

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS DIFERENTES COMPONENTES DE TUMOR DE WILMS

MARIANA MASCHIETTO

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

Área de Concentração: Oncologia

**Orientadora: Prof^a Dra. Beatriz de Camargo
Co-Orientador: Dra. Dirce Maria Carraro e Dra.
Simone Treiger Sredni**

**São Paulo
2005**

Fundação Antonio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Maschietto, Mariana

Caracterização molecular dos diferentes componentes de tumor de Wilms/ Mariana Maschietto -- São Paulo, 2005.

115p.

Dissertação(mestrado) -- Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Beatriz de Camargo

Descritores: 1. TUMOR DE WILMS/genética/patologia. 2. PERFIL DA EXPRESSÃO GÊNICA. 3. ANÁLISE MICROARRAY.

DEDICATÓRIA

Com todo amor, dedico essa dissertação...

Aos meus pais, meus ídolos.

Aos meus irmãos, meus amigos.

Obrigada por acreditarem nos meus sonhos!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

... três pessoas foram indescritivelmente maravilhosas: acolheram, ensinaram, torceram e me mostraram sempre o melhor caminho: Beatriz de Camargo, Simone T. Sredni e Dirce M. Carraro. Bia, muito obrigada por ter me dado a oportunidade de estar onde estou e pela confiança. Simone, muito obrigada pela amizade, pelas conversas, pelos conselhos, pela força e pelas idéias. Dirce, muito obrigada pela adoção tardia, pelo dia a dia, pelo incentivo, pela paciência, pelo esforço, pelas discussões e principalmente, pelas conversas.

... ao laboratório, Nádia P. Castro, Maria Cristina Rangel (meninas, muito obrigada pelo apoio. Vocês foram maravilhosas!), Thiago F. Saraiva (obrigada pela disponibilidade e pelas corridas de géis “rapidinho”), Paulo H. B. Pineda, Elen P. Bastos (uma paciência exemplar nos cuidados com as lâminas!), Jane H. L. Kaiano, Louise D. Mota (obrigada pela ajuda fundamental nos experimentos) e Reimar Padovani. Por quanto me ajudaram dentro e por todas as comemorações fora do laboratório

... aos vizinhos, do laboratório de Biologia Computacional, Helena P. Brentani, Luiz Paulo Camargo, Artur Fabri, Diogo F. C. Patrão e Daniel F. Simão. Pela valiosa e fundamental colaboração nesse trabalho, pela paciência, pela disponibilidade e por estarem sempre dispostos a ajudar. Claro... e pelas “horas extras”!

... ao laboratório no qual cheguei (Laboratório de Genética do Câncer): André L. Vettore e Otávia D. Caballero, Daniel Vidal (teria sido muito difícil sem ter um amigo como você por perto), Luciane T. Kagohara (valeu pela força e por aquele gel!!), Fábio S. Picolli, Roberta S. Felix, Danielle Renzoni, Andréa Seixas, Fabrício de Carvalho, Valéria Paixão (uma grande amiga), Márcia Dellamano, Mariana Bright, Adriana Bulgarelli e Maria Isabel W. Achatz.

... a todas as pessoas dos Departamentos de Patologia e de Pediatria que se envolveram nesse trabalho.

... Carlos Nascimento, Miyuki Silva, Severino Silva, pelo trabalho tão cuidadoso com as amostras. E ao André Abreu, por estar sempre tão disposto a ajudar.

... Aline do Nascimento Bolpetti (obrigada por toda força e incentivo, dentro e fora do trabalho!) e Edaise M. Silva (“DNA – I still want to believe”), amigas antes de tudo.

... Leonardo M. Devai, por tantos galhos quebrados ...

... a todos do Instituto Ludwig pela ajuda, pelo convívio do dia a dia, pelas conversas nos corredores e pelas amizades conquistadas.

... aos responsáveis da Pós-Graduação, especialmente Dr. Luiz Fernando Lima Reis, Ana Maria Kurinari e Márcia M. Hiratani. Pela paciência, disposição e cuidado dispensados.

... às meninas da biblioteca: Sueli Francisco, Rosinéia Aguiar Carneiro, Maria Adriana M. Bassols e Francyni Pólen G. Lima, sempre tão dispostas e eficientes. Não tenho palavras para agradecer!!

... aos responsáveis pela manutenção do Instituto Ludwig, pelas excelentes condições de trabalho.

... meus pais, Hermes Gregório Maschietto e Cleide de Cássia Cavriani Maschietto, pelo amor, pela paciência e por apostar e acreditar.

... meus irmãos, “mano” Maurício Maschietto e “mano” Murilo Maschietto, pela cumplicidade, pelos momentos, pela convivência e pela paciência (essa é principalmente pra vc Mau!!).

... minhas 3 irmãs, que mesmo de longe, estiveram presentes em todos os dias da minha vida desde que tivemos a benção de nos conhecer: Melissa Chagas Assunção, Márcia Van Dick de Toledo (*in memorian*) e Rafaella Barci Dinni.

... a 3 moradores oficiais do apartamento: Bruno Menezes, Jorge Belfante e Magnus Tollefesen. Tenho certeza de que sabem do tumor de Wilms quase que tanto quanto eu.

... aos meus amigos. Os momentos que passamos juntos são tão importantes quanto os que passei trabalhando para o desenvolvimento dessa tese. Especialmente Amanda Gonçalves, Aline Lisie Ramos, Letícia Olops, Fabriciano Pinheiro, Cláudia M. Campos, Fabiano Alves, Juliana F. Cuzzi, Marcos Moriggi, Thais C. Vicente, Regina P. Bossolan e aqueles que também estão comigo, só um pouquinho mais de longe (e vocês são tão especiais).

Sei que não pude me lembrar de todos vocês e peço que me perdoem por isso. Tenham certeza de que esse esquecimento se restringe a essas folhas de papel.

Agadeço a Deus, pela oportunidade de uma vida tão maravilhosa!

"O, wonder!

How many goodly creatures are there here!

How beauteous mankind is!

O brave new world

That has such people in't"

William Shakespeare - A Tempestade, ato V

RESUMO

Maschietto M. **Caracterização molecular dos diferentes componentes de tumor de Wilms**. São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O tumor de Wilms (TW) é uma neoplasia morfológicamente complexa com 3 componentes histologicamente distintos encontrados em diferentes proporções: blastematoso, epitelial e estromal. A tumorigênese dos TW é de grande complexidade. Cada componente representa um estágio de desenvolvimento diferente do rim embrionário e possui características próprias de agressividade e resposta a tratamento. Os arranjos observados envolvendo os três componentes parecem recapitular estágios diferentes da embriogênese renal e estão presentes em proporções variáveis com diversidade de arranjo arquitetural e graus de diferenciação. Alguns eventos histológicos e biológicos têm sido sugeridos como capazes de desencadear ou manter a tumorigênese, entretanto as etapas desse mecanismo ainda são desconhecidas. WT1 é um gene que foi envolvido na tumorigênese de alguns casos de TWs e é importante para o desenvolvimento do trato genito-urinário. Para melhor compreensão da biologia do TW, analisamos a expressão gênica de cada componente separadamente através de cDNA *microarray*.

A casuística inclui 4 amostras de componente blastematoso, 5 amostras de componente epitelial e 3 amostras de componente estromal. As

amostras foram congeladas logo após a cirurgia e microdissecadas por bisturi ou *laser*. O RNA total extraído foi submetido à amplificação, marcado e hibridizado em lâmina contendo 4608 seqüências de ORESTES originadas do Projeto Genoma do Câncer, representando diferentes genes humanos. Todas as amostras foram marcadas em duplicata, invertendo o fluoróforo, e co-hibridizadas com um RNA referência. Após a hibridização, os dados foram capturados e normalizados. Foram considerados genes diferencialmente expressos aqueles que tiveram pelo menos duas vezes de diferença de expressão e p menor que 0,01, comparando-se os componentes 2 a 2.

A comparação entre os 3 componentes mostrou que eles têm perfis de expressão gênica diferentes, sendo que ao se observar o número de genes diferencialmente expressos entre eles, o componente blastematoso mostrou-se mais distinto do componente estromal do que do componente epitelial, e essa diferença é menor entre os componentes estromal e epitelial. Esses genes são capazes de discriminar o componente blastematoso do estromal, e o componente epitelial é discriminado na provável dependência do tratamento da amostra. Analisando as vias de sinalização celular, 54 genes da via WNT estão representados na lâmina e 12 deles estão diferencialmente expressos entre os componentes e são capazes de discriminar os diferentes componentes dos TWs.

As 4 isoformas de WT1 foi analisado mostrando que não há nenhum padrão característico de cada componente, sendo que as diferenças

apresentadas nos padrões são dependentes do indivíduo e não do componente do tumor.

SUMMARY

Maschietto M. [**Molecular characterization of the different components of Wilms tumor**]. São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Wilms tumors (WT) are morphologically complex neoplasm with 3 distinct histological components: blastemal, epithelial and stromal, which are found in different proportions. Each component represents a different stage of the kidney embryonic development and it has its own characteristic of aggressiveness and response to chemotherapy. WT have been considered a prototype for arrested cellular differentiation in human cancer. Previous assessments of the WT have relied on histology and few selected markers. WT1 is a gene important to genito-urinary tract and it has been involved in some WT cases. To better understand the WT biology, we analysed the gene expression pattern of each component individually using the microarray (MA) experiment.

Components were selected from 12 frozen tumors (4 blastemal components, 5 epithelial components and 3 stromal components.) They were scalpel or laser capture microdissected and total RNA was extracted and amplified in two rounds using T7 based technology. cMA was performed on a customized cDNA platform containing 4,608 ORESTES representing different human genes. It was used reference design with dye swap as duplicate. Fluorescent intensities of Cy5 and Cy3 channels on each slide

were subjected to spot filtering and normalization. Permuted Student test was used for statistical analysis in order to determine the p-value for the expression of each individual gene in the different analyzed class. It was considered as differentially expressed genes those which expression level was at least 2 fold and p value lower than 0.01 between groups.

Comparing the 3 components, each of them has an specific molecular profiling, and considering only the differentially expressed genes, blastemal component showed to be more different of the stromal component than of epithelial component, and this difference is smaller between blastemal and epithelial components. Deregulated genes of the comparisons were able to discriminate the blastemal component from the stromal component and the epithelial component showed to be similar to both others depending on treatment of the samples. Fifty-four WNT signaling pathway genes presented in the platform were analyzed among the different components and 12 of them showed to be differently regulated, being capable of discriminate the components

Analyses of 4 variants of WT1 was done in each component showing that the variants profiling is dependent on the tumors and not of the components tumor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Tumor de Wilms.	10
Figura 2	Estrutura do WT1	22
Figura 3	Modelo para o desenvolvimento dos TWs.	27
Figura 4	Lâmina de um tumor de Wilms corado por hematoxilina-eosina microdissecção manual.	43
Figura 5	Lâmina de um tumor de Wilms.	45
Figura 6	Avaliação da qualidade do RNA.	48
Figura 7	Gel de agarose (RNA amplificado).	51
Figura 8	Correlação de Pearson.	57
Figura 9	Representação da fluorescência de todos os genes de uma lâmina.	58
Figura 10	Gráficos representativos da normalização de Lowess.	59
Figura 11	Desenho ilustrativo do gene WT1.	62
Figura 12	Gráfico Volcano das três comparações.	66
Figura 13	Clusters hierárquico utilizando os genes diferencialmente expressos (Fold ≥ 2 e $p \leq 0,01$).	69
Figura 14	Clusters hierárquico utilizando os genes diferencialmente expressos (Fold ≥ 2 e $p \leq 0,0001$).	71
Figura 15	Clusters hierárquico utilizando os genes diferencialmente expressos em todas as comparações (Fold ≥ 2 e $p \leq 0,0001$).	72
Figura 16	Cluster hierárquico usando apenas os genes diferencialmente expressos da via WNT.	75
Figura 17	Gel de poliacrilamida 8%.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estadiamento dos tumores de Wilms.	9
Tabela 2	Classificação histológica dos TW segundo os a SIOP.	14
Tabela 3	Pacientes que foram diagnosticados com tumor de Wilms com amostra armazenada no Banco de Tumores do Departamento de Patologia do Hospital do Câncer AC Camargo.	40
Tabela 4	Amostras tumorais que foram submetidas a microdissecção (por bisturi ou <i>laser</i>).	42
Tabela 5	Características específicas de cada fluoróforo utilizado.	54
Tabela 6	<i>Primers</i> para verificar as isoformas do WT1.	62
Tabela 7	Isoformas de WT1.	63
Tabela 8	Distribuição dos genes das vias de transdução de sinal (KEGG – setembro/2004).	74
Tabela 9	Distribuição das isoformas do WT1 em todas as amostras.	77

LISTA DE ABREVIações

cDNA	DNA complementar a fita de RNA
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
GCBTTW	Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento de Tumores de Wilms
NWTSG	National Wilms Tumor Study Group
pb	pares de base
PCR	Polimerase Chain Reaction
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAa	RNA amplificado
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR
SBW	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
SIOP	Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique
TW	Tumor de Wilms
TWs	Tumores de Wilms
WAGR	Wilms tumor, Aniridia, Genito-urinary tract and mental Retardation Syndrome
WNT	Wingless signaling pathway
EUROCARE	European cancer registries study on cancer patients' survival and care

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	5
2.1	Objetivos específicos	5
3	REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1	Epidemiologia do Tumor de Wilms	6
3.2	Tratamento do Tumor de Wilms	8
3.3	Características morfológicas	9
3.3.1	Componente Epitelial	11
3.3.2.	Componente Estromal	11
3.3.3	Componente Blastematoso	11
3.3.4	Restos Nefrogênicos	12
3.4	Genética	15
3.4.1	WT1	20
3.5	Desenvolvimento renal e Tumor de Wilms	26
3.5.1	Via de sinalização celular WNT	30
3.6	Análise da expressão gênica	32
3.6.1	Métodos para Expressão Diferencial	33
3.6.1.3	cDNA <i>Microarray</i>	35
3.7	Análise da expressão gênica em Tumores de Wilms	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	Comitê de Ética	39

4.2	Seleção das Amostras	39
4.3	Microdissecção das Amostras	41
4.3.1	Microdissecção Manual	42
4.3.2	Microdissecção a <i>Laser</i>	44
4.4	Extração de RNA	45
4.4.1	Avaliação dos RNAs	46
4.5	Amplificação de RNA	48
4.5.1	Avaliação da qualidade do RNA amplificado	50
4.6	Desenho Experimental	51
4.7	Marcação	52
4.8	Hibridização	52
4.9	Captura das imagens e quantificação do sinal	53
4.10	Lâmina 4.8K002	54
4.11	Pré-análise das lâminas hibridizadas	55
4.11.1	Dendograma	56
4.11.2	MM Plot	56
4.11.3	MA, Log X Log e BoxPlot	57
4.11.4	Normalização das lâminas	58
4.12	Análise matemática	60
4.12	Avaliação da expressão das 4 isoformas de WT1	61
5	RESULTADOS	64
5.1	Genes diferencialmente expressos	
	pelo gráfico de Volcano	64

5.1.1	Classificação dos Genes Diferencialmente expressos pelo <i>Gene Ontology</i>	67
5.2	Perfil molecular dos componentes de TW	68
5.2.1	Classificação dos Genes Diferencialmente Expressos Segundo as Vias (KEGG)	73
5.2.1.1	Via WNT	74
5.3	Caracterização da expressão da isoformas de WT1	76
6	DISCUSSÃO	78
7	CONCLUSÕES	92
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

ANEXOS

- Anexo 1** - Gel de Agarose 1%
- Anexo 2** - Amplificação de RNA
- Anexo 3** - Extração de RNA por TRIzol
- Anexo 4** - Extração de RNA por Cloreto de Césio
- Anexo 5** - Protocolos Hibridização em Lâmina de Vidro
- Anexo 6** - Soluções usadas nos experimentos
- Anexo 7** - Genes diferencialmente expressos entre os componentes
- Anexo 8** - *Gene Ontology*
- Anexo 9** - Dendograma

1 INTRODUÇÃO

Em países desenvolvidos, o câncer pediátrico é a segunda causa de óbito entre 0 e 14 anos, logo após a morte por acidentes (LITTLE 1999). Nos países em desenvolvimento, o câncer está se destacando como a mais importante causa de óbito, devido provavelmente às atuais políticas de prevenção de outras doenças infantis. Segundo dados de 1999 do Ministério da Saúde, o câncer representa a 5ª causa de óbito em crianças de 1 a 19 anos no Brasil (Ministério da Saúde 2001). Apesar disso, é um evento raro, correspondendo a aproximadamente 1% da incidência de todos os cânceres (RIES et al. 1999).

