos dois alelos para o desenvolvimento tumoral, segundo a teoria de Knudson, sabe-se hoje que alterações específicas em apenas um dos alelos de *WT1* podem contribuir para um crescimento celular anormal, o que caracteriza nestes casos uma função oncogênica dominante negativa. Isto pode ser observado na *síndrome de Denys-Drash*, resultante de mutações pontuais em um único alelo de *WT1* caracterizando uma mutação disfuncional, onde a proteína mutada exerce um efeito inibitório sobre a proteína selvagem resultando em um fenótipo mais severo em comparação ao da *síndrome de WAGR*. Alterações em *WT1*, sejam elas mutações pontuais ou deleções completas, estão associadas a síndromes predisponentes não só para TW como as síndromes de *WAGR* e *Denys-Drash*, como também para outros tumores e malformações do trato gênito-urinário como é o caso do gonadoblastoma e do pseudohermafroditismo na *síndrome de Frasier* (DOME e COPPES 2002),

sustentando seu envolvimento no desenvolvimento gênito-urinário e no processo de diferenciação sexual (LAI e TAY 1997; GRUNDY et al. 2002).

A região 11p15, conhecida como *locus* WT2, foi identificada a partir da observação de que, em parte dos TW com perda de heterozigose em 11p, a região envolvida era 11p15 e não 11p13 e também, pelo fato de ser este o *locus* responsável pela *síndrome de Beckwith-Wiedemann*, associada a um risco aumentado de TW. Esta região foi posteriormente caracterizada como sendo uma região de *imprinting* genômico, que é uma alteração epigenética caracterizada pela expressão preferencial de um dos alelos de um gene, paterno ou materno, enquanto o outro alelo é silenciado, levando à expressão monoalélica deste gene. Nos TW parece haver uma tendência ao silenciamento dos alelos maternos e à manutenção dos alelos paternos. De uma série de genes com expressão parental preferencial localizados nesta região, três puderam ser relacionados aos TW: os genes *IGF2*, *H19* e *p57^{kip2}*. Estes genes estão relacionados à proliferação celular e, a perda do mecanismo de *imprinting* genômico em um de seus alelos contribui para o processo de tumorigênese. O gene *IGF2* (*Insulin-like Growth Factor-2*), cuja expressão é proveniente do alelo paterno, codifica um fator de crescimento embrionário. A perda do mecanismo de *imprinting* do alelo materno leva à expressão bialélica deste gene e sua hiper-expressão, freqüentemente observada nos TW, é responsável por um hiper estímulo da proliferação celular, provável mecanismo responsável pelo crescimento tumoral relacionado a este gene (LAI e TAY 1997; WIENER et al. 1998; DOME e COPPES 2002; GRUNDY et al. 2002; STRONG 2003). A expressão bialélica de *IGF2* inibe a expressão dos genes *H19* e *p57^{kip2}*, que possuem função supressora da proliferação celular, sendo o *H19* é um gene supressor de tumor e o *p57^{kip2}* um inibidor do ciclo

celular, normalmente expressos às custas do alelo materno (LAI e TAY 1997; WIENER et al. 1998; DAO et al. 1999; DOME e COPPES 2002).

A análise de famílias com vários indivíduos afetados pelo TW não relacionados a alterações em 11p13 e 11p15 levaram à identificação de outras duas regiões relacionadas aos TW com história familiar, que são as regiões 17q e 19q, denominadas de FWT1 e FWT2 (*Familial Wilms Tumor 1 e 2*), respectivamente (DOME e COPPES 2002; GRUNDY et al. 2002; STRONG 2003).

Além destas, outras regiões cromossômicas têm sido relacionadas ao TW através de alterações citogenéticas freqüentemente observadas. Um estudo recente realizado por HÖGLUND et al. (2004), com o objetivo de identificar as anormalidades cromossômicas mais freqüentes nos TW, analisou todos os casos de TW com alterações citogenéticas presentes no principal banco de dados de alterações cromossômicas em câncer humano, o *Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer*, totalizando 353 cariótipos. As alterações mais freqüentemente observadas foram ganho de material dos cromossomos 1q, 6, 7q, 8, 12 e 13 e perda de material dos cromossomos 11 e 16, sendo que o ganho de todo o cromossomo 12 (+12) foi a mais comum, presente em 44% dos casos, seguido por ganho de 7q (+7q) e do cromossomo 8 (+8), ambos presentes em 28% dos casos. Resultados semelhantes já haviam sido encontrados por SHENG et al. (1990) que, analisando citogeneticamente 31 tumores de Wilms, encontrou a trissomia do cromossomo 12 como a alteração mais frequente, tanto estrutural quanto numérica, presente em 52% dos tumores analisados.

Grande parte das alterações citogenéticas encontradas nos TW tem se mostrado associadas ao seu prognóstico, como é o caso do ganho de material de 1q e

das perdas alélicas de 1p, 7p, 11q, 16q e 22q, que parecem estar todas associadas a uma pior evolução clínica. A perda de heterozigose das regiões 1p, presente em 10% dos TW e 16q, presente em 20% dos TW, estão associadas a um pior prognóstico relacionado principalmente à progressão e à recidiva tumoral (WIENER et al. 1998; BOWN et al. 2002; DOME e COPPES 2002; GRUNDY et al. 2002). Rearranjos estruturais levando ao ganho de material de 1q e conseqüentemente ao aumento da expressão de genes desta localização parecem estar associados a um maior risco de recaída tumoral (BOWN et al. 2002; WILLIAMS et al. 2004). Translocações levando à *LOH* de 7p têm sido observadas em TW sugerindo a presença de um provável gene supressor de tumor nesta região, possivelmente o gene *PTH-B1* (VERNON et al. 2003), porém sem nenhuma correlação clínica evidenciada até o momento (DOME e COPPES 2002; GRUNDY et al. 2002). A *LOH* de 11q, presente em cerca de 9% dos TW, parece estar associada a tumores anaplásicos e à recorrência tumoral (KLAMT et al. 1998; BOWN et al. 2002). A perda de material de 22q está associada à anaplasia e conseqüentemente à falha terapêutica e recidiva tumoral (BOWN et al. 2002; STOCK et al. 2002).

Anomalias cromossômicas numéricas como estas, sobretudo quando envolvem um cromossomo inteiro, são de difícil interpretação, pois envolvem uma enorme quantidade de genes localizados nestas regiões, dificultando assim a identificação dos genes realmente envolvidos com a patologia em questão. Dentre os genes já identificados como relacionados aos TW estão os genes *Pax-2*, *Pax-8*, *E1A*, *TP53* que, quando desregulados, podem participar da patogênese do TW principalmente por influência sobre a expressão de *WT1* (LAI e TAY 1997). Além destes, análises do nível de expressão de genes envolvidos com os processos de

iniciação e progressão tumoral tem identificado, em amostras de TW, alterações em genes como *TRKB*, *VEGF*, *fas* e genes da família *INK4* de inibidores de quinases ciclina-dependentes (*INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors*), todos com importância prognóstica (DOME e COPPES 2002).

Apesar de grande parte destas alterações citogenéticas relacionadas aos TW apresentar alguma correlação com o prognóstico, nenhuma mostrou, até o momento, uma especificidade adequada em uma população numericamente significativa para que possam ser estabelecidas como marcadores de prognóstico para estes tumores. Atualmente as anomalias citogenéticas que têm mostrado uma maior significância prognóstica para o TW são a perda de heterozigose dos cromossomos 1p e 16q, a perda de material cromossômico de 22q e a presença de mutações do gene *TP53*. A perda de heterozigose dos cromossomos 1p e 16q está associada a uma pior sobrevida livre de eventos (SLE) e sobrevida global (SG) sugerindo algum grau de resistência ao tratamento, entretanto, estão restritas a uma minoria dos casos de TW (10% e 20%, respectivamente) e não há, até o momento, nenhuma evidência de que possam estar associadas ao componente blastematoso. A perda de material cromossômico de 22q e a presença de mutações do gene *TP53*, apesar de indicarem tumores com maior risco de recaída por falha terapêutica, estão vinculados à anaplasia, não tendo valor prognóstico em tumores não anaplásicos ou com anaplasia focal que, juntos, correspondem a mais de 90% dos TW (PRITCHARD-JONES e HAWKINS 1997; WIENER et al. 1998; BOWN et al. 2002; STOCK et al. 2002; DOME e COPPES 2002; GRUNDY et al. 2002).

Como é possível observar, ainda não foram identificados bons marcadores moleculares capazes de distinguir, dentre os TW não anaplásicos, os tumores de bom prognóstico daqueles de mau prognóstico. Para isto, são necessários estudos mais específicos, direcionados principalmente às alterações gênicas do tumor como, por exemplo, os estudos de análise da expressão gênica.

1.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

A transformação de um tecido normal em neoplásico é acompanhada por uma mudança no padrão de expressão de uma série de genes, o que se reflete em uma diferente oferta de RNAs mensageiros (mRNA) correspondentes a estes genes. Esta diferença na expressão gênica ocorre, contudo, não só entre tecido tumoral e não tumoral, mas também entre diferentes fases evolutivas e entre variantes de um mesmo tumor. Logo, o perfil de expressão gênica pode não só fornecer informações para a compreensão do desenvolvimento tumoral, como também tem se mostrado um instrumento bastante útil na classificação das neoplasias, na pesquisa de marcadores moleculares de prognóstico e na identificação de alvos para o desenvolvimento de novas armas terapêuticas.

Em um estudo envolvendo um grupo de 18 crianças portadoras de Tumor de Wilms, LU et al. (2002) demonstraram, através do método de Hibridização Comparativa de Seqüências Expressas (*Comparative Expressed Sequence Hybridization* - CESH) que genes localizados em 1q estavam hiper-expressos em todos os tumores que apresentaram recaída em relação àqueles em remissão. Apesar do número limitado de casos, a importância deste estudo está em mostrar o potencial

que a análise dos perfis de expressão gênica pode ter no sentido de identificar potenciais marcadores moleculares de prognóstico que possam permitir diferenciar o tratamento para cada caso em particular.

O aumento de informações acerca da sequência do genoma humano tem permitido o desenvolvimento de novas tecnologias para a análise da expressão gênica em larga escala como, por exemplo, as técnicas de *SAGE* e *microarrays* de cDNA.

Os *microarrays* de cDNA (SCHENA et al. 1998) permitem a análise da expressão de milhares de genes simultaneamente, gerando um perfil de expressão do tecido estudado, através da hibridização de moléculas de cDNA provenientes do tecido tumoral e/ou normal, marcadas com corantes fluorescentes, com milhares de genes imobilizados em suportes, como lâminas de vidro ou membranas de *nylon* (LOCKHART e WINZELER 2000).

A técnica de *SAGE* (*Serial Analysis of Gene Expression*) permite, simultaneamente, não só a identificação dos genes que estão sendo expressos em um determinado tecido, como também gera informações sobre o nível de expressão destes genes (VELCULESCU et al. 1995). Nesta técnica, sequências de oligonucleotídeos ou etiquetas (*tags*) provenientes da porção 3' dos genes são obtidas pela digestão de moléculas de cDNA com diferentes enzimas de restrição, gerando fragmentos que são então ligados entre si e sequenciados. Deste modo, se obtém uma lista de etiquetas específicas para cada tecido que representam os genes expressos naquele tecido. O nível de expressão de cada gene é determinado pelo número de vezes que sua etiqueta é identificada. Um grande volume de dados gerados por esta técnica encontra-se disponível no banco público de dados de *SAGE* do *Cancer Genome Anatomy Project* (CGAP - <http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>), que

atualmente conta com mais de 20 milhões de *tags* provenientes de aproximadamente 300 bibliotecas de diferentes tecidos tumorais e normais. De todas estas, apenas quatro bibliotecas são de tecido renal totalizando 206.748 *tags*, sendo três bibliotecas de rim normal e uma biblioteca de carcinoma renal de adulto, não havendo até o momento nenhuma biblioteca de tumor de Wilms disponível.

1.5 RESISTÊNCIA QUIMIOTERÁPICA

A resistência às drogas antineoplásicas é a principal causa das falhas no tratamento das neoplasias da infância. Inúmeros mecanismos podem estar envolvidos com a refratariedade de um tumor a determinado agente quimioterápico, mecanismos estes geralmente determinados por fatores genéticos e relacionados ao aumento, diminuição ou alteração de produtos gênicos que podem interferir na disponibilidade tecidual da droga, em sua ação, metabolização e eliminação, assim como na capacidade de reparo celular e sensibilidade à apoptose. A resistência quimioterápica pode ser inerente a um determinado tumor, estando, portanto presente já ao diagnóstico, ou pode ser induzida por um mecanismo adaptativo frente a uma pressão seletiva exercida pelas drogas à que este tumor foi exposto (BALIS et al. 2002).

As células neoplásicas podem ser resistentes a um único agente ou grupo de agentes antineoplásicos ou podem ter um perfil de resistência a múltiplas drogas antineoplásicas não relacionadas. O fenótipo de resistência a múltiplas drogas melhor estabelecido é caracterizado por um efluxo celular exacerbado de vários agentes citostáticos levando a um menor acúmulo intracelular destes agentes (VOLM et al. 1995; BALIS et al. 2002). As principais proteínas relacionadas a este fenótipo são a

P-glicoproteína (P-gp) e as proteínas da família das *Multidrug Resistance Proteins* (MRPs). A P-gp, produto do gene *mdr-1*, é uma proteína de transporte que atua como uma bomba dependente de ATP, responsável pela eliminação de uma série de agentes citotóxicos do meio intra para o meio extracelular. Ela é expressa em diferentes tumores e em vários tecidos não tumorais e sua hiper-expressão em células neoplásicas promove uma menor concentração intracelular de drogas antineoplásicas, o que caracteriza seu mecanismo de resistência quimioterápica (VOLM et al. 1995; BALIS et al. 2002). Apesar de mais freqüente em tumores de adultos, a hiper-expressão de P-gp pode ser observada em algumas neoplasias pediátricas, como é o caso das leucemias agudas, sendo, para as leucemias linfóides agudas, um fator de pior prognóstico podendo ser utilizado como marcador molecular de resposta quimioterápica (O'MEARA et al. 1992; CASALE et al. 2004). Para os TW, mesmo que presente em alguns grupos de tumores estudados, a hiper-expressão de P-gp não parece ter uma relação significativa com a resistência quimioterápica (SOLA et al. 1994; RE et al. 1997; CAMASSEI et al. 2002). Quanto às proteínas de transporte de drogas da família das MRPs, pouco se sabe sobre seu envolvimento com a resistência quimioterápica nos TW. No entanto, parece haver uma expressão heterogênea da MRP1 nestes tumores, com expressão preferencial nos componentes blastematoso e epitelial, estando aparentemente associada à expressão de genes relacionados à resistência a drogas como os genes *TP53*, *HSP70* e *LRP/MVP* (EFFERTH et al. 2001). Um outro mecanismo comumente relacionado à resistência quimioterápica em tumores é a hiper-expressão da proteína Bcl-2, uma proteína regulatória com ação inibitória sobre a cascata da apoptose. Como a indução da apoptose é o principal efeito da ação de várias drogas antineoplásicas, a super-expressão de Bcl2 pode

conferir resistência a estas drogas. Nos TW foi observada uma expressão preferencial de Bcl-2 no componente blastematoso de tumores de estádios avançados, sendo considerada como marcador de progressão tumoral independente do estágio (GHANEM et al. 2001).

Como já mencionado, as principais drogas utilizadas no tratamento pré-operatório de pacientes com TW são a vincristina e a actinomicina D. A vincristina é um quimioterápico da família dos alcalóides da vinca, classificada como uma droga anti-microtúbulos que exerce seu efeito citotóxico ligando-se às moléculas de tubulina e promovendo sua desorganização. A tubulina, principal componente dos microtúbulos, é uma proteína dimérica formada pelas sub-unidades alfa e beta (α e β -*tubulin*) e sua polimerização forma os microtúbulos, que estão envolvidos em uma série de funções celulares vitais como mitose, manutenção da estrutura da célula, quimiotaxia, transporte de solutos, transmissão de sinais e processo secretório. Logo, a desestruturação do sistema microtubular intracelular promove um amplo comprometimento das funções celulares. Estas drogas impedem a organização da tubulina em polímeros e suprimem a dinâmica dos microtúbulos, sendo a interrupção da mitose das células em divisão por inibição da formação do fuso mitótico o principal mecanismo de ação antineoplásica destes agentes. Os principais mecanismos de resistência aos alcalóides da vinca caracterizados até o momento estão relacionados à resistência a múltiplas drogas mediada por P-gp, caracterizado por um maior efluxo de drogas do meio intracelular. Outro mecanismo também observado relaciona-se às alterações das sub-unidades alfa e beta da tubulina por mutações ou modificações pós-traducionais, por comprometerem tanto a integridade

dos microtúbulos quanto por dificultar a ação destes agentes quimioterápicos (ROWINSKY e DONEHOWER 1996; RIGGS Jr. 2002).