Nas três últimas décadas, observou-se um avanço na terapêutica anti-câncer resultando em aumento no número de crianças que atingiram a cura e chegaram à vida adulta (YOUNG et al. 1986). A mortalidade das crianças acometidas pelo câncer (leucemias, linfomas e tumores sólidos), apresentou declínio importante a partir de 1960, em áreas desenvolvidas como América do Norte, Europa Central, Japão e Oceania. Declínios menos evidentes foram observados no leste Europeu, América do Sul e outras áreas pouco desenvolvidas (LEVI et al. 1992; LEVI et al. 1995; MARTOS e OLSEN 1993).

O câncer pediátrico (tumores embrionários) é estudado separadamente do câncer de adulto por apresentar diferenças importantes em relação ao local primário de acometimento, origem histológica e

comportamento clínico (SMITH e REIS 2002). Originam-se de células primordiais que sofreram mutações espontâneas e não decorrentes de mutações adquiridas por ação ambiental, como ocorre com a maior parte das neoplasias de adultos. O aspecto anátomo-patológico lembra fases do desenvolvimento do tecido de origem. Derivam de tecidos imaturos e possuem capacidade de diferenciação heteróloga (DEHNER 1998). Dentre os tumores sólidos embrionários, os mais comumente encontrados são os retinoblastomas, hepatoblastomas, neuroblastomas, tumores de Wilms ou nefroblastomas, tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET) ou sarcoma de Ewing e os rhabdomyosarcomas. Dentre esses, os tumores renais representam 5 a 10% (LITTLE 1999), sendo que entre os tumores renais que ocorrem na criança, aproximadamente 95% são tumores de Wilms (TWs).

O tumor de Wilms (TW) é um dos grandes exemplos de sucesso terapêutico obtido por meio da atuação de equipes multidisciplinares. O tratamento é sempre multidisciplinar, com cirurgia, quimioterapia e radioterapia em alguns casos selecionados. Até o momento, os fatores prognósticos considerados importantes para a decisão terapêutica são o estadiamento e o tipo histológico. Atualmente são curadas cerca de 90% das crianças e o objetivo atual é manter as altas taxas de sobrevida com menor morbidade, identificando marcadores de bom prognóstico que permitam reduzir a agressividade do tratamento e também identificar os 10% referentes aos casos de pior prognóstico para intensificar o tratamento aumentando ainda mais as taxas de sobrevida. Ainda é necessário ultrapassar um dos desafios atuais no estudo do TW, que tem sido entender

sua tumorigênese, uma vez que mostra grande complexidade. Alguns eventos histológicos e biológicos foram sugeridos como capazes de desencadear ou manter a tumorigênese do TW, entretanto as etapas desse mecanismo ainda são desconhecidas. Um melhor entendimento da patogênese do TW requer estudos que correlacionem os achados clínico-epidemiológicos, com seus aspectos histológicos e moleculares, pois existem evidências de que essas variáveis podem estar intimamente relacionadas (DOME e COPPES 2000).

O TW é caracterizado por sua diversidade histológica. Classicamente, é descrito como um tumor embrionário trifásico, no qual as células blastematosas, estromais (ou mesenquimais) e epiteliais estão presentes em proporções variáveis com grande diversidade de arranjo arquitetural e graus de diferenciação. A morfologia das células tumorais desses diferentes tipos celulares parece imitar as diversas fases do desenvolvimento do rim durante a embriogênese. Essa semelhança foi notada pela primeira vez por NICHOLSON em 1931 e mais tarde por WILLIS em 1962 e apesar dessa semelhança morfológica ter sido notada há muito tempo, poucos trabalhos (DAVIES et al. 1999; LI et al. 2002) descreveram genes envolvidos na nefrogênese que estejam implicados na patogênese dos TWs (HASTIE 1994).

Nesse contexto, o conhecimento das alterações moleculares nos três componentes do TW pode levar ao desenvolvimento de uma melhor compreensão do processo de tumorigênese e progressão do tumor. Além disso a caracterização molecular dos 3 componentes pode identificar novos

marcadores de prognóstico mais sensíveis e específicos, favorecendo assim uma individualização do tratamento e conseqüentemente a diminuição dos efeitos laterais e a melhora da sobrevida dos portadores de TW.

2 OBJETIVO

Caracterizar os aspectos moleculares dos diferentes componentes dos TWs.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1 Analisar as diferentes isoformas do gene WT1 nos 3 componentes do TW, no rim normal e em um *pool* de rins fetais através de RT-PCR.

2.1.2 Analisar a expressão global dos diferentes componentes do TW por cDNA *microarray*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 EPIDEMIOLOGIA DO TUMOR DE WILMS

Os TWs são os tumores renais mais freqüentes na infância, com incidência de 7 casos por milhão de crianças até 15 anos de idade (LITTLE 1999). No passado, a incidência de TW era considerada estável, independente de raça, sexo ou área geográfica (INNIS 1973). Mais recentemente, notou-se variações geográfica e temporal, com maior incidência na Escandinávia, Nigéria e Brasil, e menor no Japão, Índia e Cingapura (PARKIN et al. 1998). Um estudo caso-controle realizado no Brasil, encontrou forte associação entre crianças portadoras de TWs de mães que ingeriram analgésicos que contém dipirona durante a gravidez (FRANCO et al. 1991). Esse medicamento foi banido em países europeus e da América do Norte e continuou sendo usado no Brasil, sugerindo que pode haver uma relação com o aumento de incidência dessa doença no país (SHARPE e FRANCO 1996). Parece também haver associação entre crianças portadoras de TWs e a exposição dos pais a pesticidas, sendo esse fator importante para o aumento da incidência de TWs no Brasil (SHARPE et al. 1994).

O pico de incidência ocorre entre o segundo e terceiro anos de vida, sendo que 75% das crianças que desenvolvem a neoplasia são menores de 5 anos. Pacientes com TW bilateral tendem a ser mais novos que aqueles

com tumor unilateral, com média de 44 meses nos casos unilaterais e de 32 meses nos casos bilaterais, sendo a idade média de apresentação do tumor de 29,5 meses para os meninos e de 32,6 meses para as meninas (BRESLOW et al. 1996; DOME e COPPES 2002). Os resultados do primeiro estudo do Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento do Tumor de Wilms (GCBTTW), mostraram que a idade média de acometimento no país é de 36 meses para os meninos e de 46 meses para as meninas, indicando que as crianças do sexo masculino apresentam uma tendência de desenvolver a doença mais precocemente. Há relatos na literatura de que existe um pequeno desvio de incidência para o sexo feminino (FRANCO et al. 1991).

Dados do EUROCORE demonstraram uma sobrevida de 83% em cinco anos, havendo uma melhora no período de 1978 a 1992 ($p=0,002$), sendo que o risco de óbito diminuiu mais significativamente após 1985 (PLESKO et al. 2001). No registro de Piemonte na Itália, a sobrevida das crianças portadoras de TW aumentou de 41,7% durante o período entre 1970 e 1974 para 86,7% no período entre 1985 e 1989, e posteriormente, houve uma diminuição estatisticamente não significativa para 65,7% no período 1990 a 1994 (PASTORE et al. 2001). Dados registrados pelo SEER demonstraram acréscimo da sobrevida durante os períodos 1975 a 1984 (81% em 5 anos) e 1985 a 1994 (92% em 5 anos) (RIES et al. 1999).

Os registros do Hospital do Câncer AC Camargo mostram que a frequência relativa de pacientes portadores de TW, aumentou entre 1985 e 1989 e a mortalidade diminuiu entre 1980 e 1984, ambos mantendo-se

constantes a partir desses anos com cerca de 76% de sobrevida livre de doença em cinco anos (DE CAMARGO 2003).

3.2 TRATAMENTO DOS TUMORES DE WILMS

FARBER (1966) foi pioneiro em demonstrar a efetividade do quimioterápico actinomicina nas crianças portadoras de TW.

A heterogeneidade morfológica tem sido usada por alguns protocolos de tratamento como tendo significância prognóstica. Tumores mais diferenciados, com predomínio de componente epitelial e estromal, apresentam um melhor prognóstico, porém não são quimiossensíveis, não apresentando resposta à quimioterapia pré-operatória. Esses tumores são menos agressivos e como não respondem bem à quimioterapia, não existe a necessidade de tratar com agentes mais tóxicos (WEIRICH et al. 2001).

Os dois grandes grupos cooperativos que estudam TWs são o NWTSG (National Wilms Tumor Study Group) que preconiza a nefrectomia como opção de terapêutica inicial e administração da quimioterapia adjuvante; e a SIOP (Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique), cuja linha terapêutica aconselha a quimioterapia pré-operatória, pois esse procedimento pode facilitar a cirurgia, reduzindo o tamanho dos tumores.

O atual protocolo de estudo e ensaio clínico SIOP 2001 baseia-se na histologia e no estadiamento tumoral após quimioterapia pré-operatória (Tabela 1).

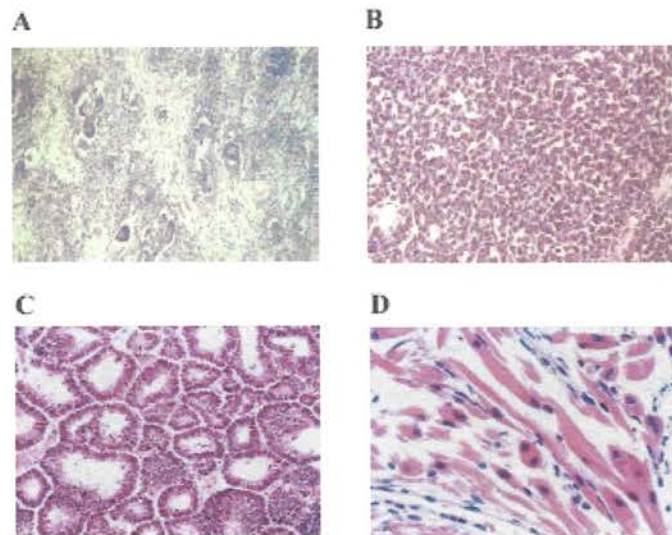
Tabela 1 – Estadiamento dos tumores de Wilms.

Estadio I	Tumor restrito ao rim, completamente ressecado
Estadio II	Tumor se estende além do rim, porém completamente ressecado
Estadio III	Tumor se estende além do rim, com ressecção incompleta, mas restrito ao abdome
Estadio IV	Disseminação hematogênica / metástase a distância
Estadio V	Tumor bilateral

3.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Dentre os tumores embrionários, os TWs são os que mostram melhor correlação morfológica com as fases desenvolvimento embrionário. TW é uma neoplasia originária de células do blastema metanéfrico primitivo, formador do rim no embrião, que por sua vez são oriundas do mesenquima metanéfrico.

Histologicamente, os TWs são tumores complexos, constituídos de três componentes, que podem estar em proporções variáveis: componente blastematoso, componente estromal (ou mesenquimal) e componente epitelial (BECKWITH 1983 e 1993) (Figura 1).



Legenda: **A:** Tumor de Wilms trifásico. **B:** Componente blastematoso. **C:** Componente epitelial. **D:** Componente estromal com diferenciação rabdomioblástica.

Figura 1 - Tumor de Wilms.

Os arranjos observados envolvendo os três componentes parecem recapitular estágios diferentes da embriogênese renal normal e estão presentes em proporções variáveis com diversidade de arranjo arquitetural e graus de diferenciação. Normalmente, um dos componentes é predominante, o que pode influenciar o prognóstico. Os TWs trifásicos clássicos são compostos por células blastematosas, epiteliais e estromais. Se um dos componentes predomina sobre os outros em mais de dois terços (65%) da peça tumoral, esse tumor é designado como predominante desse componente. Alguns autores sugerem que o padrão predominante pode predizer o tipo de restos nefrogênicos ao qual o tumor está associado (BECKWITH 1990).

3.3.1 Componente Epitelial

Os TWs com predomínio do componente epitelial são menos agressivos. Mais de 80% desses tumores são de estadio I e apenas 5,7% deles são de estadio III ou IV (BECKWITH et al. 1996). Esses tumores são mais resistentes à quimioterapia (CHATTEN 1978). Os elementos epiteliais consistem de túbulos lineados por células colunares com núcleos hipercromáticos, túbulos e estruturas glomerulares que lembram aquelas do rim normal. Epitélio mucinoso e escamoso, estruturas neurais e células neuroendócrinas também podem estar presentes (JENKINS 1991).

3.3.2. Componente Estromal

O TW com predomínio do componente estromal consiste principalmente de células fusiformes indiferenciadas imersas em matriz mixóide. Numerosos outros tipos celulares mesenquimais podem ser encontrados como células musculares lisas ou estriadas, adiposas, cartilaginosas, ósseas e osteóide. O estroma pode ser encontrado focalmente no meio do componente blastematoso. Alguns tumores exibem rabdomiogênese intensa, sendo denominados de tipo rabdomiomatoso. São freqüentemente bilaterais e mais comumente encontrados em crianças mais novas (WIGGER 1976; SABA et al. 1998).

3.3.3 Componente Blastematoso

O TW com predominância do componente blastematoso é mais agressivo que os outros dois tipos. É composto de células pequenas com

núcleos irregulares e pequenos, citoplasma escasso, com numerosas figuras mitóticas e corpos apoptóticos. Ocasionalmente aparecem rosetas (como no neuroblastoma). O padrão de crescimento pode ser do tipo difuso, serpentina, nodular ou basalóide. O tipo blastematoso difuso, ao contrário de outros subtipos de TW que não invadem a borda, tem um padrão de crescimento infiltrativo resultando em poucos tumores classificados como sendo de estadios I e mais de 75% deles como estadios III e IV (BECKWITH 1996). Entretanto, o blastema é mais responsivo à quimioterapia do que os outros componentes e em tumores tratados, as áreas blastematosas são freqüentemente necróticas com poucas células reconhecíveis. No protocolo atual da SIOP, que preconiza quimioterapia antes da cirurgia (Tabela 2), se na peça tumoral houver predomínio do componente blastematoso, o tumor é considerado de alto risco, pois demonstra que o componente é resistente a quimioterapia.

3.3.4 Restos Nefrogênicos

Os restos nefrogênicos são células do blastema metanéfrico que persistiram após o nascimento (BECKWITH 1998) e são reconhecidos como possíveis lesões precursoras dos TW, uma vez que são encontrados nas adjacências dos rins em cerca de 40% das crianças com TWs esporádicos.

A zona nefrogênica dos rins deriva do mesênquima metanéfrico, que ao ser induzido dá origem ao blastema e, a partir desse, as células do néfron se desenvolvem. É como se a célula que dá origem ao TW fosse a mesma do blastema metanéfrico persistente. As evidências são baseadas em

similaridade estrutural entre o desenvolvimento do rim e o TW, onde o estroma tumoral tem as mesmas características do rim em desenvolvimento, e portanto, passam pelo estágio de *stem cell* (MIERAU et al. 1987).

Os restos nefrogênicos consistem de focos de células embrionárias renais que persistiram após o nascimento, e eventualmente, podem dar origem aos TWs. Conforme a localização morfológica, os restos nefrogênicos são divididos em tipos perilobares e intralobares. Consistem de células blastematosas permeadas por elementos epiteliais e mesenquimais. Podem ser dormentes, esclerosantes ou hiperplásicos, sendo que todos esses tipos podem aparecer juntos. Eles são encontrados em até 1% nos rins de recém-nascidos e sugere-se que sofram regressão ou terminam sua diferenciação ainda na infância. Os restos nefrogênicos que persistem podem regredir para um tecido fibroso ou evoluir para TW e, como citado anteriormente, são associados a aproximadamente 40% dos casos de TW esporádicos e em 100% dos pacientes com TW bilaterais (BECKWITH 1990; BECKWITH 1993).

O Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento de Tumores de Wilms segue o protocolo estabelecido pela SIOP em 2001 que considera, com base na histologia da peça tumoral após tratamento prévio de quimioterapia, para fins terapêuticos, três tipos principais de TWs, como mostrado na Tabela 2.

Fundação Antonio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

Tabela 2 - Classificação histológica dos TW segundo os a SIOP.

SIOP 2001 – Classificação dos Tumores Renais da Infância

A. Para casos com quimioterapia prévia

I. Tumores de baixo risco

Nefroblastoma mesoblástico

Nefroblastoma cístico parcialmente diferenciado

Nefroblastoma completamente necrótico

II. Tumores de risco intermediário

Nefroblastoma tipo misto

Nefroblastoma com predomínio do epitelial

Nefroblastoma com predomínio do estromal

Nefroblastoma regressivo

Nefroblastoma com anaplasia focal

III. Tumores de alto risco

Nefroblastoma com predomínio do blastematoso

Nefroblastoma com anaplasia difusa

Sarcoma de células claras

Tumor rabdóide do rim

B. Para casos operados sem quimioterapia prévia

I. Tumores de baixo risco

Nefroma mesoblástico

Nefroblastoma cístico parcialmente diferenciado

II. Tumores de risco intermediário

Nefroblastoma não anaplásico e suas variantes

Nefroblastoma com anaplasia focal

III. Tumores de alto risco

Nefroblastoma com anaplasia difusa

Sarcoma de células claras do rim

Tumor rabdóide do rim

3.4 GENÉTICA

A maioria dos TWs são esporádicos, resultado de mutações somáticas, restritas ao tecido tumoral. Existe uma pequena porcentagem que é consequência de mutações na linhagem germinativa, podendo ser mutação herdada ou *de novo*. Menos de 10% dos TW estão associados a anomalias congênitas e síndromes, sendo 5 a 10% bilaterais ou multifocais e 1 a 2% associados a história familiar, relacionados à herança autossômica

dominante com penetrância e expressividade variáveis (DOME e COPPES 2002).

Três síndromes estão associadas com uma maior probabilidade de desenvolvimento de TWs: a síndrome de Denys-Drash (SDD), caracterizada por pseudohermafroditismo, nefropatia (esclerose mesangial progressiva), sendo que há aparecimento de TW em 30% dos pacientes (DRASH 1970); a síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW), caracterizada por hemihipertrofia, onfalocele, visceromegalia e predisposição a múltiplos tumores (BECKWITH 1969; WIEDEMANN 1964); e síndrome WAGR caracterizada por TW, aniridia, mal-formações genito-urinárias e retardo mental (ANDERSEN et al. 1978, JUNIEN et al. 1980, NARAHARA et al. 1984) (revisão em HIROSE 1999). Pacientes com essas síndromes têm a tendência de desenvolver múltiplos tumores, tanto em ambos os rins (casos bilaterais) como vários tumores no mesmo rim (doença multifocal).

Estudos de pacientes sindrômicos com predisposição a desenvolver TW foram cruciais na identificação dos fatores genéticos envolvidos na tumorigênese do TW, como foi o caso do gene WT1 (Wilms tumor factor 1), que foi sugerido como sendo fator crucial na SBW. Essas síndromes podem conter genes diretamente relacionados à tumorigênese desse tumor ou podem estar atuando em vias bioquímicas nas quais WT1 pode participar.

Algumas evidências observadas em casos familiares de TW, permitiram que KNUDSON sugerisse em 1971 que estes tumores seriam consequência da perda de função de certos genes supressores de tumores e que se encaixariam no modelo de *two hits*, modelo sugerido anteriormente

Fundação Antonio Prudente

Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

para explicar a tumorigênese dos retinoblastomas (KNUDSON e STRONG 1972).

O modelo de KNUDSON (1971) prediz que são necessários dois eventos que seriam responsáveis pela inativação dos dois alelos de um mesmo gene. A inativação desse único gene seria responsável pelo surgimento do tumor. Nos casos de tumores hereditários, um desses eventos deveria ser oriundo de uma mutação germinativa (herdada ou *de novo*). Seguindo esse mesmo modelo proposto para os retinoblastomas, KNUDSON e STRONG (1972) descreveram que os TWs se desenvolveriam em consequência de dois eventos mutacionais em ambos os alelos do mesmo gene, inativando-o e suprimindo sua função de supressor de tumor, levando à formação tumoral. Postularam também que o defeito genético responsável pelas síndromes com TW associados, poderia ter a mesma base genética dos tumores esporádicos e especularam que poderia haver alguma relação com o blastema nodular presente em alguns fetos, uma vez que as comparações dos casos familiares, bilaterais, unilaterais e esporádicos revelaram que os casos bilaterais e familiares tem uma média de idade ao diagnóstico mais precoce, além da incidência de bilateralidade maior, o que seria consistente com a definição de uma doença autossômica dominante (KNUDSON 1971; KNUDSON e STRONG 1972).

Entretanto, o perfil epidemiológico dos TW, com menos casos familiares que o esperado para suportar esse modelo, sugeriu que o mecanismo envolvido na tumorigênese não é tão simples como a do retinoblastoma, e mais recentemente, novos modelos sugeriram o

envolvimento de vários genes na sua tumorigênese, indicando a existência de outros mecanismos, que talvez possam complementar a hipótese de Knudson (GRUNDY et al. 1995; PRITCHARD-JONES e HAWKINS 1997). Apesar da hipótese de Knudson não ser aplicável a todos os casos de TWs, este estudo permitiu que outros grupos (CALL et al. 1990; GESSLER et al. 1992) chegassem ao gene WT1 como um gene envolvido na tumorigênese do TW, o qual é até hoje, o único comprovadamente envolvido.

WT1 está localizado no cromossomo 11 na região 11p13 e codifica um fator de transcrição importante para o desenvolvimento do trato genito-urinário. Ele foi identificado pela primeira vez em pacientes com a síndrome WAGR, que apresentavam deleções no cromossomo 11. Apesar da estreita relação entre TW e WT1 (ZHUANG et al. 1997), ao revisar todos os casos relatados na literatura, que somavam mais de 500 TW esporádicos, foi detectado mutação em apenas 5 a 10% dos casos. A maioria das mutações constitucionais de WT1 são encontradas em crianças com TW unilateral sem associação com anormalidades do trato genito-urinário, dificultando a identificação de indivíduos que carregam mutações germinativas de WT1. Apesar disso, dois fatores parecem estar associadas com a mutação germinativa de WT1: idade precoce de acometimento e TW com predomínio de componente estromal (SCHUMACHER et al. 1997).

Vários estudos usaram técnicas de citogenética, como estudos alélicos e hibridação genômica comparativa e sugeriram que algumas anormalidades genéticas estão associadas aos TW, incluindo trissomia dos cromossomos 8 e 12, e ganhos ou perdas de partes cromossômicas tais

como: regiões 11p13 (onde está localizado o WT1), 11p15, 16q, 1p e 7p (MANNENS et al. 1988; KANEKO et al. 1991; SLATER e MANNENS 1992; STEENMAN et al. 1997). É possível que esses *loci* tenham outros genes importantes para o desenvolvimento do TW, que talvez possam agir *up-* ou *downstream* ao WT1.

Dentre as regiões já pesquisadas citogeneticamente, o 17q (RAHMAN et al. 1997) foi descrito como estando envolvido numa história familiar de TWs, mas nenhum gene específico foi isolado. A perda de 16q, encontrado em aproximadamente 20% dos TWs, está relacionada a pior prognóstico (GRUNDY et al. 1995; KLAMT et al. 1998; CHARLES et al. 1998).

Alguns estudos moleculares associaram pior prognóstico e/ou recorrência com a super-expressão de BCL-2 (TANAKA et al. 1999), mutação de WT1 (SKOTNICKA-KLONOWICZ et al. 1999; GHANEM et al. 2000), aumento de expressão de topoisomerase-II- α e survivina (TAKAHASHI et al. 2002), sendo que ainda são necessários estudos para que esses dados sejam comprovados.

Apesar de existirem casos de TW na síndrome de Li-Fraumeni, na qual mutações de p53 estão associadas, mutações nesse gene são observadas em menos de 5% dos TWs. Estudos têm demonstrado que a mutação de p53 está relacionada com histologia desfavorável e pior prognóstico, uma vez que 75% dos tumores com anaplasia apresentam mutação nesse gene. Por imunistoquímica, foi verificado que a proteína está restrita às células anaplásicas, indicando que mutações em p53 estão mais relacionadas com o processo de progressão do tumor do que com seu

aparecimento (BIRCH et al. 2001; BENIERS et al. 2001; CHEAH et al. 1996). Em um trabalho realizado pelos departamentos de Patologia e Pediatria do Hospital do Câncer, foram analisados por imunohistoquímica 97 casos de TWs. Esse estudo mostrou que a expressão de p53 parece estar associada com recaída, apesar de não ter havido significância estatística (39 vs.17%; $p = 0,06$) mas não com anaplasia, como observado no estudo anterior. Pacientes em que não foi detectada a expressão de p53, apenas 5% tiveram doença metastática comparado com 31% que tiveram p53 positiva ($p = 0.038$) (SREDNI et al. 2001).

Outro locus que aparentemente tem um gene ou genes importantes para a tumorigênese dos TWs é o 11p15, encontrado deletado em apenas alguns casos. Alterações desse *locus* são mais relacionadas a pacientes com a SBW (PING et al. 1989; STEENMAN et al. 2000).

Existem outros genes relacionados aos TWs, mas ainda não foram isolados. Como histologicamente o TW imita a nefrogênese normal (YASHIMA et al. 1998), os genes envolvidos no seu aparecimento podem também estar envolvidos no processo de diferenciação do rim.

3.4.1 WT1 (OMIM: 607102)

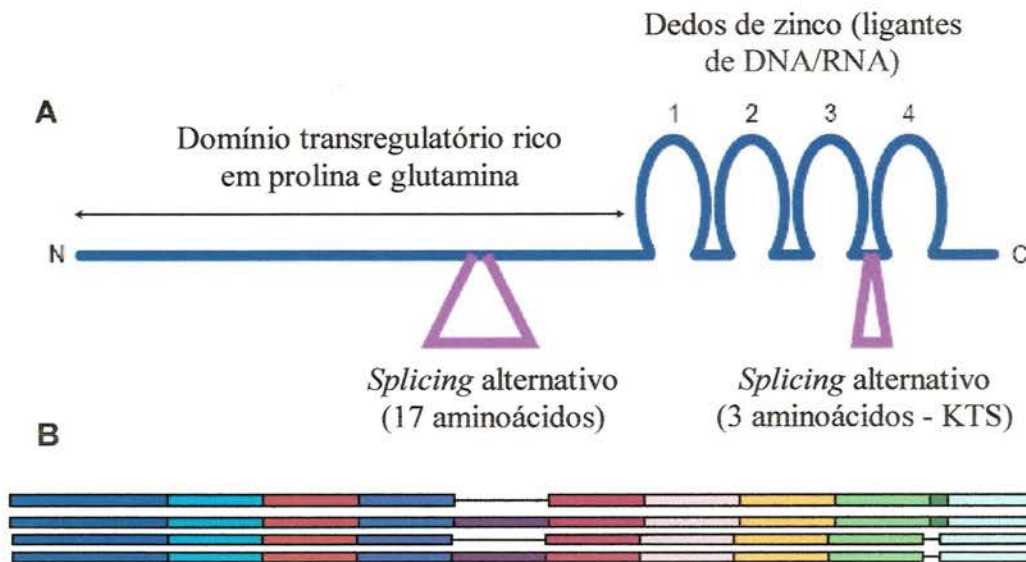
Em 1990, CALL et al. isolaram e sequenciaram o gene WT1, caracterizando a seqüência como tendo quatro domínios de dedos de zinco e uma região rica em prolina e glutamina. O gene também mostra seqüências de alta homologia com dois polipeptídios reguladores de fatores de crescimento: EGR1 (OMIM: 128990) e EGR2 (OMIM: 129010).

Por hibridização *in situ* do RNA, foi descrito que o WT1 é expresso no mesênquima condensado, na vesicular renal, no epitélio glomerular do rim em desenvolvimento e no epitélio glomerular maduro (podócitos). Além do rim, sua expressão também é encontrada nas gônadas fetais e no mesotélio, indicando que alterações germinativas desse gene e da proteína estão associadas a problemas de desenvolvimento do trato genito-urinário (PRITCHARD-JONES et al. 1990). É também expresso em células progenitoras hematopoéticas assim como em algumas células leucêmicas (ELLISEN et al. 2001).

Por apresentar o domínio de dedos de zinco (*zinc finger*), o WT1 tem a capacidade de se ligar ao DNA, agindo como fator de transcrição. Conforme o tipo e o momento celular, o WT1 pode ativar ou reprimir a expressão de uma série de outros genes, tendo um papel importante durante a diferenciação do rim.