A actinomicina D ou dactinomicina pertence à classe dos antibióticos antitumorais por ser um produto de metabolismo microbiano (*Actinomyces sp.*) e possuir efeitos deletérios sobre a molécula de DNA. Sua ação citotóxica é determinada por sua estrutura molecular, que tem o poder de intercalar-se entre bases na molécula de DNA (preferencialmente guaninas) causando quebras na molécula de DNA, bloqueando assim a replicação do DNA e a transcrição do RNA. A resistência a esta droga é determinada não só por uma baixa concentração intracelular da mesma, secundária à uma maior permeabilidade da membrana celular, como também por um eficiente sistema de reparo do DNA. Logo, condições que levem à uma maior permeabilidade celular, seja por perda da integridade da membrana ou por um funcionamento exacerbado da bomba de efluxo, assim como a hiper-atividade de proteínas envolvidas com o reparo do DNA, podem ser responsáveis por uma menor eficácia do tratamento com a actinomicina-D (ROWINSKY e DONEHOWER 1996; RIGGS Jr. 2002).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar os perfis de expressão gênica das amostras de componente blastematoso do tumor de Wilms sensível e resistente ao tratamento quimioterápico e identificar genes com expressão diferencial entre as duas populações celulares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Construir duas bibliotecas de *SAGE* a partir de amostras de tecido do componente blastematoso do Tumor de Wilms, sendo uma proveniente de tumor com características de sensibilidade ao tratamento quimioterápico usual e a outra proveniente de tumor com características de resistência a este tratamento;
2. Gerar 60.000 *tags* a partir de cada uma das bibliotecas de *SAGE* construídas;
3. Identificar genes diferencialmente expressos entre tumores de Wilms de componente blastematoso sensíveis e resistentes à quimioterapia através de análise de *SAGE*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Câncer do Hospital do Câncer A. C. Camargo - Fundação Antônio Prudente em reunião realizada no dia 27/11/2001, com o título “Identificação dos marcadores moleculares dos tumores embrionários através da análise dos perfis de expressão gênica”, sob o número 371/01, conforme documento em anexo (Anexo 1).

Todas as amostras envolvidas neste estudo possuem consentimento informado assinado (Anexo 2).

3.2 CASUÍSTICA

Para a construção das bibliotecas de *SAGE* foram selecionados dois casos de tumores de Wilms do tipo blastematoso que melhor representavam as condições de sensibilidade e resistência à quimioterapia. Para esta seleção foram revisados todos os prontuários dos pacientes com diagnóstico de tumor de Wilms atendidos no departamento de pediatria do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer - A. C. Camargo, no período de Novembro de 1997 a Maio de 2003, que possuíam amostras de tecido tumoral congeladas disponíveis, totalizando 34 prontuários. Foram consideradas as informações referentes às características clínicas, ao tratamento e à evolução destes pacientes.

Os casos envolvidos no estudo e suas respectivas características foram:

3.2.1 Tumor de Wilms Quimiossensível

Material tumoral do paciente DJZ, sexo masculino, com dois anos de idade ao diagnóstico, correspondendo à TW trifásico de predomínio blastematoso não anaplásico (histologia favorável). O paciente não recebeu quimioterapia pré-operatória. No ato cirúrgico foi observada aderência do tumor ao cólon e rotura tumoral e, a análise microscópica do tumor revelou invasão de pelve renal e presença de células neoplásicas viáveis na superfície tumoral, sendo então classificado como estágio III (disseminação tumoral abdominal). Após a ressecção cirúrgica do tumor o paciente recebeu radioterapia abdominal com 1.050cGy e esquema quimioterápico com actinomicina D, vincristina e doxorubicina (adriamicina) de acordo com o protocolo terapêutico do *GCBTTW* (equivalente ao protocolo do *NWTSG*) para tumores de estágio III de histologia favorável, com término em Julho de 1999. Atualmente o paciente encontra-se há 6 anos fora de tratamento sem sinais de doença em atividade.

3.2.2 Tumor de Wilms Quimiorresistente

Material tumoral da paciente JAS, sexo feminino, com dois anos de idade ao diagnóstico. Por fazer parte do protocolo SIOP 2001, o paciente recebeu quatro semanas de quimioterapia pré-operatória com actinomicina D e vincristina sendo em seguida submetido à ressecção cirúrgica do tumor. O exame histológico da peça cirúrgica revelou a presença de neoplasia viável correspondendo a TW trifásico não anaplásico de predomínio blastematoso (mais de 2/3 do tecido tumoral viável),

limitado ao rim, sendo, portanto classificado como estágio I - Alto Risco. O tratamento foi então complementado com quimioterapia adjuvante com actinomicina D, vincristina e doxorubicina de acordo com o protocolo SIOP 2001 para tumores de estágio I de Alto Risco com término em Julho de 2002. Fora de tratamento desde então, o paciente encontra-se atualmente sem sinais de doença em atividade.

3.3 COLABORAÇÃO INTERNACIONAL

Durante o andamento deste projeto foi estabelecida uma colaboração com o Dr. Marcel Kool, do Departamento de Neurogenética da Universidade de Amsterdam, Holanda, que está realizando um projeto com características semelhantes ao nosso, envolvendo a análise de expressão gênica de tumores de Wilms através da construção de bibliotecas de *SAGE*. Com o objetivo de fazer uma análise comparativa da expressão gênica entre os diferentes componentes do tumor de Wilms e rim não tumoral, este grupo gerou 8 bibliotecas de *SAGE* de tecido renal (7 de TW e uma de rim fetal não neoplásico), sendo que uma destas bibliotecas, composta por um total de 33.736 *tags*, era proveniente de um TW com características muito semelhantes ao utilizado para a construção de nossa biblioteca de TW quimiorresistente. Conforme as informações recebidas, esta biblioteca foi construída a partir de material tumoral de um paciente do sexo masculino, com cinco anos de idade ao diagnóstico, sem anomalias congênicas ou história familiar de TW. Por fazer parte do protocolo SIOP 2001, o paciente recebeu quatro semanas de quimioterapia pré-operatória com actinomicina D e vincristina sendo em seguida submetido à ressecção cirúrgica do tumor. O exame histológico da peça cirúrgica revelou a

presença de neoplasia viável correspondendo a TW de predomínio blastematoso não anaplásico, limitado ao rim, sendo, portanto classificado como estágio I - Alto Risco. O paciente recebeu quimioterapia adjuvante com actinomicina D, vincristina e doxorubicina de acordo com o protocolo SIOP 2001, porém apresentou recaída tumoral após 26 meses de seguimento evoluindo para óbito secundário à doença.

Por tratar-se de uma biblioteca correspondente a um TW com características de quimiorresistência semelhantes às encontradas no caso utilizado para a construção da nossa biblioteca de TW quimiorresistente, esta biblioteca, a qual denominamos de TW Quimiorresistente 2 (QR2), foi incluída no nosso estudo por possibilitar um aumento de confiabilidade nos resultados gerados pelas nossas análises.

3.4 MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras utilizadas neste estudo para a construção das bibliotecas de *SAGE* são provenientes do Banco de Tumores do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer - A. C. Camargo, São Paulo. Estas amostras foram colhidas a fresco durante o ato cirúrgico para tratamento de tumor de Wilms, foram submetidas a congelamento rápido em nitrogênio líquido e, após a seleção das áreas mais representativas foram, por fim, armazenadas a -70° C. Lâminas coradas por hematoxilina-eosina das amostras de interesse foram revisadas por um patologista, assim como os laudos anátomo-patológicos, para a confirmação do diagnóstico, da caracterização e distribuição dos componentes histológicos e do estadiamento. As amostras selecionadas foram submetidas à microdissecção para enriquecimento das

mesmas com o tecido tumoral de interesse e para a eliminação de áreas de necrose ou calcificações.

3.5 PREPARO DO RNA

O RNA total das amostras selecionadas foi isolado a partir de cerca de 500mg de tecido microdissecado congelado utilizando-se o método de extração com Isotiocianato de Guanidina seguida de centrifugação através de gradiente de Cloreto de Césio (CHRIGWIN et al. 1979). Resumidamente, as amostras de tecido foram homogeneizadas em 9mL de Solução de Lise (4M de Isotiocianato de Guanidina; 25mM de Citrato de Sódio – pH 7,0; 0,1M de β -mercaptoetanol) com auxílio do *polytron Power Gen (Fisher Scientific)*. O lisado foi transferido para um tubo de ultracentrífuga (*Ultra-Clear Tubes 14x95mm, Beckman*) contendo 4mL de Solução de Cloreto de Césio (5,7M de Cloreto de Césio; 25mM de Acetato de Sódio) e então submetido a ultracentrifugação a 29.000rpm por 20 horas a 20°C (Rotor SW 40Ti). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA foi solubilizado em 100 μ L de água DEPC, sendo que este último passo foi repetido por mais 3 vezes consecutivas para uma maior recuperação do RNA. O RNA presente em cada uma das alíquotas foi quantificado com o auxílio de um espectrofotômetro *GENEQUANT Pro (Amersham Pharmacia Biotech)*.

Após a extração, para verificar a integridade das amostras, 1 μ g de cada RNA foi dissolvido em um volume final de 10 μ L de água DEPC, acrescido de 10 μ L de Tampão de Amostra Desnaturante (1X TAE – pH 7,4 [40mL de Tris 1M pH - 8,0; 1,142mL de Ácido Acético Glacial; 2mL de EDTA 0,5M pH - 8,0; água DEPC q.s.p.

1.000mL]; 7M de Uréia; 30% de Glicerol, 0,1% de *Bromophenol Blue*), incubado a 65°C por 10 minutos e submetido à eletroforese em gel de agarose 1% contendo 20 µg/mL de Brometo de Etídio.

A verificação da presença de DNA genômico nas amostras de RNA foi realizada através de PCR com a utilização de *primers* desenhados nos íntrons 14 e 15 do gene *hMLH1* (*human mut-L homologue 1* – NM_000249.2). Foram utilizados os *primers* MLH-1F (5'-TGGTGTCTCTAGTTCTGG-3') e MLH-1R (5'-CATTGTTGTAGTAGCTCTGC-3') e as seguintes condições de reação: 1X Tampão de Reação para *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen); 1,5mM de MgCl₂; 0,2mM de dNTPs; 8pmoles de cada *primer*; 1,25U de *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen) e 100ng de RNA em um volume final de 25µL. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C seguida por dez ciclos com 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 62°C e 45 segundos a 72°C; dez ciclos com 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 60°C e 45 segundos a 72°C e quinze ciclos com 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 58°C e 45 segundos a 72°C, com um período de alongamento final de 7 minutos a 72°C. O produto da amplificação foi visualizado através de eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e coloração com prata (SANGUINETTI et al. 1994).

3.6 SÍNTESE DE cDNA

Dois microgramas de RNA total de cada amostra foram utilizados para a síntese de moléculas de cDNA pela ação da enzima *SuperScriptII* (Invitrogen) conforme as condições fornecidas pelo fabricante. Para esta reação, 2µg de RNA

total foram adicionados a 1µL de dNTPs (10mM), 1µL de oligo-dT (0,5µg/µL) e água milliQ para um volume final de 12µL. Essa mistura foi mantida a uma temperatura de 65°C por 5 minutos, sendo adicionados em seguida 2µL de DTT (0,1M), 4µL de tampão de reação 5X, 1µL de RNase OUT (40U/µL) (*Invitrogen*) e 1µL da enzima *SuperScript II* (200U/µL) (*Invitrogen*). A reação foi então incubada a 42°C por 1 hora e finalizada com uma incubação a 75°C por 15 minutos. Ao final, cada amostra de cDNA obtida foi diluída dez vezes em água milliQ.

A presença de moléculas longas de RNA e a eficiência da reação de síntese de cDNA foram avaliadas através da amplificação por PCR de um fragmento da extremidade 5' do gene *NOTCH 2* (*Notch homolog 2 (Drosophila)* - NM_024408) com a utilização dos *primers* NOTCH2-F (5'-TGTGGCCAACCAGTTCTCCT-3') e NOTCH2-R (5'-GGCAGTCATCAATAT TCCTC-3'). Para isto foram utilizados 5µL de cDNA diluído (10X); 1X Tampão de Reação para *Taq DNA Polymerase Recombinant* (*Invitrogen*); 1,5mM de MgCl₂; 0,2mM de dNTPs; 10pmoles de cada *primer* e 1,25U de *Taq DNA Polymerase Recombinant* (*Invitrogen*) em um volume final de reação de 25µL, e as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C seguida de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 60 segundos, com uma fase de alongamento final a 72°C por 7 minutos. Os fragmentos foram visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e coloração com prata (SANGUINETTI et al. 1994).

3.7 SAGE

Foram construídas duas bibliotecas de *SAGE*, uma representativa de tumor de Wilms blastematoso sensível à quimioterapia e outra representativa de tumor de Wilms blastematoso resistente à quimioterapia, com a utilização do *kit I-SAGE* (*Invitrogen*) segundo as condições fornecidas pelo fabricante. Em resumo, 30µg de RNA total de cada amostra foram ligados a *beads* magnéticas por sua cauda de poliA e usados como molde para a síntese de moléculas de cDNA. Após a síntese da segunda fita do cDNA, estas moléculas foram clivadas com a enzima de restrição *NlaIII*, que reconhece uma seqüência de quatro nucleotídeos (CATG), presente no genoma a cada 250 pares base aproximadamente ($4^4 = 256$). Este passo de digestão permite a seleção de fragmentos de cDNA de aproximadamente 250pb provenientes da extremidade 3' dos genes. Os fragmentos de cDNA foram então ligados a adaptadores (~ 40pb) contendo um sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *BsmFI* e uma seqüência de reconhecimento de *primers* específicos. Em seguida estes fragmentos foram clivados com *BsmFI*, originando moléculas de ~ 50pb contendo a seqüência de reconhecimento de um *primer* específico e o sítio de reconhecimento de *BsmFI*, ambos contidos nos adaptadores, e a *tag* de interesse. Estas moléculas foram unidas, duas a duas, formando fragmentos de ~ 100bp que foram então amplificados por PCR com o uso dos *primers* específicos. Todo o produto amplificado foi clivado novamente com *NlaIII* para a liberação dos adaptadores gerando fragmentos de 26pb contendo 2 *tags* (*ditags*) que, por fim, foram concatenados originando uma molécula grande composta por várias *ditags* (concatâmeros). Estas moléculas foram clonadas no plasmídeo *pZERO-1* (*Invitrogen*)

e introduzidas em bactérias *E. Coli TOP10* (Invitogen) por eletroporação utilizando-se um eletroporador *Gene Pulser II* (BIO-RAD), cubeta de 0,1cm e os seguintes parâmetros: voltagem 1,8kV; capacitância 25µF; resistência 200ohms. Os DNAs dos clones gerados foram extraídos conforme a técnica de purificação de DNA plasmidial descrita por MARRA et al. (1999) e seqüenciados utilizando-se o *primer* M13F (5'-CGCCAGGTTTCCAGTCACGAC-3') e o *kit Big Dye terminator sequencing* (Applied Biosystems). As reações de seqüenciamento foram analisadas no seqüenciador *ABI3700* (Applied Biosystems).

3.8 SELEÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

A seleção dos genes diferencialmente expressos foi um passo crucial nesse estudo. Portanto, com o objetivo de selecionar genes que melhor caracterizassem as condições de sensibilidade e/ou resistência quimioterápica do componente blastematoso do Tumor de Wilms, foram adotados diferentes critérios para a análise das *tags* geradas, envolvendo tanto passos de bioinformática quanto a investigação de aspectos biológicos.

3.8.1 Análises de Bioinformática

Toda a análise de bioinformática utilizada para a identificação e quantificação das *tags* e para a identificação de genes diferencialmente expressos foi realizada em colaboração com o Laboratório de Bioinformática do Hospital do Câncer sob a supervisão da Dra. Helena Brentani e com o grupo de bioinformática da Fundação

Hemocentro – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, liderado pelo Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior.

Este processo foi constituído por uma fase inicial de extração das *tags* a partir das seqüências dos clones das bibliotecas, seguida pela quantificação, identificação, classificação e seleção dessas *tags* e, por fim, pela realização da análise comparativa da freqüência das *tags* entre as bibliotecas.

3.8.1.1 Extração, Quantificação, Identificação e Classificação das *tags*

A extração das *tags* a partir das seqüências de DNA geradas foi realizada com a utilização do *SAGE Analysis Software (Invitrogen)* que, partindo da localização do sítio CATG de reconhecimento da enzima *NlaIII* nas seqüências dos clones, identifica as *tags* e tabula a ocorrência de cada uma delas, gerando um arquivo com a listagem de todas as *tags* e o número absoluto de *tags* para cada biblioteca.

Uma vez conhecida a seqüência de cada *tag*, todas as *tags* com mesma seqüência foram reunidas em grupos, passando a ser consideradas como *tags* únicas (*unique tags*), sendo que, cada um destes grupos pode conter desde uma até centenas de *tags*. O número de vezes que uma *tag* aparece em uma determinada biblioteca é diretamente proporcional ao nível de expressão do gene que ela representa no tecido que deu origem à biblioteca.

Uma vez identificadas e quantificadas, as *tags* foram então classificadas com base no banco de dados *UniGene* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=UniGene>) em 2 grupos: 1- *tags* correspondentes a transcritos que possuíam seqüências similares às seqüências depositadas neste banco de dados (*match*) e; 2- *tags* correspondentes a transcritos cujas seqüências não possuíam qualquer

similaridade às seqüências depositadas neste banco (*no match*). As *tags* presentes no grupo *match* foram sub-divididas em: a) *tags* representativas de transcritos com similaridade às seqüências gênicas inteiras presentes no banco *UniGene* (*full length*) e; b) *tags* que possuíam similaridade com seqüências gênicas parciais (*No full length*).

3.8.1.2 Análise das *tags*

Todas as *tags* geradas a partir das 3 bibliotecas de TW incluídas neste estudo (QS, QR e QR2) foram submetidas a um processo de análise pelo qual foram identificadas e mantidas somente as *tags* que respeitassem os seguintes critérios:

- a) corresponder a um transcrito *full length* presente no banco de dados *UniGene* (*match*);
- b) ser sempre a primeira *tag* localizada à jusante (*downstream*) do sítio da enzima de restrição *NlaIII* mais próximo da extremidade 3' do transcrito (*tag* principal);
- c) não ser a *tag* principal de outro transcrito;
- d) não estar localizada em regiões repetitivas no genoma, como regiões Alu.