Para codificação de suas proteínas nucleares, o WT1 tem múltiplas regiões de iniciação da transcrição, edição de RNA de um único nucleotídeo, além de dois splicing alternativos (HABER e BUCKLER 1992; SHARMA et al. 1994; BRUENING e PELLETIER 1996; SCHARNHORST et al. 1999). São consideradas quatro isoformas principais desse gene, que são resultantes da inserção de 3 aminoácidos (KTS) entre os dedos de zinco 3 e 4, e da inserção de um *splicing* alternativo de 17 aminoácidos, segmento codificado pelo éxon 5 (BROWN et al. 2001) (Figura 2). A conservação observada na estrutura gênica e nos níveis relativos das 4 variantes do gene WT1 sugere que cada molécula de RNA mensageiro e sua quantidade

relativa na célula são pontos importantes para que o gene exerça sua função normal. Além disso, a razão entre essas quatro isoformas parecem ser espacialmente e temporalmente estáveis, sugerindo que todas são necessárias simultaneamente e que há interação entre elas (HABER e BUCKLER 1992).



Fonte: Adaptado de BROWN et al. (2001).

Legenda: A: Estrutura do WT1. As proteínas codificadas pelo WT1 têm um domínio trans-regulatório rico em prolina e glutamina na porção amino-terminal e quatro dedos de zinco no domínio de ligação ao DNA/RNA na porção carboxi-terminal. Existem dois *splicing* alternativos: um que insere 17 aminoácidos no domínio trans-regulatório e outro que insere três aminoácidos (KTS) entre o terceiro e o quarto dedos de zinco. N: Porção amino-terminal e C: porção carboxi-terminal. B: Desenho ilustrativo das 4 principais isoformas do WT1. Em ordem: Variante A, variante B, variante C e variante D.

Figura 2 - Estrutura do WT1.

ENGLERT et al. (1995), ao analisarem a expressão de proteínas selvagem e mutante do WT1 em linhagens celulares, observaram que havia diferenças na localização subnuclear das mesmas. A isoforma WT1(-KTS),

com maior afinidade ao DNA, tinha localização difusa pelo núcleo. Já a isoforma WT1(+KTS), com uma afinidade diminuída de ligação ao DNA, assim como algumas proteínas mutantes que tiveram perda do domínio de dedos de zinco, mostraram um padrão de ligação salpicado pelo núcleo. Esses achados sugerem que as diferentes isoformas do WT1 e as proteínas mutantes se ligam a seqüências genômicas distintas e específicas e que as diferentes isoformas do WT1, por ter localizações distintas na célula, podem estar agindo tanto no controle da transcrição quanto nos níveis pós-transcricionais (LAITY et al. 2000).

Devido a homologia com o EGR1, tem se estudado o WT1 como repressor da expressão de fatores indutores de crescimento. Ensaio *in vitro* sugerem outros genes como alvo do WT1, incluindo alguns fatores de transcrição (Pax2, EGR1, c-myc, c-myb, MyoD, Dax1 e o próprio WT1), fatores de crescimento (IGF2, PDGF- α , CSF-1, CTGF, anfiregulina, inibina- α , TGF β 1, midkina), receptores de fatores de crescimento (EGFR, IR, IGF1R, RAR α), genes de matriz extracelular (sindecana), genes de sobrevivência celular (Bcl-2), moléculas sinalizadoras (Gai-2), entre outros genes (novH, ODC, hTERT, trombospondina, E-caderina). Apesar de ensaios *in vitro* em linhagens celulares terem sugerido e/ou validado todos esses genes como alvo do WT1 (DEJONG et al. 1999; HOSONO et al. 1999; KIM et al. 1999; LEE et al. 1999; LITTLE 1999; OH et al. 1999; STANHOPE-BAKER e WILLIAMS 2000), o único estudo publicado analisando a expressão gênica através de cDNA *microarray* em TW com e sem mutação de WT1, encontrou diferença significativa de expressão apenas no gene c-

myc (UDTHA et al. 2003), sugerindo serem necessárias a verificação *in vivo* dos genes previamente sugeridos como sendo alvo do WT1, e a investigação das funções desses genes no desenvolvimento e manutenção do rim normal. Na tentativa de validar os genes descritos na literatura como sendo regulados pelo WT1 em linhagens celulares SIM et al (2002) utilizaram cDNA *microarray* e *Northern blot*. Nesse estudo, esses pesquisadores não conseguiram validar nenhum desses, mas verificaram que os níveis de expressão de Wnt4 diminuíam significativamente na presença do WT1 mutante, indicando que o WT1 regula positivamente o Wnt4 de forma indireta. Wnt4 faz parte da família de genes WNTs, que codificam glicoproteínas secretadas ricas em cisteína, com função de fator de sinalização extracelular (OMIM – 603490), sugerindo que talvez a via de sinalização celular WNT esteja envolvida na tumorigênese do TW.

No desenvolvimento normal do rim, o padrão de expressão do WT1 é bastante complexo. Tem uma expressão aumentada na transição mesênquima-epitélio no mesênquima condensado, quando as vesículas renais e o “S” renal são formados, sendo que a expressão é mais forte na porção proximal do “S”, cujas células dessa região darão origem aos podócitos glomerulares, onde a proteína também é expressa (MROWKA e SCHEDL 2000).

Mutações de WT1 são relacionadas a problemas de desenvolvimento como a síndrome WAGR (TW, aniridia, anomalias genitais e retardo mental), síndrome de Denys-Drash (esclerose mesangial difusa, hipertensão severa, síndrome nefrótica resistente a esteróide que rapidamente progride para

doença renal terminal, pseudohermafroditismo masculino e, como descrito anteriormente, risco aumentado de desenvolvimento de TW) e síndrome de Frasier (síndrome nefrótica progressiva, alterações glomerulares pequenas ou glomeruloesclerose focal e hermafroditismo completo em meninos, apesar de o desenvolvimento gonadal das meninas ser normal, sem aumento da incidência de TW) (MROWKA e SCHEDL 2000).

Apesar da proteína do WT1 ter essa relação estreita com a nefrogênese e estar associada com o desenvolvimento do trato genito-urinário como um todo, mutação em WT1 é encontrada em somente 10% dos TW (LITTLE e WELLS 1997), sugerindo que talvez exista outra alteração em nível transcricional entre o balanço e/ou presença e ausência das diferentes isoformas.

Apesar de originalmente o WT1 ter sido identificado como um gene supressor de tumores em TWs, tanto a proteína selvagem como a mutante, são encontradas super-expressas em várias desordens hematológicas, como a leucemia aguda, leucemia mielóide crônica, síndrome mielodisplásica e em outros tumores sólidos, como câncer de mama, mesotelioma maligno, carcinoma de células renais entre outros. Essas evidências sugerem um papel distinto para o WT1, pois se fosse supressor de tumor, a proteína deveria ser encontrada em baixos níveis ou nem estar sendo expressa (LOEB e SUKUMAR 2002).

Por ter expressão tecido-específico em adultos e ser encontrado em super-expressão em alguns tipos tumorais e desordens hematológicas,

alguns estudos sugerem que o WT1 pode ser usado como alvo terapêutico (ROSENFELD et al. 2003).

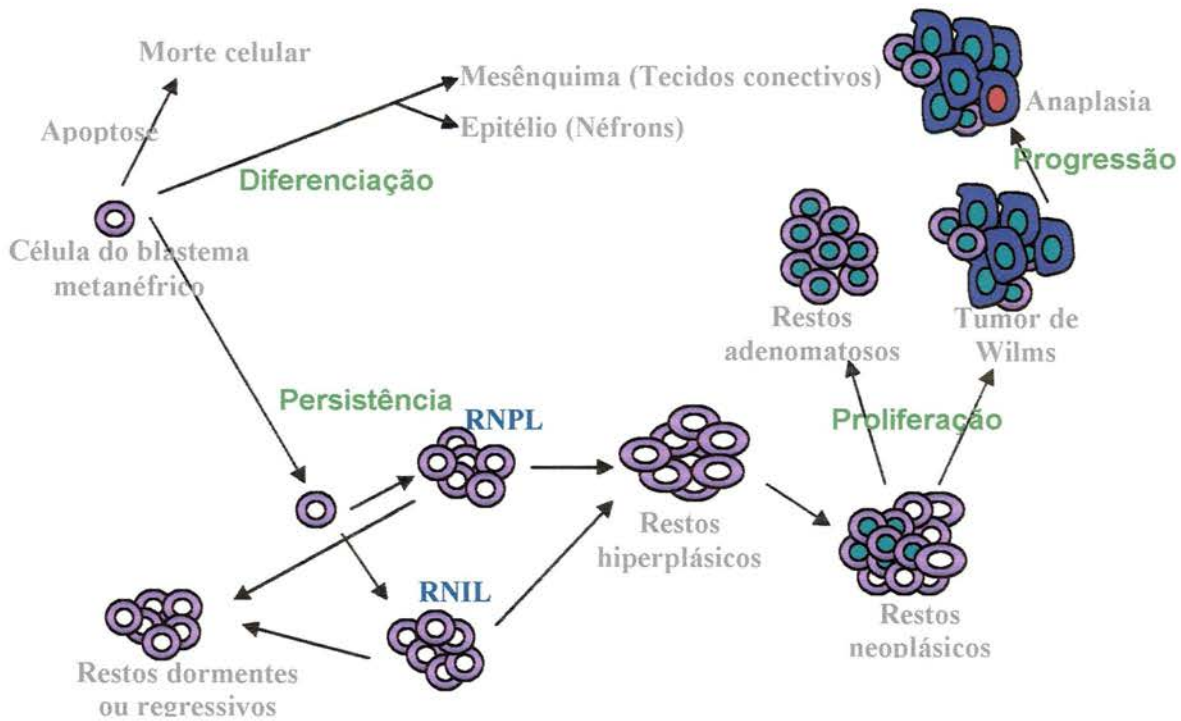
Mesmo sendo extensivamente estudado, a forma de ação do WT1 ainda não está totalmente caracterizada e existem muitas controvérsias sobre o seu verdadeiro papel na célula normal e no aparecimento de TW.

3.5 DESENVOLVIMENTO RENAL E TW

O TW se origina de células do rim em desenvolvimento. O rim definitivo dos mamíferos, o metanefro, desenvolve a partir de uma interação entre o tubo uretérico (que formará o sistema de ductos coletores) e o blastema metanéfrico (que dará origem aos néfrons e ao tecido conectivo). O blastema é induzido para se diferenciar e formar tanto os componentes epiteliais (que darão origem aos néfrons) quanto os componentes estromais (que originarão o tecido conectivo) no rim, e as células que não são induzidas a sofrer diferenciação, vão para a apoptose (KOSEKI et al. 1992; HAMMERMAN 1995; KUURE et al. 2000).

Em humanos, o desenvolvimento do rim é completado na 36ª semana de gestação. Provavelmente o TW se forme devido a uma falha do blastema metanéfrico de seguir as vias de desenvolvimento normais, fazendo com que as mesmas persistam após o nascimento, sem sofrer regressão por apoptose. No entanto, o potencial de diferenciação dessas células está, ao menos parcialmente, mantido nos TWs, e pode ser visualizado na sua histologia trifásica clássica.

O desenvolvimento renal envolve diferenciação de células blastematosas em células mesenquimais e epiteliais, sugerindo que a nefrogênese envolve a interação de muitos genes evidenciando uma complexidade molecular bastante grande. Na figura 03 está esquematizado a diferenciação celular do rim e um modelo de desenvolvimento do TW.



Fonte: adaptado de CHARLES et al. (1998) e BROWN (2001).

Legenda: RNPL: Restos nefrogênicos perilobares. RNIL: Restos nefrogênicos intralobares. As setas indicam mudança de estado do tecido, decorrente provavelmente de alterações genéticas e epigenéticas.

Figura 3 - Modelo para o desenvolvimento dos TWs.

Usando cDNA *microarray*, LI et al. (2005) comparam a expressão de TWs de estádios I e II, rins normais e um *pool* de rins fetais. Encontraram que os genes com maior expressão em TWs tendem a ser mais expressos

no mesênquima ou no blastema metanéfrico, quando comparado com tecidos mais diferenciados.

Dois genes estão bem descritos na literatura como estando envolvidos tanto com TW quanto com o desenvolvimento renal, que são o IGF2 e WT1, e ainda se sugere que existam outros genes comuns a esses dois processos. O IGF2 está localizado em 11p15.5 e codifica um fator de crescimento embrionário que é normalmente expresso pelo alelo paterno e está frequentemente super-expresso em TWs, sendo que essa super-expressão está freqüentemente associada à duplicação do alelo paterno ou pela expressão do alelo materno que ocorre devido à perda de *imprinting* (DOME e COPPES 2002). A proteína parece agir como repressora ou ativadora transcricional, dependendo do contexto celular e cromossômico (OMIM). Alterações germinativas desse gene estão associadas à maior probabilidade de desenvolvimento de TW e a má-formações do trato genito-urinário, sendo considerado um dos genes reguladores do desenvolvimento desse sistema (KREIDBERG et al. 1993; MROWKA e SCHEDL 2000).

Em 1998, um terceiro gene foi descrito como tendo um padrão de expressão semelhante nos TWs e no desenvolvimento renal, que é o hTert. Aparentemente, a expressão de hTert (que faz parte do complexo da telomerase) no rim em desenvolvimento, nos restos nefrogênicos e em TWs, mostrou que o padrão de expressão apresenta semelhanças, sugerindo que o desenvolvimento normal, e a persistência dessas células embrionárias constituem um estado permissivo ao desenvolvimento da transformação maligna, e que provavelmente, exista uma falha na regulação dos genes

envolvidos nesse complexo impedindo que as células dos restos nefrogênicos entrem em apoptose e, conseqüentemente, persistam após o nascimento (YASHIMA et al. 1998).

A expressão de WT1, β -catenina e Bcl2 recapitulam o desenvolvimento epitelial do rim. A localização de β -catenina foi observado no citoplasma e na membrana citoplasmática de estruturas glomerulares epiteliais precoces e Bcl2 foi encontrado expresso no blastema condensado e nas estruturas glomerulares epiteliais, onde pouca apoptose é detectada. β -catenina nuclear foi detectada somente nos rbdomioblastos. Bcl2 é expresso nos rbdomioblastos mas não nas células blastematosas apoptóticas, sugerindo que o WT1 regula Bcl2 positivamente na via de epitelização e negativamente na via miogênica. Em TWs com mutação de WT1, o acúmulo nuclear de β -catenina e a expressão de Bcl2 estão associadas com rbdomiogênese e a desregulação de Bcl2 pode ser o mecanismo pelo qual ocorre a histogênese (perda do componente blastematoso e diferenciação muscular) (FUKUZAWA et al. 2004; SREDNI et al. 2004).

Esses dados evidenciam a complexidade molecular da nefrogênese e da tumorigênese dos TWs. No entanto, como há uma relação muito próxima entre o desenvolvimento renal e o TW, a caracterização molecular mais detalhada de um, provavelmente levará à melhor compreensão do outro.

3.5.1 Via de sinalização celular WNT

A via de sinalização celular WNT está envolvida na diferenciação celular durante a embriogênese, além de operar em combinação com outras vias de sinalização. Estudos concentram esforços na compreensão do braço canônico da via WNT, que está altamente conservado entre as espécies. Essa via envolve a β -catenina, um fator de transcrição, responsável pela ativação de vários genes durante a embriogênese. De forma mais detalhada, ao ser ativada, a β -catenina durante a embriogênese é impedida de ser degradada e é transportada ao núcleo, onde é capaz de regular a expressão de diversos genes. Esse processo acaba sendo reativado na tumorigênese de alguns tipos tumorais (WALTZER e BIENZ 1999; MOON et al. 2002).

A β -catenina é uma proteína intracelular que também está envolvida na formação de complexos protéicos responsáveis pela adesão celular. No braço canônico da via de sinalização WNT (MORIN 1999; PEIFER e POLAKIS 2000), a β -catenina forma um complexo com a família de ligantes de DNA Tcf/Lcf e APC (APC/ β -catenina/Tcf-Lcf) responsável pela regulação da transcrição de diversos genes como o c-myc (HE et al. 1998) e a ciclina D1 (TETSU e McCORMICK 1999). A regulação da fosforilação dos resíduos de serina e treonina na porção amino-terminal da proteína β -catenina é regulada pelo complexo formado pela APC e GSK3 β (MORIN 1999; PEIFER e POLAKIS 2000). Essa fosforilação resulta na ubiquitinação da β -catenina levando-a para a degradação pelos proteossomos (ABERLE et al. 1997). Alterações dessa via (mutação em qualquer dos genes do complexo ou na região amino-terminal da β -catenina) são reconhecidamente importantes no

desenvolvimento de inúmeros tumores (SPARKS et al. 1998; MIYOSHI et al. 1998), uma vez que a β -catenina volta a ativar a transcrição de genes que deveriam permanecer silenciados.

Mutações em β -catenina e o rompimento dessa via podem estar envolvidos na gênese dos TWs, uma vez que mutações de β -catenina são encontradas em cerca de 15% dos casos de TW (KOESTERS et al. 1999), sendo frequentemente encontradas no códon 45, um sítio de fosforilação funcionalmente importante (KUSAFUKA et al. 2002).

A desregulação da via WNT não ocorre unicamente por mutações de β -catenina, podendo ser consequência de mutação ou desregulação de genes *up-* ou *down-stream* a essa proteína (KOESTERS et al. 2003).

Nos TWs, aparentemente a β -catenina tem comportamento distinto nos diferentes componentes quanto a sua localização quando analisada por imunohistoquímica. KOESTERS et al. (2003) verificaram que β -catenina se localiza principalmente nas membranas das células do componente epitelial. Já no componente blastematoso apresenta um padrão de expressão na membrana celular e em algumas regiões do tumor também apresentam marcação nuclear. No componente estromal, a localização de β -catenina mostrou uma certa variação, ora marcando fortemente o citoplasma e o núcleo, ora com expressão de β -catenina negativa. Esses dados sugerem que a via de sinalização WNT está diferencialmente regulada nos componentes dos TWs.

3.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

O padrão de expressão gênica de uma célula, o transcriptoma, que representa o universo de RNAs mensageiros, determina função de uma célula, seu fenótipo e resposta a estímulos externos. Dessa forma, o estudo e caracterização do padrão de expressão gênica de uma célula ou tecido pode auxiliar na elucidação de mecanismos regulatórios e vias metabólicas que estejam ativas no tecido em questão.

Analisar o perfil de expressão gênica comparando, por exemplo, as células tumorais com correspondentes normais, pode fornecer informações importantes para a compreensão da transformação e crescimento tumoral. Além disso, a análise do perfil de expressão gênica pode ser útil na sub-classificação de tumores que tenham mesma classificação morfológica e apresentam características diferentes quanto a resposta à quimioterapia e à progressão tumoral, permitindo muitas vezes estabelecer correlações com finalidades preditivas de comportamento tumoral e resposta a quimioterapia. (HIDALGO e SALCEDO 2001). A identificação de genes com aumento de expressão no tecido neoplásico e sua diferença com relação ao tecido normal também apresentam importância prática. A expressão de genes tumores-específicos pode fornecer, ainda, informações para o desenvolvimento de terapêuticas imunológicas do câncer utilizando como alvo antígenos tumorais codificados por estes genes, como é o caso do receptor Her/neu-2 (Herceptina) para os tumores de mama (HANNA et al. 1999).

3.6.1 Métodos para Expressão Diferencial

Até há alguns anos, os cientistas estudavam a patogênese de maneira linear, identificando e examinando a expressão de um gene por vez. Os mais de 40.000 genes humanos revelados pelo sequenciamento do genoma humano (LANDER et al. 2001; VENTER et al. 2001) e por outros trabalhos empenhados na identificação de genes (SIMPSON et al. 2000, BONAFOUX et al. 2004; CAMARGO et al. 2004; FERREIRA et al. 2004), juntamente com a implementação de tecnologias avançadas mudou a forma de estudar os processos biológicos, pois permitiu a análise quantitativa da expressão gênica em larga escala tornando possível uma avaliação global do transcriptoma (LAKHANI e ASHWORTH 2001). Avanços da biologia molecular e da bioinformática permitiram o desenvolvimento de metodologias poderosas com acesso a uma visão global dos processos celulares através da análise da expressão gênica diferencial. Várias tecnologias baseadas em análise de seqüências podem ser citadas neste contexto, tais como EST (*expressed sequence tag*), MPSS (*Massive Parallel Signature Sequencing*), SAGE (*Serial Analysis for Gene Expression*).

ESTs são seqüências parciais de clones de cDNA derivadas da extremidade 5' ou da 3' (ADAMS et al. 1991) e em bibliotecas não normalizadas, podem refletir o transcriptoma daquele órgão ou tecido.

MPSS (*Massive Parallel Signature Sequencing*) baseia-se na identificação de clones de cDNA por pirosequenciamento na região correspondente a porção terminal 3' do RNA mensageiro, imediatamente precedente a cauda poli-A (AGATON et al. 2002; POLLOCK 2002).

Simultaneamente, o método pode ser usado para descobrir novas seqüências de genes, por ter alta sensibilidade, sendo essas estendidas posteriormente por outras metodologias.

A técnica de SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) foi desenvolvida para otimizar a utilização dos dados obtidos pela tecnologia de seqüenciamento de DNA e permite, simultaneamente, 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, diversas seqüências de oligonucleotídeos ou etiquetas (*tags*) provenientes da porção 3'-codificadora dos genes são obtidas pela digestão de moléculas de cDNA por diferentes enzimas de restrição, gerando fragmentos que são então ligados entre si e amplificados com *primers* específicos, de modo a se obter uma lista de etiquetas específicas para cada tecido. O nível de expressão de cada gene é determinado pelo número de vezes que sua etiqueta é identificada. Grande parte das informações geradas por esta técnica estão disponibilizadas em bancos de dados públicos (www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE).

A vantagem dessas duas metodologias é que elas possibilitam a avaliação da expressão de um número muito grande de genes sem a necessidade do conhecimento prévio de suas seqüências. Tem potencial analítico e sensibilidade, porém são prejudicadas pela variedade biológica das amostras uma vez que não são apropriadas para um número grande de amostras, pois além de ser muito trabalhosa, apresentam alto custo (CARRARO et al. 2004). Outra tecnologia capaz de avaliar o padrão de

expressão gênica de uma determinado tecido ou população de células é o *microarray*. Esta técnica permite que, diferentemente das citadas anteriormente, sejam analisadas inúmeras amostras, possibilitando estimar a variabilidade biológica de um grupo de amostras e gerar um perfil de expressão gênica específico de um determinado tumor, apesar de permitir a análise de um número limitado de genes, cujas sequências devem ser previamente conhecidas. Essa tecnologia está sendo empregada com muita eficiência na área de câncer.

3.6.1.1 cDNA *Microarray*

O método de *microarray* consiste basicamente na hibridização das seqüências imobilizadas, com moléculas correspondentes a RNA mensageiro de células, tecidos ou outras fontes biológicas marcadas com corantes fluorescentes, fornecendo uma medida da abundância do RNA mensageiro na amostra. O *microarray* de DNA, ou *chip*, é uma matriz de milhares de seqüências de cDNA ou de oligonucleotídeos imobilizados num suporte sólido, que pode ser uma lâmina de vidro ou membrana (KURELLA et al. 2001). No caso de hibridizações competitivas utilizando fluoróforos distintos, as hibridizações são feitas utilizando uma amostra-referência (que pode ser *pool* de amostras normais, tumorais ou linhagens celulares), sempre marcada com um corante fluorescente distinto da amostra-teste, que se refere à amostra que está sendo utilizada. O uso da referência produz uma medida básica de expressão para cada gene, possibilitando comparações de experimentos independentes.

As amostras marcadas com fluoróforos distintos, amostra-teste e referência, são misturadas e hibridizadas numa mesma lâmina. Após a hibridização e o processo de lavagem, a lâmina é submetida a varredura por um *scanner* com *laser* acoplado, usando os dois comprimentos de ondas correspondentes às respectivas moléculas fluorescentes usadas. Esse aparelho é capaz de ler a fluorescência emitida por cada fluoróforo separadamente, sendo essa medida proporcional à quantidade de RNA mensageiro nas amostras. Como a hibridização é competitiva, os valores de fluorescência obtidos revelam níveis relativos de expressão de cada transcrito na amostra-teste comparada com a amostra-referência. (NOVORADOVSKAYA et al. 2004).

Após a normalização os dados classicamente são submetidos a três análises matemáticas diferentes. A primeira visa buscar genes diferencialmente expressos entre os estados estudados. A segunda busca reconhecer padrões de expressão gênica nos diferentes estados. Hoje também é possível fazer um terceiro tipo de análise na qual busca-se classificadores, ou seja, um grupo pequeno de genes que possa separar dois estados sendo a idéia básica a introdução destes classificadores na prática clínica (CARRARO et al. 2004).

3.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TW

A desregulação de genes que são importantes nos processos de proliferação e diferenciação celular é um evento comum dos tumores humanos. Vários trabalhos avaliam a expressão gênica com o intuito de entender esses processos e o papel desses genes na tumorigênese.

UDTHA et al. (2003) usando *microarray* de cDNA analisaram os genes diferencialmente expressos entre TW com mutação de WT1 em comparação aos TW em que não foram encontradas mutações de WT1. Esse estudo revelou que c-myc estava super-expresso nos TW com mutação de WT1, e foi confirmado por RT-PCR em tempo real, sugerindo portanto que o WT1 atua reprimindo a expressão de c-myc.

TAKAHASHI et al. (2002) compararam o perfil de expressão gênica usando um *microarray* com 19.968 cDNAs de 15 TW em relação a um rim normal e encontrou 267 cDNAs com pelo menos 3 vezes de diferença de expressão, estando o WT1 e o IGFII dentro desse grupo. O gene que mostrou maior diferença de expressão nessa comparação foi a topoisomerase-II- α , uma enzima nuclear que controla e altera o estado topológico do DNA (e.g. relaxamento da superhelicoidação do DNA), facilitando alguns processos celulares como transcrição, replicação e reparo, sendo portanto um indicador de proliferação celular relacionado a quimiossensibilidade aos inibidores de Topo II (JARVINEN et al. 2000; OMIM). A clusterização hierárquica usando esses genes separou os TWs em 2 grupos, baixo risco (estádios I e II) e alto risco (estádios III e IV), com

apenas uma exceção, um TW classificado como grau II que ficou no grupo dos tumores de alto grau, cujo paciente morreu com o câncer.

Recentemente, tentando encontrar um perfil de expressão que tenha a característica de ser preditivo de recaída, um grupo (WILLIAMS et al. 2004) analisou 27 TWs utilizando uma plataforma de 30.720 clones de cDNA, dos quais foram analisados pouco mais de 9.000 genes humanos. Nesse estudo, 138 genes mostraram diferença de expressão entre os TW com e sem recaída sendo possível encontrar alguns trios de genes capazes de distinguir, não perfeitamente, essas duas classes (e.g. B7H3, TIMM22 e PAPSS2 γ 9). A confirmação desses dados deve ser feita com um número maior de amostras.

Apesar de vários esforços para melhor caracterizar esse tumor embrionário, muito pouco se conhece sobre os eventos genéticos e epigenéticos envolvidos com seu aparecimento. Dessa forma, a caracterização molecular dos diferentes componentes dos TWs se torna extremamente importante na tentativa de elucidar vários pontos sobre sua tumorigênese.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COMITÊ DE ÉTICA

O desenvolvimento desse projeto, bem como a utilização das amostras, foram autorizados pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo, no processo de número 371/01.

Todos os pacientes ou responsáveis assinaram o termo de consentimento pós-informado.

4.2 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Trinta e cinco amostras tumorais com diagnóstico de TW de pacientes que foram operados no Hospital do Câncer A.C. Camargo, de 1997 a 2004, e armazenadas no Banco de Tumores (Hospital do Câncer / Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer) entraram no estudo. Além disso, 6 amostras de TW oriundas do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Santa Casa, numa colaboração com o Dr. Benjamim Heck e Dra. Maria Pizza, foram incluídas no estudo, totalizando 41 amostras (Tabela 3).

Foram excluídos da análise TWs que foram classificados morfológicamente como regressivos ou císticos, além dos que possivelmente estão associados a síndromes ou se apresentaram em

bilateralidade, resultando num total de 17 tumores (tabela 4) que prosseguiram no estudo.

Como referência do experimento de *microarray* foi utilizado um *pool* de RNA extraído de 6 amostras de rins morfologicamente normais, pareados aos tumores dos pacientes.

Tabela 3 - Pacientes que foram diagnosticados com tumor de Wilms, com amostra armazenada no Banco de Tumores do Departamento de Patologia do Hospital do Câncer AC Camargo.