As *tags* selecionadas no passo anterior tiveram então suas freqüências analisadas comparativamente através da utilização de uma ferramenta chamada *SAGEβBin* (VENCIO et al. 2004), desenvolvida pela equipe de bioinformática do Laboratório de Bioinformática do Hospital do Câncer, especificamente para análises comparativas da expressão gênica entre bibliotecas de *SAGE*. Por esta ferramenta, é

construída uma distribuição β binomial das frequências de cada *tag* para cada classe de bibliotecas (por exemplo, TW quimiorresistente), considerando a frequência desta *tag* em cada biblioteca que compõe esta classe individualmente e não sob a forma de *pool*. Isto resulta, para cada classe de bibliotecas, em uma “curva” que representa a área projetada pela distribuição das frequências de determinada *tag* entre as bibliotecas desta mesma classe. Quando comparadas duas classes distintas de bibliotecas (por exemplo, TW quimiorresistentes com TW quimiossensível), a área de sobreposição das “curvas” ou seja, das distribuições das frequências de determinada *tag*, corresponde ao valor de E (*bayes error rate*). Valores de E próximos a 1 significam uma maior concordância na distribuição das frequências de uma determinada *tag* entre as duas classes demonstrando que não há diferença significativa na frequência desta *tag* entre as classes de bibliotecas (100% de sobreposição). Conseqüentemente, quanto mais próximo de zero é o valor de E obtido, maior é a diferença na frequência da *tag* entre as bibliotecas comparadas, ou seja, maior deve ser a diferença do nível de expressão do gene representado por esta *tag* (Figura 1). Um valor arbitrário de $E < 0,2$ foi usado como limite para a seleção dos genes diferencialmente expressos.

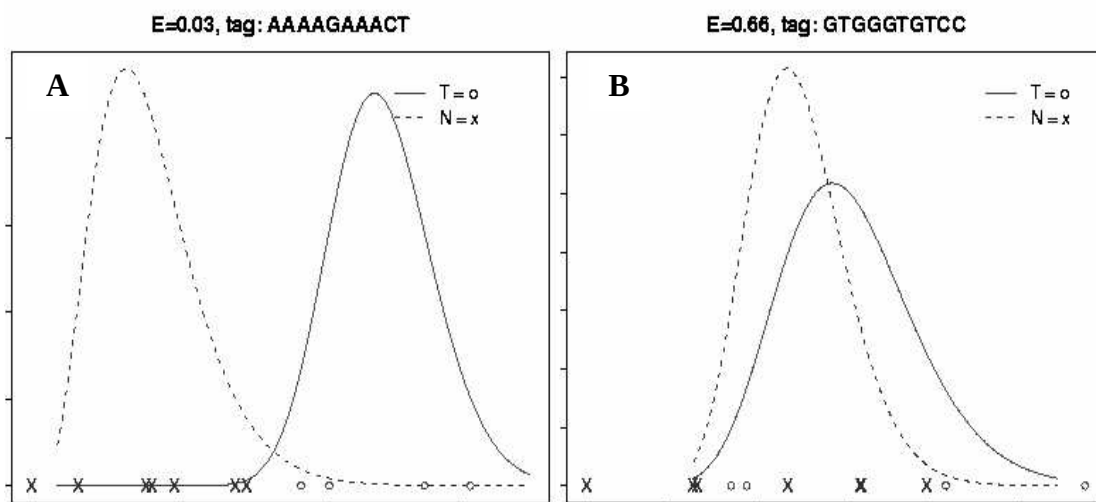


Figura 1 - Dois exemplos de gráfico demonstrando as distribuições das freqüências de *tags* entre duas classes hipotéticas de bibliotecas. As curvas representam as distribuições β binomiais das freqüências de determinada *tag* para cada uma das diferentes bibliotecas que compõem as classes hipotéticas T e N, sendo que cada “O” representa a projeção da freqüência da *tag* em questão nas bibliotecas pertencentes à classe T e cada “X” representa a projeção da freqüência da mesma *tag* nas bibliotecas pertencentes à classe N. Na figura **A**, a menor sobreposição das curvas (E mais próximo de zero) demonstra uma maior diferença da freqüência da *tag* entre as duas classe de bibliotecas (T e N) e, conseqüentemente, à uma maior diferença na expressão do gene correspondente a esta *tag* entre estas classes. Na figura **B**, a maior sobreposição das curvas (E mais próximo de 1) demonstra uma maior coincidência na distribuição das freqüências da *tag* entre as bibliotecas das duas classes, significando uma menor diferença na expressão do gene correspondente à *tag* entre as classes T e N.

Através desta ferramenta, foram realizadas duas diferentes análises comparativas entre as bibliotecas para a identificação de *tags* diferencialmente expressas: 1- QR x QS, comparação entre as bibliotecas de SAGE de TW quimiorresistente e quimiossensível construídas neste estudo e; 2- QR2 x QS, comparação entre a biblioteca de TW quimiorresistente 2 (*Wilms Collaborative Study / Brazil-Netherlands*) e a biblioteca QS. Em seguida, foram identificadas as *tags* presentes e diferencialmente expressas ($E < 0,2$) em ambas as comparações.

3.8.2 Critérios Biológicos

Os genes candidatos selecionados de acordo com os critérios de bioinformática acima descritos foram analisados, através da utilização de diferentes ferramentas disponíveis *on line* (Tabela 4), quanto aos seguintes aspectos biológicos: função biológica desempenhada pela proteína codificada por estes genes, envolvimento no processo de tumorigênese e de resistência à drogas, localização celular e disponibilidade de anticorpo comercial. Cabe destacar que nenhum destes aspectos biológicos foi, individualmente, decisivo para a seleção de um gene-candidato e que esta escolha foi realizada considerando o conjunto destes aspectos.

Tabela 4: Endereços eletrônicos dos *Web-sites* utilizados para o processo de análise dos aspectos biológicos dos genes-candidatos selecionados.

Aspectos Biológicos	Banco de dados	Endereço do web-site
Função biológica Processo de tumorigênese Resistência à drogas	<i>UniGene</i>	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene
	<i>LocusLink</i>	www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink
	<i>NCBI</i>	www.ncbi.nih.gov
	<i>CGAP</i>	www.cgap.nci.nih.gov
	<i>GeneCards</i>	Bioinfo.weizmann.ac.il/cards/index.html
	<i>OMIM</i>	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM
	<i>AceView</i>	www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly
	<i>SAGEGenie</i>	cgap.nci.nih.gov/SAGE
Localização celular	<i>PubMed</i>	www.ncbi.nlm.nih.gov
	<i>PSORT II</i>	Psort.nibb.ac.jp/form2.html
Disponibilidade de anticorpo comercial	<i>TMHMM</i>	www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM
	<i>ABCAM</i>	www.abcam.com
	<i>Santa Cruz</i>	www.scbt.com
	<i>SciQuest</i>	www.sciquest.com
	<i>Dako</i>	www.dakousa.com
	<i>QED</i>	www.qedbio.com

4 RESULTADOS

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE RNA

Os RNAs das amostras de tumor de Wilms Quimiossensível (QS) e Quimiorresistente (QR) foram extraídos através do método de extração com Isotiocianato de Guanidina seguido de centrifugação através de gradiente de Cloreto de Césio e os *pellets* de RNA obtidos foram solubilizados em 100µL de água DEPC. Este processo de solubilização foi repetido por mais 3 vezes, obtendo-se no final, 4 alíquotas de 100µL de cada amostra de RNA. Conforme pode ser observado na Tabela 5, a detecção de RNA só foi possível em três das alíquotas provenientes do tumor quimiossensível (QS) e em duas das alíquotas provenientes de tumor quimiorresistente (QR). Desta maneira foi possível obter um total de 262µg de RNA da amostra de tumor de Wilms quimiossensível e 106µg de RNA da amostra de tumor de Wilms quimiorresistente.

Tabela 5 - Concentrações dos RNAs extraídos das amostras de tumor de Wilms Quimiossensível (QS) e Quimiorresistente (QR).

Amostra	Concentração de RNA (ng/ μ L)
QS1	1.928
QS2	580
QS3	112
QS4	0
QR1	932
QR2	136
QR3	0
QR4	0

RNAs obtidos pelo método de extração com Isotiocianato de Guanidina seguido de centrifugação através de gradiente de Cloreto de Césio. Em cada uma das alíquotas o RNA foi solubilizado em 100 μ L de água DEPC.

QS: quimiossensível; QR: quimiorresistente; 1-4: alíquotas

As cinco alíquotas de RNA obtidas foram avaliadas quanto à sua integridade através de eletroforese em gel de agarose. Todas as amostras apresentaram bandas nítidas correspondentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S e um rastro correspondente ao RNA mensageiro, sendo, por este fato, consideradas de boa qualidade (Figura 2).

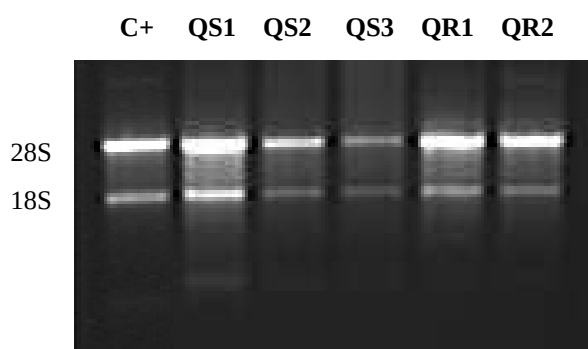


Figura 2 - Avaliação da integridade das amostras de RNA extraídas. RNAs extraídos pelo método de centrifugação através de gradiente de Cloreto de Césio. Um micrograma de cada amostra de RNA foi dissolvido em um volume final de 10 μ L de água DEPC, misturado a 10 μ L de Tampão Desnaturante, incubado a 65°C por 10 minutos e submetido a eletroforese em gel de Agarose 1% contendo 20 μ g/mL de Brometo de Etídio. A canaleta 1 (C+) corresponde ao controle positivo (RNA de boa qualidade) e as demais canaletas às amostras de RNA de TW extraídas, mostrando uma relação 28S:18S de aproximadamente 2:1. QS: quimiossensível; QR: quimiorresistente; 1-3: alíquotas.

Uma vez verificada a integridade dos RNAs, as amostras foram submetidas à amplificação por PCR de um fragmento de 254 nucleotídeos do gene *hMLH1* com a utilização de *primers* desenhados nos *íntrons* 14 e 15, para a avaliação da presença de DNA genômico. Pelo fato dos *primers* estarem desenhados nos *introns* deste gene, a presença do fragmento amplificado indica a presença de DNA genômico nas alíquotas, tornando necessário, nestes casos, o tratamento destas amostras com DNase. Como mostra a Figura 3, a banda correspondente ao fragmento de 254pb não foi detectada em nenhuma das alíquotas demonstrando ausência de contaminação com DNA genômico.

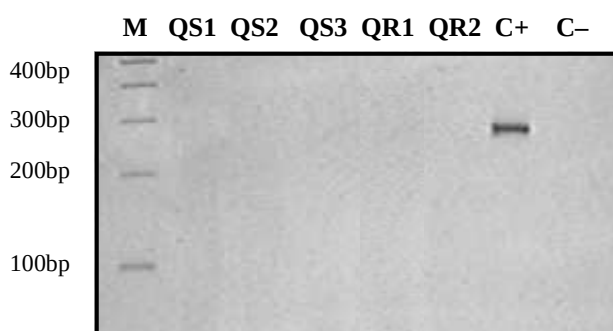


Figura 3 - Avaliação da presença de DNA genômico nas amostras de RNA através da amplificação de um fragmento do gene *hMLH1*. 100ng de cada alíquota dos RNAs extraídos foram amplificados utilizando-se *primers* intrônicos do gene *hMLH1*. Como controle positivo foram utilizadas 100ng de DNA genômico extraído de linfócitos e como controle negativo não foi adicionado DNA à reação de PCR. Os fragmentos (254pb) foram visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e coloração com prata.

M: 100bp DNA ladder (Invitrogen); QS: quimiossensível; QR: quimiorresistente; 1-3: alíquotas; C+: controle positivo; C-: controle negativo.

Uma vez confirmada a integridade do RNA e a ausência de contaminação com DNA genômico, foi realizada a síntese das moléculas de cDNA a partir das amostras QS1 e QR1. A presença de RNAs longos e a eficiência da síntese de cDNA foi avaliada através da amplificação por PCR de um fragmento de 311pb localizado na porção 5' do gene *NOTCH2*. Pelo fato deste gene possuir mais de 11Kb e da síntese da primeira fita de cDNA ocorrer a partir da cauda poli-A (utilizando-se moléculas de oligo-dT como iniciador), a amplificação de um fragmento localizado na extremidade 5' deste gene indica a presença de moléculas de RNA longas e íntegras na amostra inicial e uma boa eficiência da reação de síntese de cDNA. Conforme pode ser visto na Figura 4, a detecção do fragmento amplificado foi possível em ambas as amostras analisadas (QS1 e QR1).

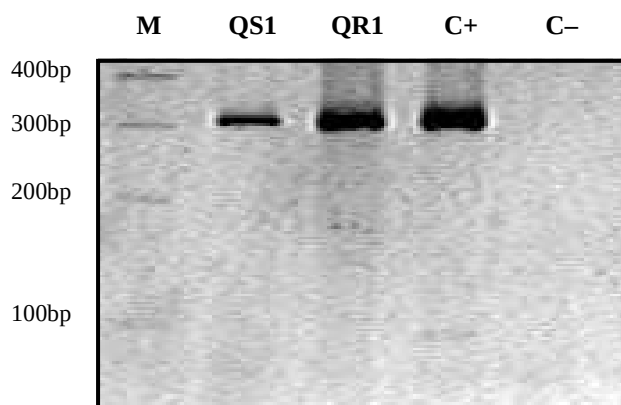


Figura 4 - Avaliação da eficiência da reação de síntese dos cDNAs através da amplificação de um fragmento do gene *NOTCH2*. Moléculas de cDNA foram sintetizadas a partir de 2µg de RNA das amostras QS1 e QR1. 5µL de cada amostra de cDNA diluído 10 vezes foram utilizados como molde em reações de PCR com *primers* localizados na extremidade 5' do gene *NOTCH2*. Foram utilizados como controle positivo 5µL de cDNA de uma amostra já testada e com amplificação positiva para *NOTCH2* e, como controle negativo, não foi adicionado cDNA à reação de PCR. Os fragmentos (311pb) foram visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e coloração com prata.

M: 100bp DNA ladder (Invitrogen); QS: quimiossensível; QR: quimiorresistente; C+: controle positivo; C-: controle negativo.

4.2 ANÁLISE DAS BIBLIOTECAS DE SAGE

Duas bibliotecas de *SAGE* foram construídas a partir de 30µg de RNA total das amostras QS1 e QR1, tendo sido sequenciados 4.416 clones da biblioteca TW quimiossensível (QS) e 5.760 clones da biblioteca TW quimiorresistente (QR).

4.2.1 Extração e Identificação das *tags*

As seqüências dos clones foram analisadas pelo *SAGE Analysis Software* (Invitrogen) revelando um total de 64.365 *tags* da biblioteca QS e 62.317 *tags* da biblioteca QR. Estas *tags* foram agrupadas de acordo com a similaridade das suas seqüências, resultando em 19.095 e 20.310 *tags* únicas, respectivamente.

Conforme pode ser observado na Tabela 6, das 19.095 *tags* únicas da biblioteca QS, 12.553 (65,8%) correspondiam a genes presentes no banco de dados *UniGene*, enquanto que 6.542 *tags* únicas (34,2%) não corresponderam a qualquer seqüência gênica já descrita (seqüências *No Match*). Para a biblioteca QR, das 20.310 *tags* únicas, 69,7% (14.159 *tags*) corresponderam a genes conhecidos (presentes no *UniGene*) e 30,3% (6.151 *tags*) representavam seqüências sem similaridade com qualquer outra seqüência gênica já descrita (*No Match*).

Tabela 6: Análise das *tags* presentes nas bibliotecas de *SAGE* construídas no estudo, em número absoluto de *tags*.

	TW Quimiossensível	TW Quimiorresistente
Nº Total de <i>tags</i>	64.365	62.317
Relação <i>tags</i> / clone	14,5	10,8
<i>tags</i> únicas	19.095	20.310
<i>tags</i> únicas <i>UniGene</i>	12.553	14.159
<i>tags</i> únicas <i>no match</i>	6.542	6.151

4.2.2 Seleção dos Genes Diferencialmente Expressos

Com o objetivo de identificar genes que poderiam estar relacionados à quimiorresistência, introduzimos em nossa análise a biblioteca de TW quimiorresistente (QR2), oriunda da colaboração com o Dr. Marcel Kool, buscando com isso identificar genes com perfil de expressão semelhante em duas bibliotecas de TW quimiorresistente provenientes de indivíduos distintos e desta maneira, aumentar a confiabilidade dos resultados.

Como o principal objetivo deste estudo foi a identificação de genes que pudessem ser relacionados à resposta quimioterápica, o restante da análise foi realizado apenas com as *tags* que representavam genes conhecidos (presentes no *UniGene*) não sendo portanto incluídas as *tags* que correspondiam a transcritos *no match*. Pela mesma razão, as *tags* provenientes de transcritos incompletos (*No full length*) e aquelas que correspondiam a mais de um transcrito também não prosseguiram na análise.

Os passos do processo de bioinformática empregados para a seleção das *tags* para posterior comparação de suas frequências entre as bibliotecas de tumor de Wilms quimiossensível e quimioresistentes estão demonstrados na Figura 5. Basicamente, o primeiro passo foi a construção, pelo Laboratório de Bioinformática do Hospital do Câncer, de um banco de seqüências *full length* de genes presentes no *UniGene*. Para a construção deste banco foram avaliados todos os transcritos *full length* depositados no *UniGene*, totalizando 28.370 transcritos e suas respectivas *tags*. Deste total, foram considerados somente os transcritos que preencheram os critérios de inclusão pré-estabelecidos, ou seja, aqueles cuja *tag* principal (seqüência de 10pb localizada à jusante (*downstream*) do sítio de reconhecimento da enzima de

restrição *Nla* III (CATG) mais próximo da extremidade 3' dos transcritos) não correspondesse à *tag* principal de mais de um transcrito, assim como a qualquer outra *tag* que estivesse próxima a um sinal de poli-adenilação. Todas as *tags* localizadas em seqüências *Alu* (regiões repetitivas do genoma) também foram descartadas. Deste modo, foram incluídos neste banco 17.254 transcritos *full length*, cada um representado por sua *tag* principal.