Índice	Nome	Idade ao diagnóstico	Sexo	Primeiro tratamento
TW1	IFM	5m	F	Cirurgia
TW2	MPS	4a	F	Cirurgia
TW3	IPRS	2a	M	Cirurgia
TW4	ABA	2a	F	
TW5	LKCS	11m	F	Cirurgia
TW6	WA	2a	M	Cirurgia
TW7	DJZ	2a	M	Cirurgia
TW8	MST	13a	F	Quimioterapia
TW9	FEB	11m	F	Quimioterapia
TW10	ASL	2a	F	Cirurgia
TW11	JAS	1a	F	Quimioterapia
TW12	JAR	4a	F	Quimioterapia
TW13	CSC	5a	F	Quimioterapia
TW14	JPGM	5a	M	Quimioterapia
TW15	DAPC	2a	M	Cirurgia
TW16	CBM	9m	F	Cirurgia
TW17	GFGO	3a8m	F	Quimioterapia
TW18	Não foi possível identificar o paciente			
TW19	GAA	2a	F	Quimioterapia
TW20	CGPS	1a9m	F	Quimioterapia
TW22	SBC	5a	F	Quimioterapia
TW23	TRAE	4a	F	Quimioterapia

TW24	MVSP	1a4m	F	Quimioterapia
TW25	UASF	2a	M	
TW26	RSB	1a7m	M	
TW27	VLF	2a5m	F	Quimioterapia
TW28	YRAF	5m	F	Cirurgia
TW29	GCO	6a10m	M	Quimioterapia
TW30	RFMV	11m	M	Quimioterapia
TW31	GBF	1a	F	
TW32	MCC	3a	M	Cirurgia
TW33	AMC	3a	F	Quimioterapia
TW34	SLPC	4m	F	
TW35	RSP	3a	F	
TW36	RCM	8a	M	
TW37	MCP	3a1m	M	Quimioterapia
TW39	RAM	11a	M	Quimioterapia
TW40	JMVR	8a5m	M	Quimioterapia
TW41	JMC	1a3m	F	Quimioterapia
TW42	FSP	1a	M	Quimioterapia
TW43	LTPB	6a11m	F	Quimioterapia

4.3 MICRODISSECÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras tumorais selecionadas foram submetidas a microdissecção para retirada das áreas indesejadas. A caracterização morfológica das amostras estão apresentadas na Tabela 4.

Fundação Antonio Prudente

Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

Tabela 4 - Amostras tumorais que foram submetidas a microdissecção (por bisturi ou *laser*).

Índice	Diagnóstico	Composição	Predomínio	Anaplasia	Estadio
TW1	TW	B+M+E	B	ausente	I
TW2	TW	B+M	B	focal	I
TW4	TW	B+M+E	B	ausente	II
TW7	TW	B+M+E	T	ausente	III
TW10	TW	B+M+E	E	ausente	I
TW11	TW	B+M+E	M	ausente	I
TW15	TW	B+E	B	ausente	I
TW17	TW	B+M+E	E	ausente	III
TW18	TW	B+M+E	E	ausente	NP
TW20	TW	B+M+E	M	ausente	IV
TW22	TW	B+M(EH)+E	M	ausente	I
TW26	TW	B+M+E	B	ausente	I
TW28	TW	B+M+E	M	ausente	III
TW30	TW	B+M+E	T	ausente	III
TW37	TW	B	B	ausente	I
TW39	TW	B+M+E	B	ausente	IV
TW40	TW	B+M+E	B	ausente	I

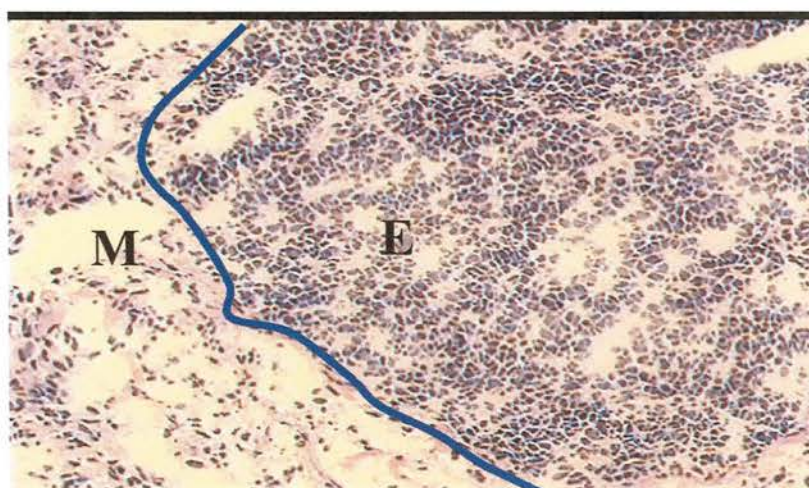
NP: não foi possível identificar o paciente. B: componente blastematoso. M: componente estromal. M(EH): componente estromal com diferenciação rabiomioblástica. E: componente epitelial. T: TW trifásico.

4.3.1 Microdissecção Manual

A microdissecção manual com bisturi é feita observando-se uma lâmina de hematoxilina-eosina do tecido de interesse através de um microscópio óptico comum. Essa análise permite que apenas as áreas de interesse sejam selecionadas. Esse procedimento foi aplicado em 15 amostras de TW em que foi possível a realização dessa técnica com

confiança, isolando unicamente o componente que entraria para o estudo (Figura 4). Dessa forma, foram eliminados tecidos normais, necrose e os outros componentes, para que a homogeneidade celular de cada componente fosse mantida.

Somente foram usadas amostras cuja microdissecção resultou em pelo menos 80% das células de interesse. As 6 amostras de rim apresentaram morfologia normal, pareadas com tecido tumoral também foram microdissecadas manualmente.



Legenda: M: estroma. E: Epitélio.

Figura 4 - Lâmina de um tumor de Wilms corado por hematoxilina-eosina microdissecção manual representada pela linha azul. M: componente estromal. E: componente epitelial.

De 2 tumores, foram microdissecados tanto o componente blastematoso quanto o componente estromal, sendo que os componentes blastematosos foram excluídos das análises matemáticas uma vez que eram

somente duas amostras pareadas dentro do grupo. Desses tumores, só foram analisadas as amostras de componente estromal.

4.3.2 Microdissecção a Laser

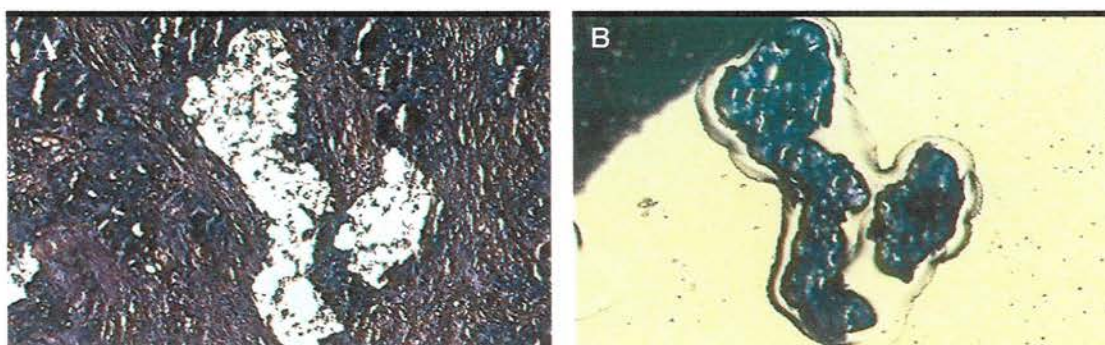
Quando a microdissecção manual não foi possível, foi utilizada a microdissecção a laser (LCM). Esta é uma metodologia capaz de aumentar a acurácia e a sensibilidade dos estudos moleculares pois possibilita a extração de uma população celular homogênea de um tecido morfológicamente complexo, garantindo que apenas as células de interesse sejam isoladas.

O aparelho utilizado por nossa equipe, o *Pixcell Laser Capture Microdissection System (Arcturus Systems for Microgenomics)*, pertence ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo e ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer. Este sistema consiste basicamente de um microscópio invertido, ao qual é acoplada uma fonte de raio laser infravermelho de baixa potência e uma câmera ligada a um monitor e um computador. A lâmina com o corte histológico é fixada ao *chariot* por um mecanismo de sucção a vácuo.

O feixe de raio laser incide sobre um *cap* revestido por um filme termoplástico. O *cap* fica posicionado entre o feixe de laser e o corte histológico. Com o disparo do feixe de laser o filme termoplástico expande e adere à célula escolhida. Quando o pulso cessa, o filme retrai levando consigo a célula aderida à superfície do *cap* (Figura 5). Desta forma, repete-se a operação tantas vezes quantas forem necessárias. A quantidade de

células necessárias varia de acordo com o tipo de tecido e com o estudo que será realizado. Ao final da operação retira-se o *cap* com as células e se segue a extração de RNA. Para esse trabalho estão sendo capturadas em torno de 1000 células para cada amostra.

Nove amostras tumorais, que apresentavam morfologia trifásica, foram microdissecados a *laser* (LCM). Foi retirado somente um componente de cada amostra trifásica, normalmente o mais predominante.



Legenda: A: Lâmina de onde as células foram retiradas por microdissecção a laser. B: *Cap* onde as células ficaram aderidas.

Figura 5 - Lâmina de um tumor de Wilms corado por azul de toluidina, mostrando a microdissecção a *laser* de uma amostra.

4.4 EXTRAÇÃO DE RNA

Para a extração do RNA foram inicialmente utilizadas duas metodologias: Cloreto de Césio (CsCl) (GLISIN et al. 1974) e TRIzol (SIGMA). Cada uma das técnicas apresenta vantagens e desvantagens.

A extração de RNA total por Cloreto de Césio (CsCl) resulta em RNA de melhor qualidade, em maior quantidade e livre de contaminação por DNA.

A desvantagem dessa metodologia é que só é possível fazer a extração simultânea de no máximo 6 amostras por dia, uma limitação da centrífuga. Por outro lado, o reagente TRIzol é de fácil manipulação e fornece RNA total de qualidade aceitável para um grande número de tecidos, porém muitas vezes apresenta contaminação de DNA genômico. Suas principais vantagens estão no maior número de amostras que podem ser processadas simultaneamente e na praticidade do método.

A extração de RNA de células microdissecadas a *laser* segue as recomendações do *kit* de extração *PicoPure™ RNA Isolation Kit* (Catalog # KIT0202) da Arcturus.

4.4.1 Avaliação dos RNAs

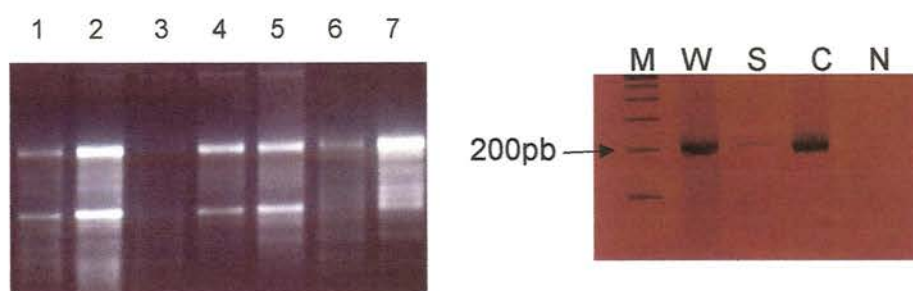
Quinhentos nanogramas de RNA extraído das amostras microdissecadas manualmente são aplicados em gel de agarose 1% (anexo 01). São adicionados 5µl de tampão TAE e 2 µl de brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/µl a 0,5µg de RNA total. A corrida é feita a 55 mV por uma hora e meia. A análise de qualidade se dá pela avaliação das bandas do RNA ribossômico 28S e 18S. Só são utilizadas amostras que apresentam presença das duas bandas 28S e 18S na proporção 2:1 e 1:1.

No caso das amostras microdissecadas a *laser*, por serem quantidades muito pequenas, a qualidade do RNA extraído é avaliado por uma reação de PCR do gene NOTCH2. Após a síntese da primeira fita de cDNA no processo de amplificação, foram isolados 5 µL da reação, que é diluída em mais 15µL de água DEPC. Dessa diluição, 2µL entram na reação

de PCR como *template*. Os *primers* usados estão desenhados na região 5' do gene (F- 5' GCCAACCAGTTCTCCTGC 3'; R- 5' GATGACTGCCCTAACACAG 3'), localizado a 10.374 pb a 5' do gene NOTCH2 que possui 11.433 Kb. O aparecimento do fragmento amplificado indica a integridade do RNAm e também a eficiência da reação de síntese de primeira fita de cDNA.

As condições de amplificação utilizadas foram: 1,0 mM MgCl₂, 0,2μM dNTPs (Invitrogen), 0,4μM de cada *primer*, 1X tampão de reação 10X, 1U de *Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen)* e 2μL do cDNA diluído 1:4 como molde em um volume final de 25μL, completados com água mili-Q. O programa da PCR consistiu em dois minutos iniciais de desnaturação a temperatura de 94 °C, quarenta ciclos repetidos com 1 minuto a 94° C, 1 minuto com a temperatura de 58°C e 1 minuto a 72°C, por fim, um ciclo único de 7 minutos a 72°C. O produto foi visualizado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, com posterior coloração por prata (SANGUINETTI et al. 1994).

Um exemplo da qualidade do RNA total das 15 amostras selecionadas pode ser visualizada na Figura 6A, que mostra um gel de agarose para avaliação da qualidade do RNA total e na Figura 1B, que mostra um gel de acrilamida com o fragmento amplificado da PCR do gene NOTCH2. Pode-se notar que as amostras 1, 2, 4, 5 e 7 (Figura 6A) apresentaram qualidade aceitável e prosseguiram para amplificação. As amostras 3 e 6 foram descartadas por não apresentar os critérios de qualidade requeridos.



Legenda: A: Gel de agarose 1%. 1, 2, 3, 4 e 5: RNA de rim normal extraído por TRizol. 6 e 7: RNA de rim normal extraído por cloreto de céσιο. Amostras 3 e 6 descartadas. **B:** Gel de poliacrilamida 8%, em que estão representados ao marcador (M), amostra microdissecada manualmente (W), uma amostra microdissecada a laser (S), uma controle positivo (C) e negativo (N) da reação de PCR para NOTCH2.

Figura 6 - Avaliação da qualidade do RNA.

Das 15 amostras microdissecadas manualmente, duas foram excluídas do procedimento porque o RNA total extraído não se mostrou de boa qualidade. Dos 9 TWs microdissecados por LCM, foi possível extrair RNA de boa qualidade de 5 amostras.

4.5 AMPLIFICAÇÃO DE RNA

A quantidade de RNA total extraído é sempre muito pequena, devido ao tamanho pequeno da peça tumoral utilizada, fazendo-se necessária uma metodologia de amplificação que permita o aumento dessa quantidade sem prejudicar as proporções das diferentes espécies de RNA mensageiro da amostra (WANG et al. 2000; GOMES et al. 2003).

Após a extração e avaliação dos RNAs totais das amostras microdissecadas manualmente, foi realizada a amplificação do RNA (RNAa). O protocolo utilizado é baseado em WANG et al. (2000) com modificações de GOMES et al. (2003). Outras alterações foram acrescentadas como a redução dos reagentes pela metade nas etapas de síntese de segunda fita de cDNA e transcrição *in vitro*. Essas alterações não prejudicam a qualidade de amplificação obtendo quantidades semelhantes ao protocolo original de RNA amplificado, reduzindo pela metade o custo da reação.

Resumidamente, o cDNA é sintetizado a partir do RNA total, utilizando *primers* oligo dT(15) que ancoram na cauda poli-A do RNA mensageiro e possuem a 5' de sua seqüência um sítio de reconhecimento da T7 RNA polimerase II. A partir da primeira fita de cDNA, é sintetizada a segunda fita usando a Advantage PCR (Clontech), e este DNA fita dupla é submetido a uma transcrição *in vitro*, usando a T7 RNA polimerase II (Promega), que resulta em uma produção exponencial de RNA. Esse procedimento é repetido (*two rounds*) produzindo quantidade suficiente para os experimentos seguintes. O protocolo detalhado esta apresentado no Anexo 2.