Em seguida, o banco de *full lengths* foi comparado às bibliotecas QS, QR e QR2. A partir desta análise comparativa foram selecionadas as *tags* de cada uma das três bibliotecas que estavam presentes no banco de *full length*, sendo descartadas todas as *tags* sem correspondência neste banco. As *tags* remanescentes em cada biblioteca foram consideradas válidas, pois representavam transcritos *full length*, não correspondiam à *tag* principal de mais de um transcrito, não representavam seqüências repetitivas do genoma e correspondiam a genes presentes no banco de dados *UniGene*.

Para a análise da freqüência das *tags*, as bibliotecas de TW quimiorresistentes foram então comparadas separadamente com a biblioteca de TW quimiossensível (QR x QS e QR2 x QS) sendo, neste momento, descartadas todas as *tags* que apresentaram freqüência zero em qualquer uma das bibliotecas, ou seja, que estavam presentes em apenas uma das bibliotecas envolvidas em cada uma das comparações realizadas.

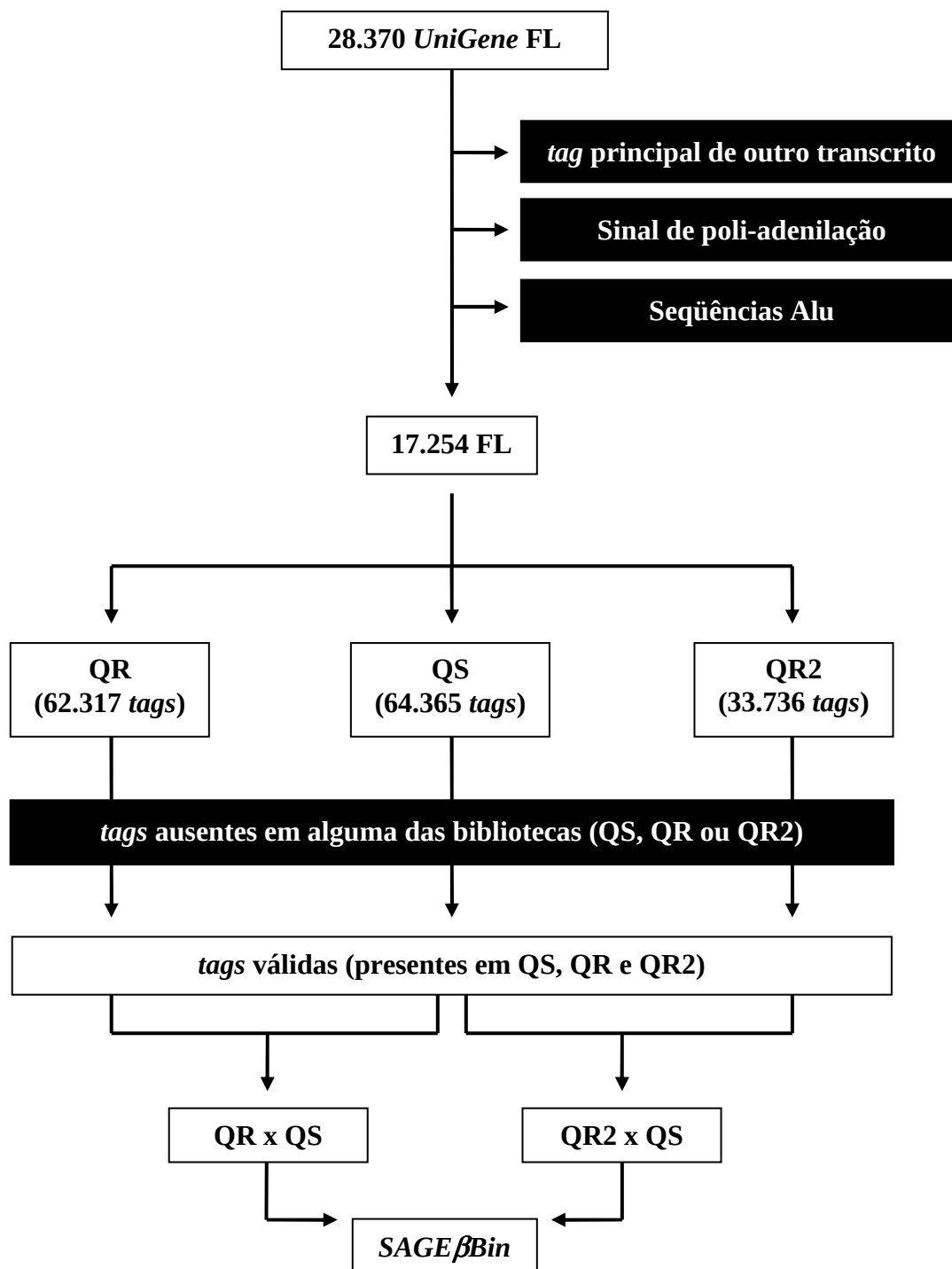


Figura 5 - Fluxograma ilustrando o processo de seleção das *tags* e posterior comparação de suas freqüências entre as bibliotecas. As caixas pretas representam as *tags* que foram eliminadas, enquanto que as caixas brancas representam as *tags* que seguiram na análise. FL: *full length*; QS: quimiossensível; QR: quimiorresistente; QR2: quimiorresistente *Collaborative Study* / *Brazil-Netherlands*.

A comparação da frequência das *tags* selecionadas entre as bibliotecas foi realizada com a utilização da ferramenta *SAGEβBin* (VENCIO et al. 2004). Ao ser considerado o valor de $E < 0,2$ como limite, foram identificadas 307 genes diferencialmente expressos entre as bibliotecas QS e QR e 212 genes diferencialmente expressos entre as bibliotecas QS e QR2.

Com o objetivo de identificar genes com perfil de expressão semelhante nas duas bibliotecas de TW quimiorresistentes, foi realizada uma intersecção entre o grupo de genes diferencialmente expressos selecionados na comparação QS x QR e o grupo selecionado na comparação QS x QR2. Desta forma, comparando os 307 genes de QS x QR com os 212 genes de QS x QR2, foi possível identificar 56 genes presentes em ambos os grupos (Figura 6), que representam genes presentes nas três bibliotecas e diferencialmente expressos entre TW quimiossensível e quimiorresistente, sendo, por este motivo, estes os genes que prosseguiram no estudo.

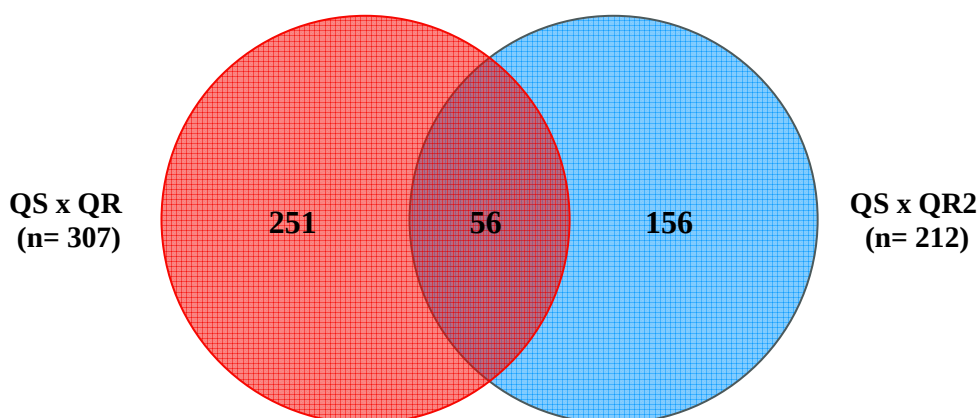


Figura 6 - Venn Diagram da intersecção das comparações QS x QR e QS x QR2 mostrando a distribuição dos genes identificados como diferencialmente expressos entre elas. O valor numérico corresponde ao número absoluto de genes.

Cabe ressaltar que o fato destes genes estarem diferencialmente expressos nas duas comparações realizadas, não significa que tenham o mesmo perfil de expressão nas duas bibliotecas de TW quimiorresistente em relação à biblioteca de TW quimiossensível, ou seja, que estejam hiper-expressos ou hipo-expressos em ambas as bibliotecas quimiorresistentes em relação à biblioteca quimiossensível. Portanto, para se identificar quais genes apresentavam o mesmo perfil de expressão gênica entre as bibliotecas, foi verificada a frequência de cada uma das *tags* deste grupo de 56 genes nas três bibliotecas estudadas. Como o número total de *tags* de cada biblioteca é diferente, primeiramente, as *tags* tiveram suas frequências normalizadas para um total de 200.000 *tags* para que pudessem ser comparadas adequadamente. Esta normalização foi realizada utilizando-se a equação

$$F_N \text{ tag} = F \text{ tag} \times 200.000 / T_{\text{tag}} \text{ Biblio}$$

onde $F_N \text{ tag}$ é a frequência normalizada de determinada *tag*; $F \text{ tag}$ é a frequência desta *tag* numa determinada biblioteca; $T_{\text{tag}} \text{ Biblio}$ é o número total de *tags* da mesma biblioteca.

Através desta análise foi possível verificar que dos 56 genes diferencialmente expressos nas bibliotecas quimiorresistentes em relação à biblioteca quimiossensível, 23 estavam hiper-expressos em ambas as bibliotecas de TW quimiorresistente (QR e QR2) e 13 estavam hipo-expressos nessas bibliotecas (Tabela 7). Esta análise mostrou ainda que 20 genes estavam hiper-expressos em uma das bibliotecas de TW quimiorresistente e hipo-expressos na outra, não caracterizando assim uma concordância no perfil de expressão entre as bibliotecas de TW quimiorresistente (Tabela 8) sendo, por este motivo, descartados das fases seguintes do estudo.

Tabela 7 - Lista dos 23 genes hiper-expressos e dos 13 genes hipo-expressos nos tumores de Wilms quimiorresistentes (QR e QR2), provenientes da intersecção entre as comparações QSxQR e QSxQR2.

Tag	Gene	Gene ID	tags/200.000			E	
			QR	QR2	QS	QSxQR	QSxQR2
Genes hiper-expressos							
GACAATGTAT	GNG2	NM_053064	96	30	6	0	0,16
AGCCTTTGTT	SERPINH1	NM_001235	144	249	44	0	0
GACCGCAGGA	COL4A1	NM_001845	199	124	65	0	0,13
GACGACACGA	RPS28	NM_001031	228	148	87	0	0,16
ATGTGAAGAG	SPARC	NM_003118	1120	1138	227	0	0
CCACACAAGC	RNF130	NM_018434	55	101	9	0,02	0
ACTGCTTGCC	MAT2A	NM_005911	61	41	12	0,02	0,16
CAAGTGTGGA	RNASE3L	NM_013235	64	83	16	0,03	0,01
AGCCGGGCTT	Hs.57079	AK023329	32	53	3	0,04	0,01
CCCGGTGTGT	LHPP	NM_022126	32	30	3	0,04	0,09
ATGTCTTTTC	IGFBP4	NM_001552	48	47	9	0,04	0,07
GACATAGGAG	COL2A1	NM_001844	48	47	9	0,04	0,07
ATAGACGCAA	MORF4L1	NM_206839	138	172	68	0,05	0,02
CCTGTAAAGC	GNA13	NM_006572	29	30	3	0,06	0,09
CAAGGGCTTG	RAP1B	NM_015646	45	59	12	0,08	0,05
ACAGTGCTTG	PPP2CB	NM_004156	87	107	37	0,08	0,04
CTCACGCCC	CRABP2	NM_001878	26	24	3	0,09	0,15
AAGATCCCCG	C6orf82	NM_015921	64	77	25	0,1	0,07
CTGAGAGCTG	GAS6	NM_000820	22	24	3	0,12	0,15
CAGTTCTCTG	MGC8721	NM_016127	109	196	59	0,12	0
CCAGGAGGAA	HSPA8	NM_006597	64	107	28	0,13	0,01
GACGTCCAGA	NFRKB	NM_006165	19	30	3	0,17	0,09
AAGGCACAGA	CDIPT	NM_006319	51	59	22	0,17	0,14
Genes hipo-expressos							
CTGCACTTAC	MCM7	NM_005916	93	59	208	0,01	0
ATAGTAGCTT	FSCN1	NM_003088	58	47	131	0,03	0,04
CAACACTGTG	PFKFB4	NM_004567	3	6	37	0,03	0,12
ACAAGTACCC	C5orf13	NM_004772	199	166	320	0,04	0,02
ACATTGAGTC	SLIT1	NM_003061	16	12	59	0,04	0,06
AGCTGGTTTC	EI24	NM_004879	32	36	81	0,07	0,17
ATGTAGTAGT	HNRPD	NM_031370	160	136	249	0,08	0,06
CCTTATATTT	TTC3	NM_003316	6	6	34	0,08	0,15
CACCCCTGAT	CKB	NM_001823	45	6	90	0,12	0
AACGCGGCCA	MIF	NM_002415	45	24	87	0,15	0,05
ATCTGAAGCA	PCSK1N	NM_013271	61	53	106	0,17	0,18
AGGACACCGC	CSK	NM_004383	13	6	37	0,17	0,12
CGTAAGACGT	BCL9	NM_004326	13	6	37	0,17	0,12

Tag: tag representativa do gene; Gene: símbolo do gene; Gene ID: código do gene no *GenBank*; QR: quimiorresistente; QR2: quimiorresistente 2 (*Collaborative Study / Brazil-Netherlands*); QS: quimiossensível; E (bayes error rate) do gene nas comparações QSxQR e QSxQR2.

Tabela 8 - Lista dos 20 genes com expressão não-concordante entre as bibliotecas de TW quimiorresistentes (QR e QR2) em relação à biblioteca QS, provenientes da intersecção entre as comparações QSxQR e QSxQR2.

Tag	Gene	Gene ID	tags/200.000			E	
			QR	QR2	QS	QSxQR	QSxQR2
AAAATAAAGA	<i>APEX1</i>	NM_001641	32	415	199	0	0
GCAAGGTTGC	<i>HDAC6</i>	NM_006044	148	12	44	0	0,17
CAATAAATGT	<i>RPL37</i>	NM_000997	263	1618	976	0	0
CCAGAACAGA	<i>RPL30</i>	NM_000989	677	1458	954	0	0
AGCACCTCCA	<i>EEF2</i>	NM_001961	1749	219	976	0	0
GACCACCTTT	<i>MFAP2</i>	NM_017459	347	130	205	0,01	0,17
GAAATGATGA	<i>PFDN5</i>	NM_002624	13	190	56	0,03	0
GGAATGTACG	<i>ATP5G3</i>	NM_001689	39	178	99	0,04	0,1
AATAGGTCCA	<i>RPS25</i>	NM_001028	132	871	221	0,05	0
GCTTTATTTG	<i>ACTB</i>	NM_001101	13	445	53	0,05	0
GCACAAGAAG		BC038733	64	320	131	0,06	0
AATATGTGGG	<i>COX6C</i>	NM_004374	16	243	56	0,06	0
GCGGTGAGGT	<i>SGTA</i>	NM_003021	141	12	75	0,07	0,02
GCATTTAAAT	<i>EEF1B2</i>	NM_021121	48	368	96	0,11	0
AATCCTGTGG	<i>RPL8</i>	NM_000973	26	160	62	0,12	0,02
CAAGACGGGG	<i>RALGDS</i>	NM_006266	112	18	62	0,13	0,11
CCCATCCGAA	<i>RPL26</i>	NM_000987	22	285	53	0,17	0
ACCATAATGT	<i>NIF3L1BP1</i>	NM_025075	3	53	19	0,19	0,15
CCTATTTACT	<i>COX4I1</i>	NM_001861	3	65	19	0,19	0,07
ACTATTAGTG	<i>CDK2AP1</i>	NM_004642	3	101	19	0,19	0,01

Tag: tag representativa do gene; Gene: símbolo do gene; Gene ID: código do gene no *GenBank*; QR: quimiorresistente; QR2: químio-resistente 2 (*Collaborative Study / Brazil-Netherlands*); QS: quimiossensível; E (bayes error rate) do gene para as comparações QSxQR e QSxQR2.

4.2.2.1 Análise Biológica dos Genes Diferencialmente Expressos

Com o intuito de identificar genes que pudessem estar associados de alguma forma com a resistência quimioterápica, sobretudo às drogas habitualmente utilizadas no tratamento dos tumores de Wilms, principalmente actinomicina D e vincristina, os 36 genes com perfil de expressão concordante entre as bibliotecas QR e QR2 em relação à biblioteca QS foram analisados quanto às suas características biológicas, sendo valorizados os genes com função relacionada ao metabolismo e à resistência a

drogas, ao processo de detoxificação celular, à morte celular e à apoptose e/ou com participação em vias metabólicas relacionadas a estas funções. Genes já relacionados à tumorigênese também foram considerados. Genes para os quais já existem anticorpos disponíveis comercialmente ou que codificam proteínas localizadas na membrana celular, o que poderia facilitar a obtenção de anticorpos, também foram valorizados por possibilitarem, através de ensaios de imuno-histoquímica, uma rápida análise em um grande número de amostras.

Esta análise baseada nos critérios biológicos permitiu a seleção de 14 genes diferencialmente expressos entre as bibliotecas de TW quimiorresistentes e quimiossensível, que podem estar envolvidos, direta ou indiretamente, à resposta quimioterápica. Destes genes, 11 estavam hiper-expressos nas bibliotecas de TW quimiorresistentes (*GNG2*, *GNA13*, *CRABP2*, *GAS6*, *RNF130*, *IGFBP4*, *SPARC*, *MAT2A*, *RAP1B*, *HSPA8* e *SERPINH1*) e 3 hipo-expressos nestas bibliotecas (*MCM7*, *FSCN1* e *EI24*) (Tabela 9).

Tabela 9 - Lista dos 14 genes selecionados, após a análise de suas características biológicas.