No caso das amostras microdissecadas a *laser*, as amplificações sofreram outras alterações estabelecidas em nosso laboratório, que consistem em aumento do tempo de anelamento do primer Oligo-dT de 5 para 15 minutos, utilização de um primer oligo-dT 24T seqüência no anexo 2 (cauda poli T maior, aumentando a eficiência de anelamento à cauda poli-A), e adição de glicogênio na precipitação nas duas etapas de síntese de DNA.

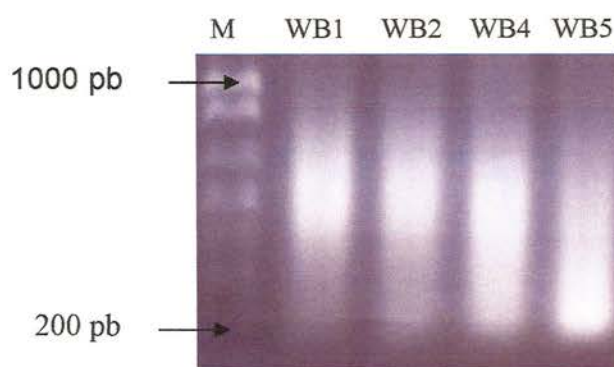
Essas alterações melhoraram a qualidade e a quantidade do RNA amplificado recuperado.

4.5.1 Avaliação da qualidade do RNA amplificado

A avaliação das amostras RNAa é feita em gel de agarose 1% (Anexo 1), em uma corrida com duração de uma hora e meia na voltagem de 55mV. Quinhentos nanogramas de RNA amplificado é adicionado a 5µl de tampão TAE 1X uréia 7M tampão de corrida 3X (glicerol, ficol) (*Loading Buffer*). Adiciona-se 2µl de brometo de etídio (0,5 µg/µl) e a amostra é aplicada no gel.

O que se visualiza é um arrasto, que indica os tamanhos dos fragmentos amplificados. É considerado um RNA de ótima qualidade aquele em que a maior concentração de moléculas estiver entre 200 e 750 pb.

Na Figura 7 pode ser observado o resultado da reação de amplificação de RNA mensageiro de 4 amostras, um gel de agarose 1%. O arrasto mostra que houve amplificação de moléculas de 150 a 850 pb, com predomínio na faixa entre 300 e 750 pb, indicando que as amostras amplificadas estão de ótima qualidade.



Legenda: RNA extraído de TWs amplificado pela metodologia descrita nos anexos 03 e 04. Amostras 1, 2 e 3 tem boa qualidade de RNA amplificado. Amostra 4 tem RNA amplificado de qualidade média, devido à concentração abaixo de 200b que pode ser visualizada no gel.

Figura 7 - Gel de agarose com marcador (M) e 4 amostras.

Treze amostras microdissecadas manualmente e todas as amostras microdissecadas por LCM tiveram RNA amplificado de boa qualidade para serem marcados e hibridizados.

4.6 DESENHO EXPERIMENTAL

Todas as amostras foram hibridizadas com um RNA referência, que consistiu num *pool* de RNA de seis rins que apresentam morfologia normal pareados aos TWs.

O sistema usado foi o *dye-swap* que consiste na hibridização de uma amostra duas vezes, usando a inversão de corantes. Essa inversão dos fluoróforos é realizada para minimizar erros decorrentes das propriedades específicas de cada cianina (Cy3 e CY5) que apresentam afinidade distintas na síntese de primeira fita do cDNA a partir do RNA.

A amostra que será analisada é chamada de amostra-teste e o RNA que serve como referência do experimento, de amostra-referência.

4.7 MARCAÇÃO

A partir do RNAa, é sintetizado cDNA na presença de fluoróforos. Essa reação é purificada e usada na hibridização das lâminas. O protocolo detalhado está descrito no Anexo 5.

4.8 HIBRIDIZAÇÃO

O processo de hibridização é realizado a 42°C por 16 horas. Após hibridização, as lâminas passam por um processo de lavagem, no qual os tampões são pré-aquecidos a 42° C. As lâminas são lavadas nas seguintes condições: uma vez em solução SSC 2X, duas vezes em solução de SSC 0,1% e SDS 1X e duas vezes em solução de SSC 0,1%, sendo que todos os passos são realizados sob agitação por 10 minutos, centrifugando-se as lâminas em tubo Falcon 50 µL a 1.000 rpm por 2 minutos para secagem (Anexos 5 e 6).

No total, foram hibridizadas 18 amostras, mas apenas 14 tiveram lâmina de boa qualidade para serem analisadas pela bioinformática, sendo 13 amostras microdissecadas manualmente e 1 amostra microdissecada a *laser*. As outras amostras microdissecadas a laser e que não apresentaram qualidade satisfatória da hibridização não foram repetidas devido à falta de

quantidade do RNA amplificado. Em relação ao tipo histológico, das 14 amostras hibridizadas, 6 foram amostras de componente blastematoso, 5 do componente epitelial e 3 do componente estromal, sendo que de 2 tumores, foram hibridizados os componentes blastematoso e estromal

4.9 CAPTURA DAS IMAGENS E QUANTIFICAÇÃO DO SINAL

Os sinais gerados pela hibridização das amostras são capturados utilizando um *scanner a laser* confocal com canal duplo, o *ScanArray Express* (Perkin Elmer Life Sciences, Inc., EUA). Esse sistema tem dois *lasers* com comprimento de ondas diferentes, que estimulam especificamente o Cy3 ou o Cy5. Quando as moléculas são excitadas, emitem um sinal proporcional ao número de moléculas presentes, que é captado pelo *scanner* (Tabela 5). A quantificação desse sinal ocorre devido à conversão do comprimento de onda emitido pelos fluoróforos excitados em energia elétrica, produzindo um sinal mensurável. A leitura dos fluoróforos é feita separadamente e a composição da imagem é realizada pelo programa.

Cada lâmina de *microarray* gera duas imagens diferentes, uma para cada fluoróforo utilizado. Geralmente, uma pseudocoloração referente a composição das duas imagens é utilizada para facilitar a visualização e verificação da qualidade dos experimento.

Tabela 5 - Características específicas de cada fluoróforo utilizado.

Fluoróforo	Excitação (nm)	Emissão (nm)	Coloração
Cy3	550	570	verde
Cy5	649	670	vermelho

4.10 LÂMINA 4.8K002

Nesse projeto, foi usada uma plataforma de vidro na montagem dessa lâmina contendo 4.608 seqüências de cDNA de ORESTES, originárias do Projeto Genoma do Câncer (Instituto Ludwig/FAPESP), correspondentes a diferentes genes humanos, além de 192 controles positivos e negativos, totalizando 4.800 pontos. Essa plataforma é produzida pelo Instituto Ludwig (LICR) – Laboratório de Inflamação (LABRI) sob a responsabilidade do Dr. Alex Fiorini e Dr. Luiz Fernando Lima Reis.

A lâmina é dividida em 48 sub-*arrays*, cada um contendo 100 *spots*. Cada *spot* corresponde a um ponto na lâmina de *microarray* onde estão imobilizadas as seqüências de ORESTES. As seqüências imobilizadas na plataforma seguiram critérios biológicos e físicos, determinados pela Dra. Helena Brentani, tais como:

- Seqüências ORESTES correspondentes a seqüências de genes caracterizados.
- Seqüências ORESTES com tamanho maior que 300 pares de base.
- Uniformidade de tamanho e de conteúdo GC.

- Seqüências ORESTES com seqüência mais a 3' possível, considerando-se a variabilidade da região 3' UTR devido ao sítio de poliadenilação alternativo.
- Nenhuma seqüência deve ser compartilhada entre transcritos a qual apresente identidade maior de 85% em 100 pb.

Dos 4.608 genes representados, 2.134 genes têm função conhecida divididos em 802 classes funcionais segundo o *Gene Ontology Consortium Annotation*. Dos genes com função conhecida, 287 genes foram distribuídos na classe de regulação da transcrição, 202 genes na classe de transdução de sinal, 177 genes na classe de fosforilação de aminoácidos e proteínas e 100 genes na classe de transporte. A classificação usada é redundante, ou seja, o mesmo gene pode ter sido colocado em mais de uma classe funcional, conforme sua caracterização.

4.11 PRÉ-ANÁLISE DAS LÂMINAS HIBRIDIZADAS

Após a captura de sinal pelo *scanner*, os dados foram submetidos a algumas análises de critério de qualidade, que são denominadas de pré análise. Uma vez aprovada a qualidade das lâminas, os dados são submetidos a análises estatísticas. Todas essas análises foram realizadas pelo laboratório de Biologia Computacional (Hospital do Câncer) sob a coordenação da Dra. Helena Brentani.

Fundação Antonio Prudente

Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

4.11.1 Dendograma

Refere-se a uma clusterização hierárquica com distância euclidiana não supervisionada. Essa clusterização leva em consideração todos os genes da lâmina, e não apenas os diferencialmente expressos (anexo 9).

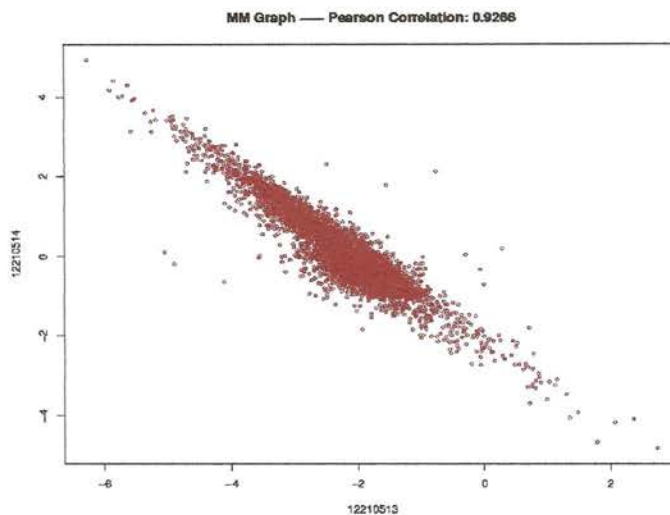
De forma prática, essa análise permite a visualização das similaridades das amostras sendo um controle da parte experimental. Espera-se que esse dendograma apresente maior semelhança entre as lâminas controle e swap (uma vez que são réplicas com inversão de corantes), do que com outra amostra do projeto, não sendo isso obrigatório, principalmente se estiverem sendo analisadas amostras muito semelhantes.

4.11.2 MM Plot

O gráfico considera a qualidade da marcação dos fluoróforos (Cy3 e Cy5), para mostrar a correlação entre a lâmina controle e a lâmina *swap* através de uma Correlação de Pearson. A Correlação de Pearson determina uma medida do grau de relacionamento linear entre duas variáveis aleatórias.

Na Figura 8, observa-se que em cada eixo do gráfico está representado uma das lâminas (controle e *swap*) e a figura obtida é uma dispersão de pontos, sendo que cada ponto se refere à relação entre os valores de intensidade para cada gene das duas lâminas.

Nesse projeto, foram consideradas lâminas de boa qualidade aquelas que apresentaram correlação entre 0,8 e 1,0.

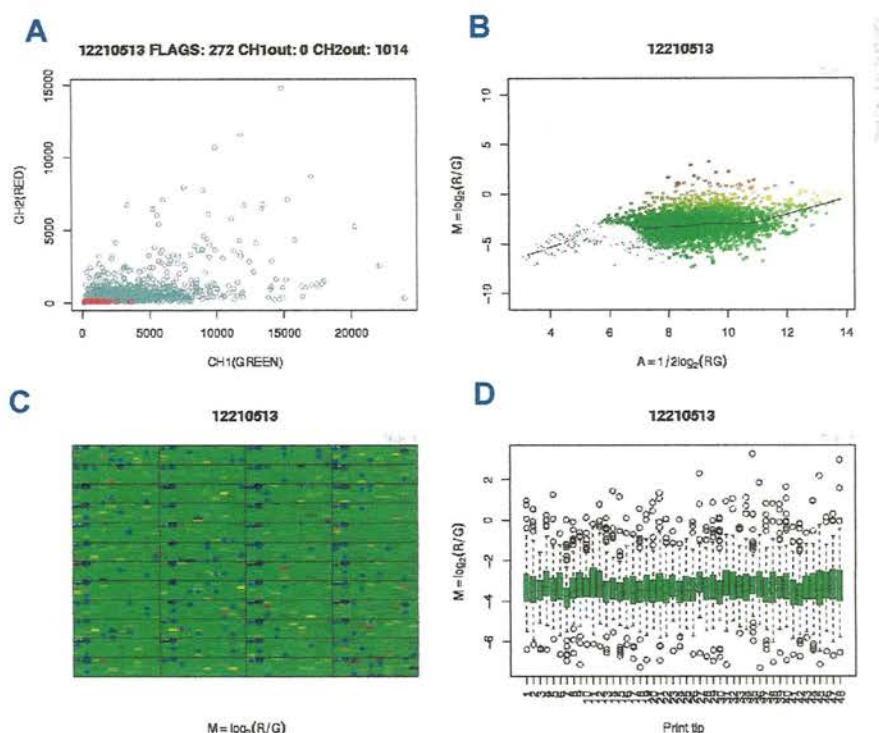


Legenda: Eixo X: lâmina controle amostra-teste Cy3/amostra-referência Cy5; eixo y: lâmina swap amostra-referência Cy3/amostra-teste Cy5. O gráfico mostra a dispersão de pontos representantes da relação entre os valores de intensidade para cada gene das lâminas controle e swap.

Figura 8 - Correlação de Pearson da Amostra WB1.

4.11.3 MA, Log X Log e BoxPlot

São medidas em escala logarítmica dos valores de intensidade de fluorescência para cada gene, após a subtração de sinal do *background*. O gráfico mostra as intensidades de Cy3 e de Cy5 da mesma lâmina (figura 9), sem nenhum tipo de normalização dos dados.



Legenda: **A:** Relação da intensidade bruta da lâmina (Cy3/Cy5). As cores em vermelho ou em verde representam pontos que foram retirados da análise, calculados pelo quantil local. **B:** Gráfico representando a razão (Cy3/Cy5) no eixo y e a intensidade em escala logarítmica no eixo x. Os pontos em azul/cinza representam os spots que apresentaram sinal menor que o sinal do background. A linha representa a referência de intensidade que será usada no processo de normalização de Lowess. **C:** Gráfico representativo da lâmina. Pontos em azul representam genes que foram excluídos pelo programa Scannarray ou manualmente. **D:** Representa a dispersão de pontos de cada sub-array (1 sub-array contém 100 spots). O bloco verde representa a concentração da maior parte dos pontos, segundo a razão de intensidade. A linha é a mediana calculada levando em consideração apenas os pontos do bloco verde.