Gene ID	Gene	Nome	Localização	Anti-corpo
Genes Hiper-Expressos				
NM_003118	SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	5q31.3-q32	Sim
NM_018434	RNF130	Ring finger protein 130	5q35.3	Não
NM_000820	GAS6	Growth arrest-specific 6	13q34	Sim
NM_005911	MAT2A	Methionine adenosyltransferase II, alpha	2p11.2	Não
NM_006572	GNA13	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13	17q24.3	Sim
NM_053064	GNG2	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2	14q21	Sim
NM_015646	RAP1B	RAP1B, member of RAS oncogene family	12q14	Sim
NM_001552	IGFBP4	Insulin-like growth factor binding protein 4	17q12-q21.1	Sim
NM_006597	HSPA8	Heat shock 70kDa protein 8	11q24.1	Sim
NM_001235	SERPINH1	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)	11q13.5	Sim
NM_001878	CRABP2	Cellular retinoic acid binding protein 2	1q21.3	Sim
Genes Hipo-Expressos				
NM_005916	MCM7	MCM7 minichromosome maintenance deficient 7 (<i>S. cerevisiae</i>)	7q21.3-q22.1	Sim
NM_003088	FSCN1	Fascin homolog 1, actin-bundling protein (<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>)	7p22	Sim
NM_004879	EI24	Etoposide induced 2.4 mRNA	11q24	Sim

Gene ID: código do gene no *GenBank*; Gene: Símbolo do gene; Nome: nome completo do gene; Localização: localização cromossômica do gene; Ac: anticorpo disponível comercialmente; TWQS: biblioteca de tumor de Wilms quimiossensível; TWQR: biblioteca de tumores de Wilms quimiorresistentes.

4.3 GENES SELECIONADOS

4.3.1 Genes hiper-expressos nos tumores de Wilms quimiorresistentes:

- **SPARC** (*Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)*)

A proteína SPARC é uma proteína associada à matriz extracelular e está envolvida com a regulação do crescimento celular através de interações entre matriz e citocinas. Esta proteína liga-se ao íon Cálcio, a diferentes tipos de colágeno e a membranas celulares e é responsável por promover mudanças no formato das células, inibição da progressão do ciclo celular e por influenciar a síntese da matriz extracelular. Sua expressão está associada à permeabilidade endotelial, pois regula o funcionamento desta barreira promovendo alterações dependentes de F-actina no formato das células, levando à formação de *gaps* intercelulares responsáveis pelo extravazamento de macromoléculas, o que facilita a interação entre vias metabólicas e seus efetores. Em condições de *stress*, a expressão de SPARC estimula a ativação de Akt, que é uma quinase com função inibitória sobre proteínas pró-apoptóticas, com conseqüente diminuição da atividade das caspases pró-apoptóticas 3 e 7, promovendo assim um aumento da sobrevivência de células (SHI et al. 2004).

- **RNF130** (*Ring finger protein 130*)

Este gene codifica uma proteína que contém um motivo *RING finger* aparentemente envolvido no desenvolvimento embrionário. Apesar da pouca informação a respeito da função deste gene, há indícios de que a proteína RNF130 esteja aparentemente relacionada à regulação de um fator de crescimento indutor de escape da apoptose em células precursoras mielóides (BAKER e REDDY 2000).

A proteína RNF130 está localizada preferencialmente no retículo endoplasmático e na membrana plasmática e contém dois domínios transmembrana.

- **GAS6** (*Growth arrest-specific 6*)

Este gene codifica uma proteína de ligação que atua como ligante de diversos receptores como, por exemplo, receptores tirosino-quinase, cuja sinalização está envolvida positivamente com a adesão, migração, crescimento, proliferação e sobrevivência celular. Através da ligação com receptores tirosino-quinase, a proteína GAS6 exerce um efeito anti-apoptótico em diversos tipos celulares por promover tanto um estímulo da via anti-apoptótica mediada por *Bcl-2*, quanto uma redução da ativação da caspase 3, uma das principais caspases pró-apoptóticas (HASANBASIC et al. 2004; VALVERDE et al. 2004). Sua expressão já foi relacionada à tumorigênese do câncer de tireóide em crianças (ITO et al. 2002).

- **MAT2A** (*Methionine adenosyltransferase II, alpha*)

Este gene codifica uma enzima, a metionina adenosiltransferase, que cataliza a biossíntese da S-adenosilmetionina (AdoMet) a partir de metionina e ATP com a conseqüente liberação de radicais metil, sendo a principal doadora de radicais metil para as diversas reações de transmetilação. A região promotora de *MAT2A* é altamente rica em dinucleotídeos GC e em sítios de ligação para diferentes fatores de transcrição como GATA, STAT e v-myb, dentre outros, e sua expressão é regulada, principalmente, pela metilação de seu promotor e pelo processo de acetilação de histonas. A proteína MAT2A está envolvida no processo de proliferação celular e sua hiper-expressão tem sido descrita em algumas neoplasias humanas como o

ependimoma e, sobretudo, em neoplasias hepáticas como é o caso do carcinoma hepatocelular, onde está correlacionada a hipometilação de seu promotor, normalmente hipermetilado no fígado normal onde a expressão da proteína é mínima.

- **GNA13** (*Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13*)

- **GNG2** (*Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2*)

As proteínas GNA13 e GNG2 pertencem à família das proteínas G, proteínas associadas à membrana celular, que regulam o fluxo de informações entre os receptores de superfície e os efetores metabólicos intracelulares, atuando como moduladoras ou transdutoras de diversos sistemas de sinalização transmembrana como alterações do citoesqueleto, crescimento celular, oncogênese e apoptose (KUROSE 2003).

A proteína GNA13 atua como reguladora da função adesiva das caderinas e do processo de morte celular, sendo que a supressão de sua expressão promove, tanto a perda da função das caderinas e consequente menor adesividade celular, característica do processo metastático, quanto a indução da apoptose. Esta proteína parece ainda ser essencial como estimuladora da diferenciação celular mediada pelo Ácido Retinóico (JHO e MALBON 1997; MEIGS et al. 2001 e 2002).

A especificidade da interação entre uma proteína G e seu receptor é determinada primeiramente pela unidade gama, como, por exemplo, GNG2. Esta proteína, assim como as demais proteínas G das cadeias gama e beta, são necessárias na atividade GTPase, responsável pela hidrólise de GTP para GDP. Esta reação, por sua vez, é responsável pela disponibilidade de tubulina livre uma vez que a tubulina,

principal constituinte dos microtúbulos, encontra-se habitualmente ligada à molécula de GTP e indisponível nesta condição. (ROWINSKY e DONEHOWER 1996).

- ***RAP1B*** (*RAP1B, member of RAS oncogene family*)

Este gene pretence à sub-família de GTPases da família de oncogenes *Ras* e codifica uma proteína de ligação pertencente à família de proteínas *RAS-like small GTP-binding proteins*. Assim como as proteínas G, como por exemplo, GNG2 descrita acima, a proteína RAP1B tem função GTPase e está envolvida nos processos de sinalização e adesão celular, transporte intracelular de outras proteínas, além de interagir com o citoesqueleto actínico. Quando inativa, RAP1B localiza-se preferencialmente na membrana celular, porém, quando ativada por fosforilação via *cAMP-dependent protein kinase*, transloca-se para o citosol onde liga-se rapidamente à GTP, intensificando a quebra de GTP para GDP e assim aumentando a disponibilidade de tubulina livre, que é essencial para a polimerização dos microtúbulos.

- ***IGFBP4*** (*Insulin-like growth factor binding protein 4*)

A proteína codificada por este gene, a IGFBP4, é uma proteína de ligação ao fator de crescimento IGF (*Insulin-like growth factor*) assim como as demais proteínas da família das IGFBPs (IGFBP1 a 7) e sua principal ação parece estar relacionada à atenuação ou inibição da atividade de IGF, contribuindo assim com o controle do crescimento celular, do metabolismo e de outros efeitos biológicos mediados por IGF, sobretudo nos processos de proliferação e diferenciação celular no tecido renal (VOCI et al. 2001; CHESIK et al. 2004).

Apesar de existirem poucos relatos da associação do gene *IGFBP4* e os TW, este gene já foi apontado como um sendo um alvo transcricional do gene *WT1* (WAGNER et al. 2001), o que pode estar relacionado ao seu envolvimento no processo de diferenciação celular no tecido renal. As IGFBPs parecem ter uma participação na diferenciação celular mediada pelo Ácido Retinóico (AR), o que pode ser observado pelo envolvimento de *IGFBP4* no processo de diferenciação das células de neuroblastoma induzida pelo AR, onde sua expressão é hipo-regulada pela ação do AR (BERNARDINI et al. 1994).

Uma das proteínas inibidas por *IGFBP4* é a proteína *IGF2* (ZHOU et al. 2003), produto da transcrição do gene *IGF2*, intimamente relacionado aos TW por estar localizado no *locus* WT2 e envolvido em sua tumorigênese (DOME e COPPES 2002). Além de seu envolvimento no desenvolvimento dos TW, já foi observado que a proteína *IGF2* induz a apoptose e a necrose de células de TW e que esta apoptose pode ser inibida na presença das IGFBPs (GRANERUS et al. 2001).

O gene *IGFBP4* parece ainda possuir alguma relação com os microtúbulos. Em um estudo desenvolvido por CHESIK et al. (2004), examinando a expressão de *IGFBP4* em astrócitos humanos e de rato, os autores observaram uma associação desta proteína com centríolos e, principalmente com microtúbulos, onde pode ser observada uma interação direta entre a expressão da proteína *IGFBP4* e a presença de microtúbulos íntegros, sugerindo que ela possa estar envolvida em funções relacionadas a estas estruturas.

- **HSPA8** (*Heat shock 70kDa protein 8*)

A proteína codificada por este gene pertence à família *heat shock protein 70* e atua ligando-se a peptídeos recém formados para facilitar seu dobramento correto. As *heat shock proteins* (*Hsps*) estão envolvidas com o reparo de erros no pareamento de bases no DNA (*mismatch repair*), sendo que sua expressão está diretamente relacionada a uma maior capacidade de reparo de danos ao DNA como os causados por drogas quimioterápicas cuja citotoxicidade seja caracterizada por lesões diretas à molécula de DNA, como é o caso da actinomicina D, utilizada no tratamento do TW.

- **SERPINH1** (*serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)*)

A proteína codificada por este gene é uma glico-proteína induzida por *stress* que pertence à família *serpin* de inibidores de proteases. Esta proteína localiza-se no retículo endoplasmático e liga-se especificamente ao colágeno, funcionando como chaperona molecular colágeno-específica na via da biossíntese do colágeno. Chaperonas são proteínas do tipo *heat shock proteins* (*Hsps*) que, como mencionado acima, ligam-se aos peptídeos recém formados para facilitar seu dobramento correto, além de estarem envolvidas com o reparo de erros no pareamento de bases no DNA.

A significativa homologia da sequência do promotor de *SERPINH1* com seu equivalente murino, que contém várias sequências regulatórias como elementos responsivos ao Ácido Retinóico, sugere que este gene possa estar envolvido com o processo de diferenciação celular induzido pelo Ácido Retinóico (IKEGAWA e NAKAMURA 1997).

A expressão de *SERPINH1* é regulada pela metilação de seu promotor, o que foi observado por YANG et al. (2004) através da demonstração de que o silenciamento de *SERPINH1* presente em células de neuroblastoma humano pode ser revertido através do tratamento com agentes desmetilantes.

- ***CRABP2*** (*Cellular retinoic acid binding protein 2*)

O gene *CRABP2* codifica uma proteína com função regulatória sobre a ação do Ácido Retinóico, que é um modulador da proliferação celular e um potente indutor da diferenciação celular e da apoptose. *CRABP2* é uma proteína com localização predominantemente citossólica que, quando ligada ao Ácido Retinóico, migra para o núcleo das células, facilitando o acesso deste composto aos receptores nucleares de Ácido Retinóico (RAR), potencializando assim sua atividade transcricional. A hiperexpressão de *CRABP2* aumenta drasticamente a sensibilidade das células aos efeitos inibitórios da proliferação celular induzida pelo Ácido Retinóico (MANOR et al. 2003; BUDHU e NOY 2002).

4.3.2 Genes hipo-expressos nos tumores de Wilms quimiorresistentes:

- ***MCM7*** (*MCM7 minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae)*)

A proteína codificada por este gene pertence à família mini-cromossomo (MCM) de proteínas de manutenção, fundamentais para a replicação do DNA e para a proliferação celular. Estas proteínas ligam-se ao sítio de replicação do DNA e atuam “liberando” a iniciação de um único processo de replicação do DNA por ciclo celular. Desta maneira, estas proteínas estão envolvidas no processo de reparo do DNA durante o ciclo de divisão celular por permitir que os danos introduzidos na molécula

de DNA durante a fase S replicativa devido à ação de agentes genotóxicos e ao *stress* replicativo, sejam corretamente identificados e reparados pelo sistema de reparo ou, caso isso não seja possível, que a célula danificada seja direcionada à cascata da apoptose. A perda de função de qualquer proteína MCM resulta em uma incapacidade da célula em iniciar o processo de replicação do DNA (fase S do ciclo celular) (CORTEZ et al. 2004) e, conseqüentemente, em um comprometimento do funcionamento adequado do sistema de reparo do DNA.

- ***FSCN1*** (*Fascin homolog 1, actin-bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)*)

Este gene codifica uma pequena proteína chamada *fascin* que é uma proteína de ligação de filamentos de actina cuja função é organizar estes filamentos, unindo-os paralelamente formando feixes de actina, estando intimamente relacionada à dinâmica do citoesqueleto celular. Ela é encontrada em microespículas, em rugosidades da membrana celular e em fibras de *stress* e promove modificações no formato das células por induzir a formação de protrusões da membrana celular. Sua ação pode ser observada em células epiteliais normais e transformadas, estando envolvidas com o processo de motilidade destas células.

- ***EI24*** (*Etoposide induced 2.4 mRNA*)

O gene *EI24* é um gene indutor de apoptose através da ativação de *TP53*, controlando negativamente o crescimento celular. Este gene é um homólogo do gene murino *ei24* cuja expressão, induzida pelo quimioterápico etoposide, suprime o crescimento celular e induz a morte celular através da ativação de *TP53*. Da mesma

maneira, *EI24*, quando induzido por danos no DNA e/ou sinais de hiper-proliferação celular, codifica uma proteína que ativa p53 que por sua vez leva à parada do ciclo celular em G1 e desencadeia a cascata da apoptose (GU et al. 2000).

Para todas as proteínas codificadas pelos genes selecionados, exceto para a proteína RNF130, já existem anticorpos disponíveis comercialmente (Tabela 9), o que torna possível uma pronta análise da expressão protéica destes genes em um grande número de amostras através de ensaios de imuno-histoquímica.

5 DISCUSSÃO

Atualmente, frente aos altos índices de cura já atingidos com os esquemas terapêuticos habituais, o tratamento do TW tem tido como principal enfoque o desenvolvimento de terapias mais individualizadas, seja através de uma melhor adequação do tratamento aos grupos de risco já existentes, o que tem sido feito através de diferentes ensaios clínicos, ou pela identificação de novos fatores de risco baseados em características próprias de cada caso individualmente.

O principal objetivo deste estudo foi identificar, através da análise de expressão gênica, padrões que pudessem permitir a identificação dos tumores de Wilms de predomínio blastematoso potencialmente maus respondedores ao tratamento dentre aqueles considerados de bom prognóstico. Estes padrões de expressão gênica diferencial podem ser relevantes, não só por possibilitar uma melhor definição dos grupos de risco, como também para um melhor conhecimento de sua biologia, possibilitando o desenvolvimento de novas terapias, mais adequadas ao prognóstico individual. Desta forma, os pacientes de baixo risco poderiam se beneficiar de uma terapêutica mais branda, com uma menor morbidade, enquanto que aqueles pacientes de alto risco poderiam ser submetidos a esquemas terapêuticos mais agressivos com o objetivo de diminuir os riscos de recidiva da doença.

A análise de expressão gênica tem se mostrado uma ferramenta extremamente útil na caracterização de diferenças no comportamento tumoral uma vez que fornece informações diretas sobre o perfil de expressão dos genes de determinado tecido tumoral em um determinado momento. Considerando os métodos de análise de

expressão gênica disponíveis, a técnica de *SAGE* permite, em teoria, o acesso a todos os transcritos que estão sendo expressos em um tecido, não restringindo a análise a um grupo pré-determinado de transcritos como ocorre nas análises por *microarray*. Isto torna possível não só a identificação de genes já conhecidos como também de transcritos ainda não identificados que possam, da mesma maneira, ser relevantes para um melhor conhecimento da biologia dos tecidos analisados.

Estudos de expressão gênica em tumores de Wilms são escassos, sobretudo aqueles referentes à resposta quimioterápica, sendo que não há, até o momento, nenhum estudo publicado avaliando a resistência quimioterápica dos TW de componente blastematoso ou que envolvam a análise de dados de *SAGE* em tumores de Wilms. Existem na literatura três estudos de expressão gênica em TW não anaplásicos buscando a identificação de genes diferencialmente expressos que possam ser relacionados à evolução clínica destes tumores, porém com a utilização de *microarray* de DNA como técnica de escolha. No primeiro deles, TAKAHASHI et al. (2002) caracterizaram o perfil de expressão gênica dos TW de histologia favorável, correlacionando-o às características clínicas destes tumores. Neste estudo, os autores puderam identificar 267 genes significativamente mais expressos nos tumores em relação ao tecido renal não-tumoral, sendo que 30 deles se mostraram diferencialmente expressos entre TW de estádios iniciais (E I e II) e avançados (E III e IV) e 80 entre TW de melhor e pior evolução clínica. O gene *Topoisomerase IIα* (*TOP2A*), codificador de uma enzima responsável pelo desenovelamento da molécula de DNA, se mostrou hiper-expresso em todas as amostras de TW e com a maior diferença de expressão entre TW e tecido renal não tumoral. Dentre os 30 genes diferencialmente expressos entre TW de estádios iniciais e avançados foi identificado

o gene *Stathmin 1* (*STMN1*), envolvido na despolimerização dos microtúbulos, como hiper-expresso nos tumores de estádios avançados. A expressão aumentada destes dois genes (*TOP2A* e *STMN1*) foi apontada pelos autores como possivelmente relacionada à quimiossensibilidade dos TW, uma vez que no tratamento destes tumores são utilizados agentes quimioterápicos com ação inibitória sobre a topoisomerase II e agentes anti-microtúbulos. Dentre os genes diferencialmente expressos entre TW de melhor e pior evolução clínica foi identificado o gene *CRABP2*, mais expresso nos tumores de pior evolução clínica. Por ser um mediador da via de sinalização do Ácido Retinóico, a hiper-expressão deste gene em TW de pior evolução clínica pode, segundo os autores, sugerir que estes tumores possam se beneficiar com o uso do Ácido Retinóico em seu tratamento. No segundo estudo, WILLIAMS et al. (2004) identificaram genes relacionados à recidiva de TW. Através da análise do perfil de mais de 30.000 genes por *microarray* de cDNA em 27 amostras de TW pré-tratamento que possuíam informações quanto à recidiva tumoral futura, os autores identificaram 138 genes diferencialmente expressos entre os tumores que apresentaram e os que não apresentaram recidiva dos quais 3 genes (*PAPSS2*, *TIMM22* e *B7H3*) conseguiram, juntos, separar estes dois grupos de tumores. Estes autores analisaram ainda a expressão gênica diferencial entre as amostras de TW que apresentavam e que não apresentavam ganho de 1q e puderam observar uma associação entre genes localizados em 1q e tumores que apresentaram recidiva o que foi relacionada, porém, ao maior número existente de tumores com ganho de 1q entre as amostras recidivadas. No terceiro estudo, LI et al. (2005) identificaram indicadores precoces e específicos de prognóstico para os TW. Estes autores analisaram, também através de *microarray* de cDNA, o perfil de expressão de

4.900 genes relacionados ao câncer em 26 TW primários que possuíam informações quanto à recidiva tumoral futura e puderam identificar um grupo de quatro genes (*C/EBPB*, *cDNA CF542255*, *p21* e *H4FG*) que, juntos, são capazes de prever recidivas futuras em TW primários ao diagnóstico com uma acurácia de 92%, independente da presença de anaplasia. Além disto, a expressão do gene *C/EBPB* (*CCAAT/enhancer binding protein beta*), mostrou ser um possível fator independente de pior prognóstico para os TW.

Para a construção das bibliotecas de *SAGE* deste estudo foram selecionadas duas amostras de TW de componente blastematoso que pudessem representar exemplos clínicos de tumores sensíveis e resistentes à quimioterapia. A existência de diferentes protocolos de tratamento para os TW fez com que estas amostras tenham sido selecionadas entre amostras vindas de pacientes que foram submetidos à QT pré-operatória e de pacientes que foram submetidos diretamente à cirurgia. Esta falta de uniformidade nas amostras fez com que os critérios para a caracterização de um tumor como sendo sensível ou resistente à quimioterapia tenham sido analisados e definidos para cada caso individualmente com base em suas características clínicas e biológicas e em sua evolução. Tumores não submetidos à QT pré-operatória não sofrem interferência da quimioterapia na expressão de seus genes, podendo assim retratar as características naturais de um tumor ao diagnóstico. No entanto, esta situação faz com que a caracterização de sensibilidade ou resistência destes tumores só possa ser definida com base na evolução clínica do paciente, o que torna necessário, sobretudo para a caracterização da quimiossensibilidade, um seguimento clínico suficientemente longo pela possibilidade de recaídas tumorais tardias, ainda que raras nos TW. Além disto, existem fatores que podem contribuir para uma falsa

caracterização de sensibilidade quimioterápica, como por exemplo, os casos de ressecções cirúrgicas completas de tumores potencialmente resistentes à quimioterapia, porém limitados ao rim, com ausência de doença residual após a cirurgia; a influência de outras terapias adjuvantes como a radioterapia nos casos de doença residual localizada e não disseminada e; a participação do sistema imune do paciente sobre a doença residual após a ressecção cirúrgica do tumor. Por outro lado, tumores que foram submetidos à QT pré-operatória podem fornecer informações diretas de sua resposta aos agentes quimioterápicos recebidos através de evidências clínicas e histológicas. Isso por um lado é vantajoso uma vez que possibilita o acesso a tecidos tumorais sabidamente quimiorresistentes caracterizados pela presença de tumor viável no momento cirúrgico, porém, por outro lado, impossibilita o acesso a tecidos tumorais quimiossensíveis uma vez que, neste momento, estes se apresentarão sob a forma de tecido necrótico.

Para a seleção das amostras utilizadas para a construção das nossas bibliotecas de *SAGE* dentre as disponíveis no banco de tumores pudemos, após a caracterização da resposta quimioterápica de cada uma delas, selecionar uma amostra representativa de quimiossensibilidade proveniente de um tumor não exposto à QT pré-operatória e uma amostra representativa de quimiorresistência proveniente de um tumor submetido à QT pré-operatória. A amostra caracterizada como quimiossensível foi assim considerada pelo fato de tratar-se de um tumor que se encontrava em estágio clínico avançado ao diagnóstico, com presença de doença extra-renal residual após cirurgia, com disseminação abdominal e que, no entanto, cursou com boa resposta ao tratamento quimioterápico adjuvante instituído, estando sem sinais de doença em atividade por um período de seguimento superior a 5 anos, o que é

considerado bastante satisfatório, visto que mais de 90% das recaídas de TW ocorrem geralmente dentro dos primeiros 3 anos do diagnóstico inicial (WILLIAMS et al. 2004). Por tratar-se de um tumor não limitado ao rim, com doença residual pós-operatória, o fato do paciente do qual este tumor foi obtido estar sem sinais de doença até o momento é um indício bastante sugestivo de sensibilidade quimioterápica. O tecido tumoral utilizado para a construção da biblioteca de TW quimiorresistente, por sua vez, foi submetido à QT pré-operatória e foi considerado como quimiorresistente uma vez que o tumor foi primeiramente exposto às drogas quimioterápicas habitualmente utilizadas para o tratamento do TW e, quando avaliado no momento cirúrgico, apresentava-se extensamente viável, sem sinais de necrose, indicando tratar-se de um tumor refratário à quimioterapia. O fato deste tumor estar limitado ao rim no momento da cirurgia e de ter sido totalmente ressecado pode justificar o motivo pelo qual o paciente não apresentou recidiva tumoral até o presente momento.

A QT pré-operatória pode ainda, como já mencionado anteriormente, promover uma alteração na expressão de alguns genes, o que pode fazer com que o perfil de expressão gênica destes tumores não corresponda exatamente ao perfil existente no momento do diagnóstico. Isto pode ser visto como um viés em nossas análises, entretanto, mesmo que alguns dos genes selecionados possam ter tido sua expressão alterada em resposta à quimioterapia, este fato não invalida o estudo, pois o perfil de expressão destes genes poderá ser facilmente verificado posteriormente através de uma etapa de validação da expressão diferencial dos genes selecionados, em um maior número de amostras não expostas à quimioterapia e que possam ser classificadas como sensíveis e resistentes à quimioterapia com base em seus respectivos seguimentos clínicos.

De acordo com nossa meta inicial, foram geradas mais de 60.000 *tags* de cada uma das bibliotecas de *SAGE* construídas, o que julgamos, baseados em dados da literatura, corresponder a um número suficiente de *tags* para se ter acesso à grande maioria dos transcritos expressos nos tecidos tumorais utilizados. Segundo um estudo desenvolvido por CHABARDÈS-GARONNE et al. (2003), a geração de 50.000 *tags* de uma dada biblioteca de *SAGE* garante a detecção de transcritos que representem 0,006% da massa inicial de RNA total, com um nível de confiança de 95%. Em um outro estudo, VELCULESCU et al. (1997) demonstraram que uma biblioteca de *SAGE* de levedura contendo 60.000 *tags* oferece 97% de probabilidade de se detectar um transcrito de cópia-única.

Para a etapa de seleção dos genes diferencialmente expressos entre as bibliotecas, pudemos ter acesso, através da colaboração com o Dr. Marcel Kool (*Wilms Collaborative Study / Brazil-Netherlands*), a uma terceira biblioteca de *SAGE* de TW com características de quimiorresistência muito semelhantes às da nossa biblioteca de TW quimiorresistente. A inclusão desta terceira biblioteca em nossas análises teve como finalidade aumentar a confiabilidade dos genes diferencialmente expressos selecionados, uma vez que genes com perfil de expressão semelhante em bibliotecas de TW quimiorresistente provenientes de indivíduos distintos devem ter uma maior probabilidade de estarem realmente relacionados à resposta quimioterápica propriamente dita e não às características individuais de cada paciente.

Uma etapa de extrema importância neste estudo foi o processo de análise de bioinformática. A análise da expressão diferencial das *tags* pela ferramenta (*SAGEβBin*) desenvolvida pelo grupo da Dra. Helena Brentani permitiu a

identificação de genes diferencialmente expressos entre as bibliotecas a partir da frequência de cada *tag* em cada biblioteca individualmente, o que torna os resultados mais confiáveis uma vez que as frequências das *tags* provenientes da biblioteca de TW quimiossensível foram comparadas com as frequências das *tags* provenientes de cada uma das bibliotecas de TW quimiorresistente individualmente e não com a média das frequências entre elas, como comumente acontece neste tipo de estudo. Este tipo de abordagem é mais vantajoso, principalmente quando se pretende fazer análises comparativas da expressão gênica que envolvam grupos de bibliotecas, ou seja, mais de uma biblioteca para uma mesma categoria, como acontece para os TW quimiorresistentes, caracterizados pelas bibliotecas QR e QR2. Em estudos como o nosso, quando se busca a identificação de genes relacionados ao comportamento tumoral partindo de um pequeno número de amostras, poder identificar um gene que tenha um nível de expressão igual ou muito semelhante nas bibliotecas de uma mesma categoria tem uma importância muito maior do que a identificação de um gene cuja expressão seja muito alta em uma das bibliotecas e baixa na outra, onde a expressão média entre elas não corresponde à realidade de nenhuma das duas bibliotecas, o que compromete a confiabilidade dos resultados. Análises como a utilizada neste estudo podem resultar em um menor número de genes selecionados por retratarem somente os genes que tenham uma expressão correspondente entre bibliotecas diferentes, porém, a chance de que o perfil de expressão destes genes corresponda à realidade é maior.

A análise das características biológicas dos 36 genes diferencialmente expressos entre as bibliotecas e com perfil de expressão concordante entre as bibliotecas QR e QR2 permitiu a seleção de 11 genes hiper-expressos 3 genes hip-

expressos nos TW quimiorresistentes. Estes genes selecionados estão envolvidos com diferentes processos biológicos como a formação dos microtúbulos e/ou citoesqueleto celular, a regulação da expressão gênica, o reparo do DNA, o controle do ciclo celular, a diferenciação e proliferação celular, a transdução de sinal e a apoptose.

Genes que possuem algum envolvimento com o citoesqueleto celular, principalmente se relacionados à formação do fuso mitótico, têm uma importância clara neste estudo pela possibilidade de estarem relacionados à resistência ou sensibilidade à vincristina, cujo princípio básico de ação é caracterizado pela ligação à tubulina, impedindo sua polimerização em microtúbulos, principal constituinte do citoesqueleto (ROWINSKY e DONEHOWER 1996; RIGGS Jr. 2002). Dentre os genes selecionados neste estudo, quatro deles estão relacionados ao citoesqueleto (*GNG2*, *IGFBP4*, *RAP1B* e *FSCN1*), sendo que os três primeiros estão hiper-expressos nos TW quimiorresistentes enquanto que *FSCN1* encontra-se hipo-expresso nestes tumores. Os genes *GNG2* e *RAP1B* codificam proteínas que possuem atividade GTPase, responsável pela hidrólise de GTP para GDP e sua hiper-expressão está relacionada a uma maior disponibilidade de tubulina livre, o que é essencial para a formação dos microtúbulos. Apesar de não haver uma correlação bem estabelecida entre a função da proteína IGFBP4 e o sistema microtubular, a interação desta proteína com microtúbulos íntegros, conforme observado por CHESIK et al. (2004), sugere que ela possa estar envolvida com a manutenção destas estruturas. Portanto, a hiper-expressão destes três genes nos TW quimiorresistentes pode indicar uma maior integridade estrutural e/ou capacidade regenerativa dos microtúbulos nestes tumores, podendo corresponder a um possível mecanismo de resistência ao tratamento com vincristina nos TW. Quanto ao gene *FSCN1*, apesar de não haver uma relação clara

entre sua hipó-expressão nos TW quimiorresistentes e a resposta quimioterápica, este gene foi selecionado por estar intimamente relacionado à dinâmica do citoesqueleto celular.

A detecção de genes relacionados ao processo de apoptose é de grande interesse neste estudo, uma vez que este processo constitui o principal mecanismo de morte celular secundária à quimioterapia. Seis dos 14 genes selecionados (*RNF130*, *GNA13*, *IGFBP4*, *GAS6*, *SPARC* e *EI24*) têm um envolvimento direto com a apoptose. É interessante observar que os genes deste grupo que estão hiper-expressos nos tumores quimiorresistentes (*RNF130*, *GNA13*, *IGFBP4*, *GAS6* e *SPARC*) têm uma ação antiapoptótica (JHO e MALBON 1997; BAKER e REDDY 2000; GRANERUS et al. 2001; HASANBASIC et al. 2004; SHI et al. 2004), enquanto que o gene *EI24*, hipó-expresso nestes tumores, é um indutor da apoptose (GU et al. 2000). Este perfil de expressão sugere haver, nos TW quimiorresistentes, um aumento da atividade antiapoptótica, bem como uma menor capacidade de indução do processo de morte celular programada, o que pode estar diretamente relacionado à maior capacidade que estes tumores têm de resistir ao processo de morte celular induzida pelo tratamento quimioterápico.

O processo de diferenciação celular também é um importante fator de predição da resposta quimioterápica. Em geral, células mais indiferenciadas, cujo padrão histológico tende ao fenótipo embrionário, têm um alto poder proliferativo e são mais sensíveis às drogas quimioterápicas, enquanto que células mais maduras e diferenciadas, com um fenótipo tendendo ao epitelial, apresentam um poder proliferativo menor e uma maior resistência à quimioterapia. Dentre os genes selecionados neste estudo, quatro genes hiper-expressos nos tumores

quimiorresistentes (*GNA13*, *IGFBP4*, *SERPINH1* e *CRABP2*) parecem estar envolvidos com o processo de diferenciação celular. Este achado sugere que as células neoplásicas destes tumores devem, de alguma forma, possuir uma maior tendência à diferenciação, o que pode contribuir para torná-las menos responsivas à quimioterapia. No entanto, o mais interessante de se notar é que estes quatro genes são responsivos à ação do Ácido Retinóico, que é um potente indutor da apoptose, exercendo um importante efeito inibitório sobre a proliferação e o crescimento celular. O Ácido Retinóico tem sido utilizado, sob a forma de Ácido Trans-Retinóico (ATRA), no tratamento de diferentes neoplasias e é bastante utilizado na população pediátrica, principalmente no tratamento de leucemias e neuroblastomas (MEISTER et al. 1998; LEHMANN et al. 2002). A hiper-expressão destes genes nos TW quimiorresistentes pode conferir a estes tumores uma maior sensibilidade ao Ácido Retinóico, como pode ser visto em relação ao gene *CRABP2* que, por codificar uma proteína com função regulatória sobre a ação do Ácido Retinóico, aumenta consideravelmente a sensibilidade de células tumorais aos efeitos inibitórios da proliferação celular induzida pelo Ácido Retinóico quando hiper-expresso (BUDHU e NOY 2002; MANOR et al. 2003). Se considerarmos os efeitos do Ácido Retinóico em outras neoplasias, sua atuação como indutor da apoptose e a hiper-expressão de genes envolvidos na via do Ácido Retinóico nos TW de componente blastematoso quimiorresistentes, não seria difícil sugerir que o uso de análogos deste composto poderia ser uma alternativa terapêutica interessante nos casos de TW quimiorresistentes, uma vez que envolve uma droga de fácil acesso, cuja utilização já está bem estabelecida na população pediátrica. Apesar de não ser utilizado no tratamento dos TW, já foi observado por VINCENT et al. (1996) que o Ácido

Retinóico suprime o crescimento celular de células blastematosas de TW e que esta supressão do crescimento é acompanhada por uma hiper-expressão de IGF2 juntamente à uma hipo-expressão de IGFBPs. Esta observação favorece ainda mais a possibilidade do uso deste composto nos TW quimiorresistentes, uma vez que o gene *IGFBP4* está igualmente hiper-expresso nestes tumores.

Uma interessante observação pode ser feita em relação à hiper-expressão do gene *CRABP2* nos TW quimiorresistentes e sua localização cromossômica. Considerando que este gene está localizado em 1q (1q21.3) e que sua hiper-expressão em TW de pior prognóstico já foi também observada por outros autores, como por TAKAHASHI et al. (2002), é possível imaginar que a associação já estabelecida do ganho de material cromossômico de 1q e o maior risco de recidiva tumoral nos TW (BOWN et al. 2002; WILLIAMS et al. 2004) possa estar relacionada à uma amplificação de *CRABP2* nos TW de pior evolução clínica, o que confirmaria que a hiper-expressão deste gene pode estar realmente vinculada aos TWQR.

A participação no processo de resistência quimioterápica de genes envolvidos com o ciclo celular é evidente, visto que a maioria dos agentes quimioterápicos exerce seus efeitos citotóxicos interferindo em diferentes etapas do ciclo celular (BALIS et al. 2002). Desta forma, a expressão anômala de genes envolvidos com a regulação do ciclo celular pode interferir positiva ou negativamente sobre a ação citotóxica destas drogas, dependendo do efeito que estes genes têm sobre o ciclo celular. Além disto, o comprometimento da dinâmica do ciclo celular pode interferir na atuação do sistema de reparo, caracterizado por uma interrupção da progressão do ciclo celular e correção de erros na estrutura do DNA ou, caso isso não seja possível, pela indução da apoptose na célula alterada. Neste estudo foi possível identificar um

gene (*MCM7*), hipo-expresso nos TW quimiorresistentes, envolvido com a regulação do ciclo celular. O gene *MCM7* tem uma ação direta sobre a replicação do DNA tendo uma grande importância na manutenção da integridade deste processo, uma vez que é responsável não só pela inicialização do processo de replicação do DNA, como também pelo controle de que a célula sofrerá apenas um único ciclo de replicação de DNA por ciclo celular.

Dois genes hiper-expressos nos TW quimiorresistentes (*HSPA8* e *SERPINH1*) estão envolvidos com o reparo do DNA. A expressão das *heat shock proteins* (*Hsps*) codificadas por estes genes está diretamente relacionada a uma maior capacidade de reparo de danos no DNA. Esta maior eficiência no reparo do DNA pode conferir às células tumorais um efeito protetor contra os danos causados por certos quimioterápicos, como por exemplo, a actinomicina D, cujo efeito citotóxico é determinado por danos diretos à molécula de DNA. Em um estudo realizado por EFFERTH et al. (2001) para a análise da expressão das proteínas pertencentes à família *heat shock protein 70 family* nos diferentes componentes do TW, os autores observaram que estas proteínas estão expressas somente nos componentes blastematoso e epitelial do TW, estando ausentes nos tumores de componente estromal e, que sua expressão é maior nos tumores expostos à quimioterapia em relação àqueles não expostos. Esta observação sugere que a expressão das *Hsps* pode ser induzida por agentes quimioterápicos, o que, juntamente com o fato de estarem envolvidas no reparo de danos no DNA, pode indicar um possível mecanismo de resistência adquirida à actinomicina D nos TW. Uma associação entre uma *Hsp* pertencente à mesma família de *SERPINH1* e TW de pior prognóstico já foi observada no estudo realizado por LI et al. (2005), onde através de experimentos de

microarray de cDNA, estes autores identificaram o gene *SERPINB3* com uma expressão cerca de 100 vezes maior em TW recidivados em relação aos TW que não apresentaram recidiva.

O gene *MAT2A* está envolvido com a proliferação celular e, além disso, tem sido associado à resistência adquirida a algumas drogas quimioterápicas, onde a aquisição de resistência é diretamente proporcional ao nível celular de AdoMet, produto da atividade enzimática de *MAT2A* (DRUMMELSMITH et al. 2004). Em um estudo realizado por WANG et al. (2001), com o intuito de verificar a participação de genes relacionados à resistência a múltiplas drogas (*MDRs*) na quimiorresistência adquirida em células de neuroblastoma murino, foi possível observar, através da análise da expressão destes genes por RT-PCR, que a resistência adquirida por estas células não é secundária à expressão de genes relacionados à resistência à múltiplas drogas (*MDRs*), mas sim à hiper-metilação do DNA, secundário à hiper-expressão de AdoMet. O gene *MAT2A* possui uma interessante participação no processo de regulação gênica pelo fato de ser o responsável pela principal fonte de radicais metil para as diversas reações de transmetilação. Considerando que a metilação é um dos principais mecanismos de inativação gênica, a hiper-expressão deste gene pode estar interferindo, nos TW quimiorresistentes, em seu perfil de expressão gênica, inclusive de genes relacionados à quimiossensibilidade como, por exemplo, os indutores de apoptose.

Genes relacionados ao processo de sinalização celular podem ter uma participação importante na resposta quimioterápica, já que podem estar envolvidos em diversos mecanismos de comunicação celular, o que facilita a interação entre receptores de superfície e efetores metabólicos intracelulares, sobretudo se

relacionados a processos metabólicos cuja sinalização esteja envolvida principalmente com alterações do citoesqueleto, crescimento, proliferação e sobrevivência celular. Entre os genes selecionados, cinco estão envolvidos com o processo de sinalização (*GNA13*, *GNG2*, *RAP1B*, *GAS6* e *SPARC*) estando todos hiper-expressos nos TWQR. Os genes *GNA13* e *GNG2*, por exemplo, codificam proteínas de membrana que regulam o fluxo de informações entre os receptores de superfície e os efetores metabólicos intracelulares estando envolvidas em sistemas de sinalização transmembrana relacionados a alterações do citoesqueleto, crescimento celular, oncogênese e apoptose (KUROSE 2003). A proteína GNG2 possui atividade GTPase é a primeira responsável pela especificidade da interação entre uma proteína G e seu receptor. A proteína codificada pelo gene *RAP1B*, além de também possuir atividade GTPase, está envolvida nos processos de sinalização e adesão celular e transporte intracelular de outras proteínas. O gene *GAS6* codifica uma proteína de ligação que atua como ligante de diversos receptores, estando envolvida positivamente com a adesão, migração, crescimento, proliferação e sobrevivência celular. Por fim, a proteína SPARC é uma proteína associada à matriz extracelular envolvida com a regulação do crescimento celular através de interações entre matriz e citocinas. Por regular a permeabilidade endotelial através da formação de *gaps* intercelulares, SPARC facilita não só a interação entre vias metabólicas e seus efetores como também o fluxo de moléculas e substâncias entre os meios intra e extracelular facilitando, desta maneira, o mecanismo de efluxo de agentes quimioterápicos, um dos principais mecanismos existentes de resistência quimioterápica, sobretudo à vincristina e à actinomicina D.

Quando olhamos para a localização cromossômica dos genes selecionados é possível observar que grande parte destes genes estão localizados em cromossomos ou regiões cromossômicas já relacionadas ao prognóstico ou ao desenvolvimento dos TW (1q, 7p, 7q, 11q, 12, 13, 14q e 17q), o que favorece a associação entre a expressão destes genes e os TW. Dos genes localizados em *loci* já relacionados ao prognóstico dos TW, cujo perfil de expressão encontrado é concordante com o significado prognóstico relacionado a estes *loci* segundo os dados provenientes de estudos de citogenética em TW ou em outros tumores estão os genes *CRABP2*, *RAP1B*, *FSCN1* e *EI24*.

A relação do cromossomo 12 com TW, caracterizado pelo ganho de material, geralmente de todo o cromossomo (+12), corresponde a uma das alterações citogenéticas mais comuns nestes tumores (SHENG et al. 1990; HÖGLUND et al. 2004). Apesar de não haver relatos do envolvimento do cromossomo 12 com o prognóstico dos TW, o ganho de 12q parece estar associado à desregulação de genes reguladores da apoptose e do ciclo celular em pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica (KIENLE et al. 2005), o que parece concordar com a hiper-expressão do gene *RAP1B*, localizado em 12q14, nos TWQR.

A hiper-expressão do gene *CRABP2* (1q21.3) nos TWQR pode estar associado ao ganho de material cromossômico de 1q, freqüentemente observado nos TW e associado a um maior risco de recidiva tumoral (HÖGLUND et al. 2004). Da mesma maneira, a hiper-expressão do gene *FSCN1* no TW quimiossensível e sua localização em 7p22 parecem fazer sentido, uma vez que a perda de material de 7p está freqüentemente associada aos TW de pior evolução clínica (HÖGLUND et al. 2004).

O *locus* 11q, também associado aos TW, corresponde à localização cromossômica de três dos 14 genes selecionados neste estudo: *SERPINH1*, *HSPA8* e *EI24*. Alterações citogenéticas envolvendo o *locus* 11q são frequentes nos TW porém é a perda de material de 11q que está associada à recorrência tumoral (KLAMT et al. 1998; BOWN et al. 2002), o que condiz somente com a hiper-expressão de *EI24* nos tumores quimiossensíveis uma vez que é um gene indutor de apoptose.

O *locus* 17q, onde estão localizados os genes *GNA13* (17q24.3) e *IGFBP4* (17q12-q21.1) está relacionado aos TW por corresponder ao *locus* FWT1(*Familial Wilms Tumor 1*), associado aos TW com história familiar, sobretudo *IGFBP4* cuja localização corresponde à exata localização cromossômica de FWT1 (RUTESHOUSER e HUFF 2004). Apesar de não haver evidências de sua correlação com o prognóstico dos TW, o *locus* 17q está relacionado ao prognóstico de diversos outros tumores, como o neuroblastoma, por exemplo, onde o ganho de material desta região está sempre associado a uma pior evolução clínica e a um comprometimento da sobrevida de até 50% em comparação a neuroblastomas sem de 17q (ABEL et al. 1999; WU et al. 2002; VASUDEVAN e NUCHTERN 2005).

A hiper-expressão de genes como *GAS6*, localizado no cromossomo 13 (13q34), e *MCM7*, localizado em 7q21.3-q22.1, pode estar correlacionada ao ganho de material do cromossomo (+13) e da região 7q, respectivamente, alterações citogenéticas estas bastante frequentes nos TW (HÖGLUND et al. 2004), ainda que não apresentem aparentemente nenhuma correlação com o prognóstico dos TW.

Apesar de não estar aparentemente correlacionado ao TW, o *locus* 5q já pôde ser relacionado à resistência quimioterápica através de uma associação entre o ganho de material desta região e linhagens celulares de LLA resistentes à diferentes agentes

quimioterápicos (EFFERTH et al. 2002). Esta informação favorece a identificação dos genes *SPARC* e *RNF130*, ambos localizados em 5q (5q31.3-q32 e 5q35.3, respectivamente) entre os genes hiper-expressos nos TW quimiorresistentes.

Como podemos observar, foi possível identificar, através da construção e da análise de bibliotecas de *SAGE*, genes diferencialmente expressos entre tumores de Wilms de componente blastematoso sensível e resistente à quimioterapia. A partir do perfil de expressão destes genes entre as bibliotecas e de suas características biológicas (funções biológicas, vias metabólicas envolvidas, inter-relação com outros genes e envolvimento com a resposta quimioterápica em outros tumores), foi possível estabelecer relações entre estes genes e a resposta quimioterápica. Estas relações, no entanto são especulativas, não só por sua complexidade e pela escassez de informações disponíveis referentes à expressão gênica enfocando resistência quimioterápica em tumores de Wilms como, principalmente, pelo fato dos nossos resultados terem sido obtidos tendo como base a expressão gênica de somente três amostras tumorais, o que torna de fundamental importância a validação da expressão diferencial dos genes selecionados em um maior número de amostras.

Uma vez que os genes foram selecionados a partir de uma amostra de TW quimiossensível não exposto à quimioterapia e de duas amostras de TW quimiorresistentes expostos à quimioterapia, não se pode descartar o risco de que a expressão diferencial observada nos genes selecionados possa ter sido influenciada pela ação da quimioterapia à que foram expostos os tumores quimiorresistentes. Para verificar se isto é ou não é uma verdade, será necessário validar a expressão diferencial destes genes em um maior número de casos, o que deverá incluir amostras de TW de estádios iniciais, não expostas à quimioterapia, com e sem recaída

sistêmica da doença, representando, desta maneira, tumores resistentes e sensíveis à quimioterapia, respectivamente, sem a suposta interferência da quimioterapia na expressão de seus genes. No entanto, existem evidências de que o padrão de expressão de pelo menos alguns destes genes selecionados não foi alterado pelo tratamento quimioterápico, como, por exemplo, no estudo realizado por TAKAHASHI et al. (2002), no qual o gene *CRABP2* mostrou-se hiper-expresso em TW de histologia favorável e de pior evolução clínica, sendo que as amostras tumorais utilizadas neste estudo não foram submetidas à quimioterapia pré-operatória. Este fato sugere que alta expressão deste gene, observada nos TWQR, não deve ter sido induzida pela QT, mas sim ser característica destes tumores, também considerados de pior prognóstico.

Dos genes selecionados neste estudo, aqueles que tiverem sua expressão diferencial confirmada em outros TW têm uma grande chance de estarem realmente envolvidos com a resposta quimioterápica nos TW de componente blastematoso. Somente neste momento, entretanto, será possível estabelecer relações funcionais entre estes genes e os mecanismos envolvidos na ação dos agentes quimioterápicos, com a finalidade de definir o real mecanismo de resistência e/ou sensibilidade quimioterápica por eles modulada. Uma vez que isto seja possível para um ou mais genes, poderá ser considerada a viabilidade, dependendo das características do(s) gene(s) envolvido(s), da utilização deste(s) gene(s) como marcador(es) molecular(es) de resposta quimioterápica e até, quem sabe, como novo(s) alvo(s) terapêutico(s) para os tumores de Wilms.

6 CONCLUSÕES

1. Foram construídas duas bibliotecas de *SAGE* de tecido microdissecado de tumores de Wilms de componente blastematoso que apresentavam características de sensibilidade e resistência à quimioterapia. Como representante de tumor quimiossensível foi utilizada uma amostra proveniente de TW de predomínio blastematoso com disseminação tumoral abdominal e invasão de pelve renal ao diagnóstico, não exposto à quimioterapia pré-operatória, tendo recebido tratamento adjuvante à ressecção cirúrgica, estando sem sinais de doença por um período superior a 5 anos. Como representante da situação de quimiorresistência foi utilizada uma amostra proveniente de TW de predomínio blastematoso limitado ao rim, que foi exposto à quimioterapia pré-operatória com vincristina e actinomicina D e que, no momento cirúrgico apresentou-se como neoplasia viável, com ausência de necrose;
2. Foi possível gerar mais de 60.000 *tags* de cada biblioteca, que correspondem à cerca de 20.000 genes expressos em cada um dos tecidos tumorais analisados;
3. A análise da expressão gênica diferencial através da abordagem de bioinformática adotada permitiu a identificação de 36 genes diferencialmente expressos entre duas amostras de TW do tipo blastematoso resistentes e uma

amostra de TW do tipo blastematoso sensível à quimioterapia habitualmente utilizada para o tratamento destes tumores;

4. Uma análise mais detalhada levando em consideração as características biológicas dos genes diferencialmente expressos permitiu a identificação de 11 genes hiper-expressos e 3 genes hipo-expressos nos TW quimiorresistentes relacionados a processos biológicos que estão, de alguma forma, envolvidos com a resposta quimioterápica, sobretudo ao tratamento com vincristina e actinomicina D, como por exemplo, formação dos microtúbulos e/ou citoesqueleto celular, regulação da expressão gênica, reparo do DNA, controle do ciclo celular, diferenciação e proliferação celular, transdução de sinal e apoptose.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel F, Ejleskar K, Kogner P, Martinsson T. Gain of chromosome arm 17q is associated with unfavourable prognosis in neuroblastoma, but does not involve mutations in the somatostatin receptor 2 (SSTR2) gene at 17q24. **Br J Cancer** 1999; 81:1402-9.

Baker SJ, Reddy EP. Cloning of murine G1RP, a novel gene related to *Drosophila melanogaster* g1. **Gene** 2000; 248:33-40.

Balis FM, Holcenberg JS, Blaney SM. General principles of chemotherapy. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. **Principles and practice of pediatric oncology**. 4th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p.237-86.

Bardeesy N, Beckwith JB, Pelletier J. Clonal expansion and attenuated apoptosis in Wilms' Tumors are associated with p53 gene mutations. **Cancer Res** 1995; 55:215-9.

Beckwith JB. Precursor lesions of Wilms Tumor: clinical and biological implications. **Med Pediatr Oncol** 1993; 21:158-68.

Beckwith JB, Zuppan CE, Browning NG, Mokness J, Breslow NE. Histological analysis of aggressiveness and responsiveness in Wilms' Tumor. **Med Pediatr Oncol** 1996; 27:422-8.

Beckwith JB. Revised SIOP working classification of renal tumors of childhood. **Med Pediatr Oncol** 2002; 38:77-8.

Bernardini S, Cianfarani S, Spagnoli A, et al. Expression and down-regulation by retinoic acid of IGF binding protein-2 and -4 in medium from human neuroblastoma cells. **J Neuroendocrinol** 1994; 6:409-13.

Birch JM, Breslow N. Epidemiologic features of Wilms tumor. **Hematol Oncol Clin North Am.** 1995;9(6):1157-78.

Boccon-Gibod L, Rey A, Sandstedt B, et al. Complete necrosis induced by preoperative chemotherapy in Wilms tumor as an indicator of low risk: report of the international society of paediatric oncology (SIOP) nephroblastoma trial and study 9. **Med Pediatr Oncol** 2000;34(3):183-90.

Bown N, Cotterill SJ, Roberts P, et al. Cytogenetic Abnormalities and clinical outcome in Wilms Tumor: a study by the U.K.Cancer Cytogenetics Group and the U.K. Children's Cancer Study Group. **Med Pediatr Oncol** 2002; 38:11-21.

Budhu AS, Noy N. Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. **Mol Cell Biol** 2002; 22:2632-41.

Camassei FD, Arancia G, Cianfriglia M, et al. Nephroblastoma: multidrug-resistance P-glycoprotein expression in tumor cells and intratumoral capillary endothelial cells. **Am J Clin Pathol** 2002;117(3):484-90.

Casale F, D'Angelo V, Addeo R, et al. P-glycoprotein 170 expression and function as an adverse independent prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Oncol Rep** 2004;12(6):1201-7.

Chabardes-Garonne D, Mejean A, Aude JC, et al. A panoramic view of gene expression in the human kidney. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100(23):13710-5.

Chesik D, Wilczak N, De Keyser J. Insulin-like growth factor binding protein-4 interacts with centrosomes and microtubules in primary astrocytes. **Neuroscience** 2004; 125:381-90.

Chrigwin MJ, Przybyla EA, MacDonald R, Rutter J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. **Biochemistry** 1979; 18:5294-9.

Cortez D, Glick G, Elledge SJ. Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. **Proc Natl Acad Sci USA** 2004; 101:10078-83. Epub 2004 Jun 21.

D'Angio GJ, Evans AE, Breslow N, et al. The treatment of Wilms' tumor: Results of the national Wilms' tumor study. **Cancer** 1976;38(2):633-46.

D'Angio GJ. Pre- or post-operative treatment for Wilms tumor? Who, what, when, where, how, why--and which. **Med Pediatr Oncol** 2003;41(6):545-9.

Dao D, Walsh CP, Yuan L, et al. Multipoint analysis of human chromosome 11p15/mouse distal chromosome 7: inclusion of H19/IGF2 in the minimal WT2 region, gene specificity of H19 silencing in Wilms' tumorigenesis and methylation hyper-dependence of H19 imprinting. **Hum Mol Genet** 1999; 8:1337-52.

de Kraker J, Graf N, van Tinteren H, Pein F, Sandstedt B, Godzinski J, et al. Reduction of postoperative chemotherapy in children with stage I intermediate-risk and anaplastic Wilms' tumour (SIOP 93-01 trial): a randomized controlled trial. **Lancet** 2004;364(9441):1229-35.

Delemarre JF, Sandstedt B, Harms D, Boccon-Gibod L, Vujanic GM. The new SIOP (Stockholm) working classification of renal tumours of childhood. International Society of Paediatric Oncology [letter]. **Med Pediatr Oncol** 1996;26(2):145-6.

Dome JS, Coppes MJ. Recent advances in Wilms tumor genetics. *Curr Opin Pediatr*. 2002;14(1):5-11.

Drummelsmith J, Girard I, Trudel N, Ouellette M. Differential protein expression analysis of *Leishmania major* reveals novel roles for methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in methotrexate resistance. *J Biol Chem* 2004; 279:33273-80. Epub 2004 Jun 09.

Ducore JM, Parikh-Patel A, Gold EB. Cancer occurrence in Southeast Asian children in California. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2004;26(10):613-8.

Efferth T, Schulten HG, Thelen P, et al. Differential expression of the heat shock protein 70 in the histological compartments of nephroblastomas. *Anticancer Res* 2001; 21:2915-20.

Efferth T, Verdorfer I, Miyachi H, et al. Genomic imbalances in drug-resistant T-cell acute lymphoblastic CEM leukemia cell lines. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 29:1-13.

Farber S. Chemotherapy in the treatment of leukemia and Wilms' tumor. *JAMA* 1966;198:826-36.

Farber S, D'Angio, Evans A, Mitus A. Clinical studies of actinomycin D with special reference to Wilms' tumor in children. 1960. *J Urol* 2002;168(6):2560-2.

Faria P, Beckwith JB, Mishra K, et al. Focal versus diffuse anaplasia in Wilms Tumor – new definitions with prognostic significance: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *Am J Surg Pathol* 1996; 20:909-20.

Fukuzawa R, Breslow NE, Morison IM, et al. Epigenetic differences between Wilms' tumours in white and east-Asian children. *Lancet* 2004; 363(9407):446-51.

Ghanem MA, Van der Kwast TH, Den Hollander JC, et al. The prognostic significance of apoptosis-associated proteins BCL-2, BAX and BCL-X in clinical nephroblastoma. **Br J Cancer** 2001 Nov;85(10):1557-63.

Godzinski J, Moorman-Voestermans CGM, Sawicz-Birkowska K, et al. Paediatric surgical oncology. 5-Nephroblastoma. International Society of Paediatric Oncology (SIOP) Nephroblastoma Trial and Study Committee. **Eur J Surg Oncol** 1995; 21:414-8.

Granerus M, Johannisson A, Ekblom P, Engstrom W. Insulin-like growth factors I and II induce cell death in Wilms's tumour cells. **Mol Pathol** 2001; 54(1):30-5.

Grundy PE, Green DM, Coppes MJ, et al. Renal tumors. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. **Principles and practice of pediatric oncology**. 4th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p.865-93.

Gu Z, Flemington C, Chittenden T, Zambetti GP. ei24, a p53 response gene involved in growth suppression and apoptosis. **Mol Cell Biol** 2000; 20(1):233-41.

Hasanbasic I, Cuerquis J, Varnum B, Blostein MD. Intracellular signaling pathways involved in Gas6-Axl-mediated survival of endothelial cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 2004; 287:H1207-13.

Höglund M, Gisselsson D, Hansen GB, Mitelman F. Wilms tumors develop through two distinct karyotypic pathways. **Cancer Genet Cytogenet** 2004; 150:9-15.

Hung IJ, Chang WH, Yang CP et al. Epidemiology, clinical features and treatment outcome of Wilms' tumor in Taiwan: a report from Taiwan Pediatric Oncology Group. **J Formos Med Assoc** 2004;103(2):104-11.

Ikegawa S, Nakamura Y. Structure of the gene encoding human colligin-2 (CBP2). **Gene** 1997; 194:301-3.

Ito M, Nakashima M, Nakayama T, et al. Expression of receptor-type tyrosine kinase, Axl, and its ligand, Gas6, in pediatric thyroid carcinomas around chernobyl. **Thyroid** 2002; 12:971-5.

Jho EH, Malbon CC. Galpha12 and Galpha13 mediate differentiation of P19 mouse embryonal carcinoma cells in response to retinoic acid. **J Biol Chem** 1997; 272:24461-7.

Kienle DL, Korz C, Hosch B, et al. Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes. **J Clin Oncol** 2005 May 2; [Epub ahead of print]

Klamt B, Schulze M, Thate C, et al. Allele loss in Wilms tumors of chromosome arms 11q, 16q, and 22q correlate with clinicopathological parameters. **Genes Chromosomes Cancer** 1998;22(4):287-94.

Kurose H. Galpha12 and Galpha13 as key regulatory mediator in signal transduction. **Life Sci** 2003; 74:155-61.

Lai PS, Tay JSH. Wilms' Tumor. In: Kurzrock R, Talpaz M., editors. **Molecular biology in cancer medicine**. 2nd ed. London: Martin Dunutz; 1999. p. 531-47.

Lehmann S, Paul C, Torma H. The expression of cellular retinoid binding proteins in non-APL leukemic cells and its association with retinoid sensitivity. **Leuk Lymphoma** 2002; 43:851-8.

Li CM, Guo M, Borczuk A, et al. Gene expression in Wilms' Tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal epithelial transition. **Am J Pathol** 2002; 160:2181-90.

Li W, Kessler P, Yeger H, et al. A gene expression signature for relapse of primary wilms tumors. **Cancer Res** 2005; 65:2592-601.

Lockhart DJ, Winzeler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. **Nature** 2000; 405:827-36.

Lu YJ, Hing S, Williams R, Pinkerton R, Shipley J, Pritchard-Jones K; UK Children's Cancer Study Group Wilms' Tumor Group. **Lancet** 2002; 360:385-6.

Macmahon HE, Bedizel M, Ellis CA. Vincristine (leurocristine) sulfate in the treatment of children with metastatic wilms' tumor. **Pediatrics** 1963;32:880-7.

Manor D, Shmidt EN, Budhu A, et al. Mammary carcinoma suppression by cellular retinoic acid binding protein-II. **Cancer Res** 2003; 63:4426-33.

Marra MA, Kucaba TA, Hillier LW, Waterston RH. High-throughput plasmid DNA purification for 3 cents per sample. **Nucleic Acids Res** 1999;27(24):e37.

Meigs TE, Fields TA, McKee DD, Casey PJ. Interaction of Galpha 12 and Galpha 13 with the cytoplasmic domain of cadherin provides a mechanism for beta-catenin release. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:519-24.

Meigs TE, Fedor-Chaiken M, Kaplan DD, Brackenbury R, Casey PJ. Galpha12 and Galpha13 negatively regulate the adhesive functions of cadherin. **J Biol Chem** 2002; 277:24594-600.

Meister B, Fink FM, Hittmair A, Marth C, Widschwendter M. Antiproliferative activity and apoptosis induced by retinoic acid receptor-gamma selectively binding retinoids in neuroblastoma. **Anticancer Res** 1998; 18:1777-86.

O'Meara A, Imamura A, Johnson P, et al. Reactivity of P-glycoprotein monoclonal antibodies in childhood cancers. **Oncology** 1992;49(3):203-8.

Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ, Bieber CA. The international incidence of childhood cancer. **Int J Cancer** 1988; 42:511-20.

Pritchard-Jones K, Hawkins MM. Biology of Wilms Tumor. **Lancet** 1997; 349:663-4.

Pritchard-Jones K. Controversies and advances in the management of Wilms' tumour. **Arch Dis Child** 2002;87(3):241-4.

Ravenel JD, Broman KW, Perlman EJ, et al. Loss of imprinting of insulin-like growth factor-II (IGF2) gene in distinguishing specific biologic subtypes of Wilms tumor. **J Natl Cancer Inst** 2001;93(22):1698-703.

Re GG, Willingham MC, el Bahtimi R, Brownlee NA, Hazen-Martin DJ, Garvin AJ. Anaplasia and drug selection-independent overexpression of the multidrug resistance gene, MDR1, in Wilms' tumor. **Mod Pathol** 1997;10(2):129-36.

Riggs, jr. CE. Antitumor antibiotics and related compounds. In: Perry MC, editor. **The chemotherapy source book**. 2nd. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996. p.345-85.

Rowinsky EK, Donehower RC. Microtubule-targeting drugs. In: Perry MC, editor. **The chemotherapy source book**. 2nd. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996. p.387-423.

Ruteshouser EC, Huff V. Familial Wilms' tumor. **Am J Med Genet C Semin Med Genet** 2004; 129:29-34.

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. **Biotechniques** 1994; 17:914-21.

Schena M, Heller RA, Theriault TP, Konrad K, Lachenmeier E, Davis RW. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. **Trends Biotechnol** 1998; 16:301-6.

Schumacher V, Schuhen S, Sonner S, et al. Two molecular subgroups of Wilms' tumors with or without WT1 mutations. **Clin Cancer Res** 2003;9(6):2005-14.

Sheng WW, Soukup S, Bove K, Gotwals B, Lampkin B. Chromosome analysis of 31 Wilms' tumors. **Cancer Res** 1990; 50:2786-93.

Shi Q, Bao S, Maxwell JA, et al. Secreted protein acidic, rich in cysteine (SPARC), mediates cellular survival of gliomas through AKT activation. **J Biol Chem** 2004; 279:52200-9.

Sola JE, Wojno KJ, Dooley W, Colombani PM. P-glycoprotein status of favorable-histology Wilms' tumor predicts treatment outcome. **J Pediatr Surg** 1994;29(8):1080-3.

Stiller CA, Parkin DM. International variations in the incidence of childhood renal tumours. **Br J Cancer** 1990; 62:1026-30.

Stock C, Ambros IM, Lion T, et al. Genetic changes of two Wilms tumors with anaplasia and a review of the literature suggesting a marker profile for therapy resistance. **Cancer Genet Cytogenet** 2002;135(2):128-38.

Strong LC. The two-hit model for Wilms' tumor: where are we 30 years later? **Genes Chromosomes Cancer** 2003;38(4):294-9.

Takahashi M, Yang XJ, Lavery TT, et al. Gene expression profiling of favorable histology Wilms tumors and its correlation with clinical features. **Cancer Res** 2002; 62:6598-605.

Valverde P, Obin MS, Taylor A. Role of Gas6/Axl signaling in lens epithelial cell proliferation and survival. **Exp Eye Res** 2004; 78:27-37.

Vasudevan SA, Nuchtern JG. Gene profiling of high risk neuroblastoma. **World J Surg** 2005; 29:317-24.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. **Science** 1995; 270:484-7.

Velculescu VE, Zhang L, Zhou W, et al. Characterization of the yeast transcriptome. **Cell** 1997; 88:243-51.

Vencio RZ, Brentani H, Patrao DF, Pereira CA. Bayesian model accounting for within-class biological variability in Serial Analysis of Gene Expression (SAGE). **BMC Bioinformatics** 2004;5(1):119.

Vernon EG, Malik K, Reynolds P, et al. The parathyroid hormone-responsive B1 gene is interrupted by a t(1;7)(q42;p15) breakpoint associated with Wilms' tumour. **Oncogene** 2003;22(9):1371-80.

Vincent TS, Re GG, Hazen-Martin DJ, Tarnowski BI, Willingham MC, Garvin AJ. All-trans-retinoic acid-induced growth suppression of blastemal Wilms' tumor. **Pediatr Pathol Lab Med** 1996;16(5):777-89.

Voci A, Demori, Bottazzi C, Fugassa E. Regulation of renal growth and IGFBP-4 expression by triiodothyronine during rat development. **Horm Metab Res** 2001; 33:256-62.

Volm M, Mattern J, Stammer G, et al. Expression of resistance-related proteins in nephroblastoma after chemotherapy. **Int J Cancer** 1995;63(2):193-7.

Vujanic GM, Sandstedt B, Harms D, Kelsey A, Leuschner I, de Kraker J, SIOP Nephroblastoma Scientific Committee. Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. **Med Pediatr Oncol** 2002; 38:79-82.

Wagner KJ, Patek CE, Miles C, Christie S, Brookes AJ, Hooper ML. Truncation of WT1 results in downregulation of cyclin G1 and IGFBP-4 expression. **Biochem Biophys Res Commun** 2001;287(4):977-82.

Wang C, Mirkin BL, Dwivedi RS. DNA (cytosine) methyltransferase overexpression is associated with acquired drug resistance of murine neuroblastoma cells. **Int J Oncol** 2001; 18:323-9.

Weirich A, Leuschner I, Harms D, et al. Clinical impact of histologic subtypes in localized non-anaplastic nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH. **Ann Oncol** 2001; 12:311-9.

Wiener JS, Coppes MJ, Ritchey ML. Current concepts in the biology and management of Wilms tumor. **J Urol** 1998;159(4):1316-25.

Williams RD, Hing SN, Greer BT, et al. Prognostic classification of relapsing favorable histology Wilms tumor using cDNA microarray expression profiling and support vector machines. **Genes Chromosomes Cancer** 2004;41(1):65-79.

Wu CW, Chen GD, Fann CS, et al. Clinical implications of chromosomal abnormalities in gastric adenocarcinomas. **Genes Chromosomes Cancer** 2002; 35:219-31.

Yang Q, Liu S, Tian Y, et al. Methylation-associated silencing of the heat shock protein 47 gene in human neuroblastoma. **Cancer Res** 2004; 64:4531-8.

Zhou R, Diehl D, Hoeflich A, Lahm H, Wolf E. IGF-binding protein-4: biochemical characteristics and functional consequences. **J Endocrinol** 2003; 178:177-93.

ANEXOS

Anexo 1 Autorização para a utilização das amostras pela Comissão de Ética em Pesquisa de Hospital do Câncer A. C. Camargo

São Paulo, 28 de novembro de 2001

À

Dra. Simone Treiger Sredni

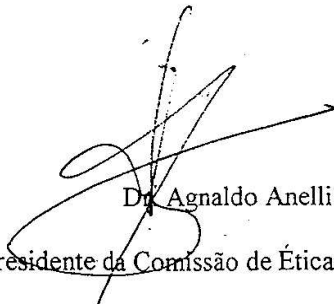
Ref. Comunicação da Comissão de Ética em Pesquisa

Projeto: "Identificação dos marcadores moleculares dos tumores embrionários através da análise dos perfis de expressão gênica." (nº 371/01)

Prezada Dra. Simone,

Seu projeto de pesquisa, acima mencionado, foi apreciado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital do Câncer em sua última reunião de 27/11/2001. Os membros desta comissão aprovaram a realização deste estudo. Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhados à secretaria do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,



Dr. Agnaldo Anelli
Presidente da Comissão de Ética em Pesquisa

C/c: Dr. Fernando Augusto Soares

Dra. Otávia L. Caballero

Dra. Beatriz de Camargo

Dr. Andrew J. G. Simpson

Comissão de Ética em Pesquisa - CEP

Rua Prof. Antonio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo – SP
CEP – 01509-909 – Tel. (0**11) 3272-5000 ramal 1117

Anexo 2 Modelo do termo de informação e consentimento do Hospital do Câncer
A. C. Camargo

TERMO DE INFORMAÇÃO E CONSENTIMENTO

Para obter um maior conhecimento sobre o câncer, o Corpo Clínico deste Hospital (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica e científica. Através dessa pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Este trabalho envolve a busca, em tumores, de novos genes ou de lesões em genes já existentes. Estes estudos são realizados em fragmentos de tumores removidos em cirurgias, ou em material biológico colhido.

Você está sendo admitido(a) neste Hospital para estabelecimento de diagnóstico e/ou tratamento de alguma forma de tumor. Para fins de diagnóstico, fator prognóstico e/ou como parte de seu tratamento, há a necessidade da remoção do tumor e/ou material biológico relacionado à enfermidade. É prática rotineira deste Hospital usar parte do tumor e/ou material biológico retirado, para exames clínicos laboratoriais, necessários para um diagnóstico definitivo. O restante do tumor que é retirado, ou material biológico, não é utilizado, sendo então congelado e armazenado para novos exames se necessários . Caso contrário, são descartados, conforme Legislação Sanitária regulamentar sobre o assunto.

A obtenção e o estudo dos referidos fragmentos de tumor e material biológico não implicarão em riscos adicionais no seu tratamento ou na sua cirurgia, nem tampouco, em aumento no tempo da operação ou extensão da mesma . O projeto de pesquisa proposto que vier a utilizar este material será previamente apresentado à apreciação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital.

O fragmento de tumor e/ou material biológico será identificado no laboratório por um código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade serão sempre preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.

Concordando com o uso do material para os fins acima descritos, é necessário esclarecê-lo(a) que não existem quaisquer benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu tratamento.

Caso haja questões a fazer sobre este Termo de Consentimento ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo seu médico, por gentileza entre em contato com a comissão de Ética Médica, pelo telefone 3272-5000 ramal 1117.

Você receberá cópia deste documento e o original será arquivado no prontuário médico. Somente assine este documento, se consentir integralmente com os termos deste.

DECLARAÇÃO

Declaro estar ciente das informações ora prestadas,tendo lido atentamente e concordado com o teor.
São Paulo,.....de.....de.....

.....
Responsável ou Paciente

Nome:.....

RG:.....

RGH:.....