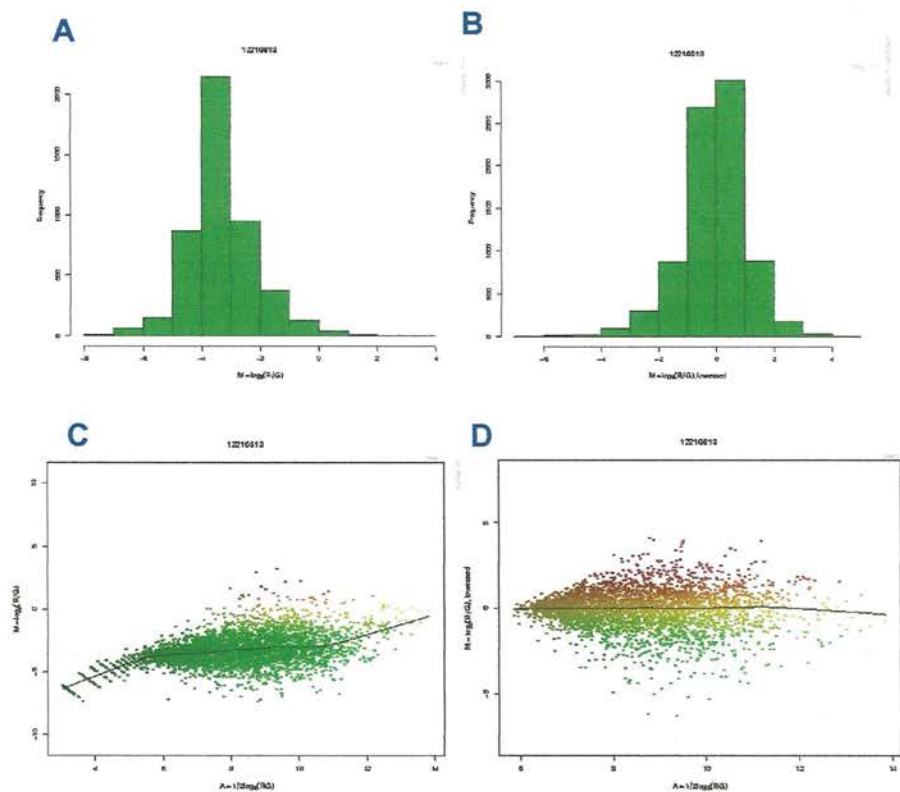
Figura 9 - Representação da fluorescência de todos os genes de uma lâmina.

4.11.4 Normalização das lâminas

A proposta de normalização é minimizar variações sistemáticas introduzidas experimentalmente nas medidas da expressão gênica, para que as diferenças biológicas possam ser distinguidas com menos artefatos. Nesse projeto, foi utilizada a normalização de Lowess. LOWESS é uma

técnica de análise de dados que produz uma dispersão de pontos de um conjunto de valores de duas variáveis, representado em um *scatter plot* ou histograma (Figura 10). O Lowess define janelas com intervalos pré-definidos no eixo horizontal do gráfico, que variam de 0 a 100%. Nesse projeto, foi utilizado intervalo de 20%.

O histograma mostra a distribuição da medida relativa dos dados de uma amostra-teste e sua referência (Figura 10, itens A e B). Os itens C e D da figura 10 mostram a distribuição dessa medida segundo a intensidade de fluorescência.



Legenda: A e C: representação dos dados antes de serem normalizados. B e D: representação dos dados normalizados, onde houve uma correção da distorção dos pontos.

Figura 10 – Gráficos representativos da normalização de Lowess.

Nota-se que, após a normalização (figura 10, itens B e D), a maior parte dos pontos foi trazida para próximo de zero, indicando que não há diferença de expressão entre a amostra-teste e a amostra-referência para a maior parte dos genes, o que deve ser esperado.

4.12 ANÁLISE MATEMÁTICA

Todas as análises matemáticas foram realizadas com lâminas que apresentaram qualidade satisfatória em todos os itens da pré-análise. Primeiramente foram eliminados todos os pontos da lâmina que apresentaram emissão de fluorescência igual ou menor (*outliers*) que o sinal emitido pelo ruído (*background*). Para esse cálculo, foi usado o valor de intensidade do *background* e o desvio-padrão calculado a partir da fluorescência emitida por cada *spot*. Esses valores são usados para gerar uma distribuição normal com *cut-off* de 95% (subtração local). Foram eliminados também os pontos que apresentaram saturação de hibridização, sendo esse dado baseado numa emissão de sinal maior ou igual a 63000 (65550 = 16 BIT). Nesse caso, o excesso de material hibridizado gera um sinal muito intenso que supera a capacidade do detector de medir a intensidade proporcional de fluorescência, invalidando a quantificação.

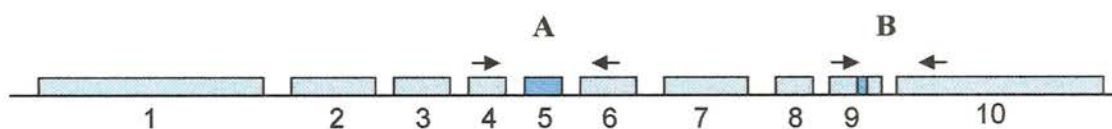
Os valores relativos normalizados de cada gene foram submetidos ao teste T de *Student* permutado para determinar o p valor para a expressão de cada gene individualmente nas diferentes classes analisadas (componente

blastematoso, componente epitelial e componente estromal). Foram considerados como diferencialmente expressos aqueles genes cuja intensidade apresentou valor de pelo menos duas vezes de diferença de expressão e com $p < 0,01$.

A clusterização hierárquica foi realizada usando os genes diferencialmente expressos em pelo menos 2 vezes e com os valores de p : $p < 0,0001$ e $p < 0,01$. Nos *clusters*, o degradê de cores entre amarelo e vermelho representa o nível de expressão de um determinado gene para uma determinada amostra, sendo que os genes super-expressos foram representados em vermelho e os pouco expressos, em amarelo.

4.12 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS 4 ISOFORMAS PRINCIPAIS DE WT1

A expressão de WT1 foi verificada através de RT-PCR usando *primers* desenhados nos éxons adjacentes às regiões de *splicing* alternativos. Assim, para verificar a presença ou não do éxon 5 (primeiro *splicing* alternativo), os *primers* foram desenhados nos éxons 4 e 6, e para verificar a presença ou não do KTS, os *primers* foram desenhados nos éxons 9 (onde está localizado o KTS) e 10 (Figura 9).



Legenda: Os retângulos representam os éxons e as linhas os introns. Os retângulos em azul mais escuro representam as regiões de *splicing* alternativo (exon 5 e KTS no exon 9). As setas estão localizadas na região onde os *primers* foram desenhados. A: par de *primers* para detectar *splicing* alternativo do exon 5 e B: par de *primers* para detectar *splicing* alternativo do KTS.

Figura 11 - Desenho ilustrativo do gene WT1.

O padrão de bandas observado permite inferir a presença das isoformas. É esperado que cada par de *primers* seja capaz de gerar 2 bandas, uma contendo o *splicing* alternativo (maior peso molecular) e a outra (menor peso molecular) sem ele, como mostrado na Tabela 6.

Tabela 6 - *Primers* para verificar as isoformas do WT1.

Primers	Seqüência	tamanho de banda esperado	
		<i>splicing</i> presente	<i>splicing</i> ausente
WT1 –exon 5 F	GCTTGAATGCATGACCTG	174 pb	123 pb
WT1 –exon 5 R	CCCAATACAGAATACACAC		
WT1 – KTS - F	CATTCCAGTGTAAGCTTG	195 pb	186 pb
WT1 – KTS - R	CATGACCAAACCTCCAGC		

As condições de amplificação utilizadas foram: 1,0 mM MgCl₂, 0,2µM dNTPs (*Invitrogen*), 0,4µM de cada *primer*, 1X tampão de reação 10X, 1U de

Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e 2 μ L do mesmo cDNA de cada amostra do item 4.3.1. O programa da PCR consistiu em dois minutos iniciais de desnaturação a temperatura de 94 °C, quarenta ciclos repetidos com 1 minuto a 94° C, 1 minuto com a temperatura de 58°C e 1 minuto a 72°C, por fim, um ciclo único de 7 minutos a 72°C. O produto foi visualizado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, com posterior coloração por prata (SANGUINETTI et al. 1994).

O tamanho esperado dos fragmentos está discriminado na tabela 5. Baseando-se na estrutura do mRNA do WT1, as quatro isoformas serão denominadas como na Tabela 7.

Tabela 7 - Isoformas de WT1.

Isoformas de WT1	Exon 5	KTS
Variante A	Ausente	Presente
Variante B	Presente	Presente
Variante C	Ausente	Ausente
Variante D	Presente	Ausente

5 RESULTADOS

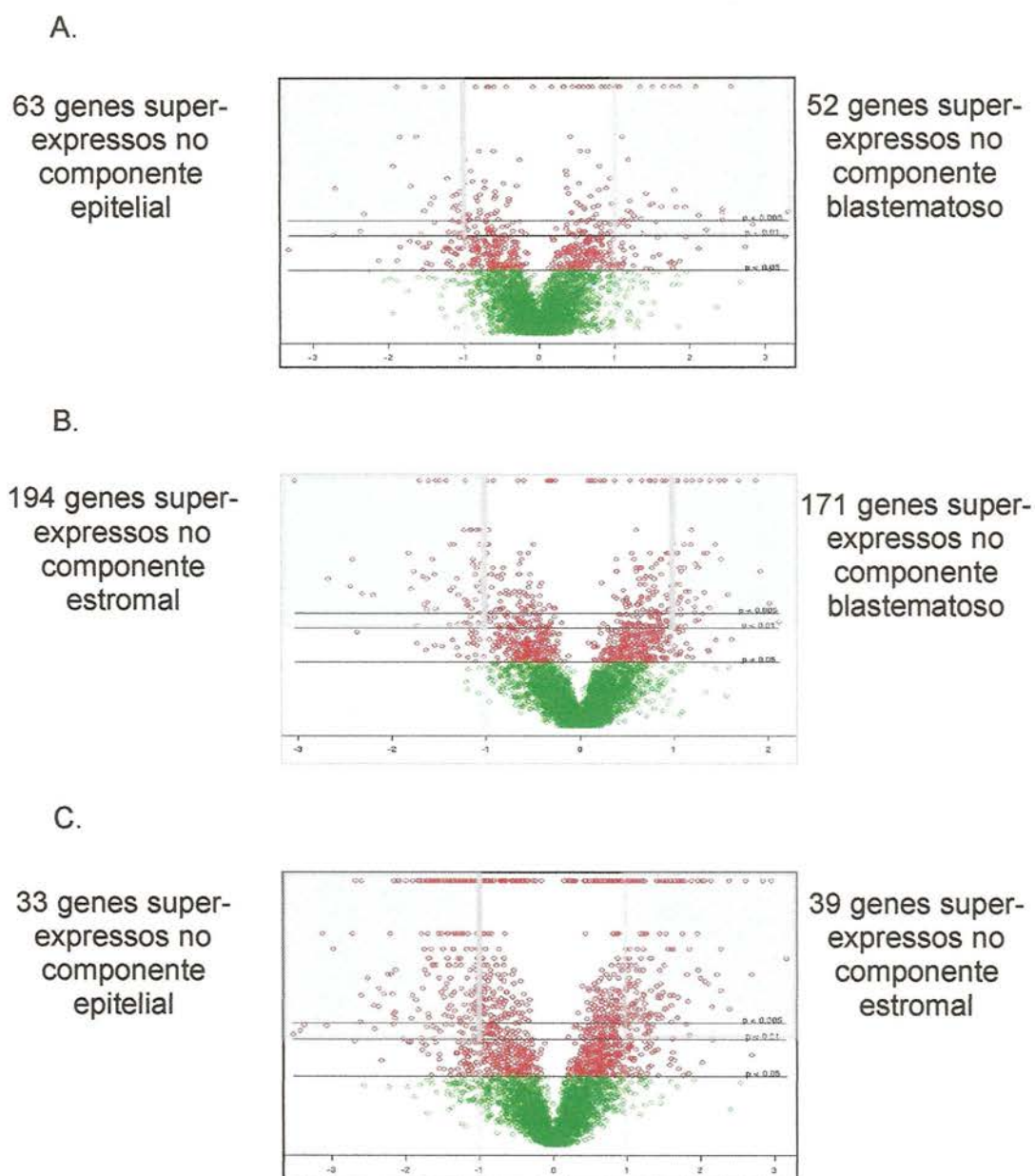
5.1 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS PELO GRÁFICO DE VOLCANO

Uma forma de visualizar os genes diferencialmente expressos é através do gráfico de Volcano, desenhado em duas dimensões, onde estão representados genes diferencialmente expressos entre duas classes (cada classe representando um componente). No eixo “x” está representado o logaritmo da razão das duas classes em que um gene é diferencialmente expresso entre duas classes, e no eixo “y”, o valor de “p”.

Foram considerados como genes diferencialmente expressos aqueles cujo valor de “p” foi menor que 0,01 (eixo y) e com *fold* de pelo menos duas vezes, que é dado pelo logaritmo das razões da comparação entre as classes (eixo x).

A comparação entre os componentes blastematoso e epitelial resultou num total de 115 genes diferencialmente expressos, sendo 52 genes super-expressos no componente blastematoso e 63 genes super-expressos no componente epitelial (Anexo 7 Tabela 1) (Figura 12A). A comparação dos genes diferencialmente expressos entre os componentes blastematoso e estromal apresentou 365 genes diferencialmente expressos, sendo 171 genes super-expressos no componente blastematoso e 194 genes super-expressos no componente estromal (Anexo 7 Tabela 2) (Figura 12B). A comparação entre os componentes estromal e epitelial resultou em 72 genes

diferencialmente expressos, sendo que 39 foram super-expressos no componente estromal e 33 foram super-expressos no componente epitelial (Anexo 7 Tabela 3) (Figura 12C).



Legenda: As barras cinzas sinalizam o valor 1 do logaritmo da razão (que corresponde a 2 vezes de diferença no nível de expressão). O valor de p considerado foi de 0,01. O quadrante azul mostra onde estão localizados os genes diferencialmente expressos no gráfico de Volcano. A: Componente blastematoso *versus* componente epitelial. B: Componente blastematoso *versus* componente estromal. C: Componente estromal *versus* componente epitelial.

Figura 12 - Gráfico Volcano das três comparações.

Nesse gráfico, é possível visualizar que o perfil de expressão gênica do componente blastematoso é mais próximo do componente epitelial (116 genes) e muito diferente do componente estromal (365 genes). O perfil de expressão do componente epitelial mostra semelhanças com os perfis dos outros dois componentes, já que as amostras do componente epitelial se dividiram entre os outros dois componentes.

5.1.1 Classificação dos Genes Diferencialmente expressos pelo *Gene Ontology*

Os genes diferencialmente expressos de todas as comparações foram classificados pelo *Gene Ontology Consortium Annotation (GO)* - (<http://vortex.cs.wayne.edu:8080/index.jsp>), com a finalidade de identificar as classes que possam estar envolvidas na diferenciação celular dos componentes de TW. Essa análise foi realizada levando em consideração o número de genes de cada classe representados na lâmina para identificar apenas as classes que tiveram um número significativo de genes desregulados entre as comparações (p valor corrigido). Nessa análise foram considerados os processos biológicos, função molecular, localização celular e localização cromossômica (Anexo 8).

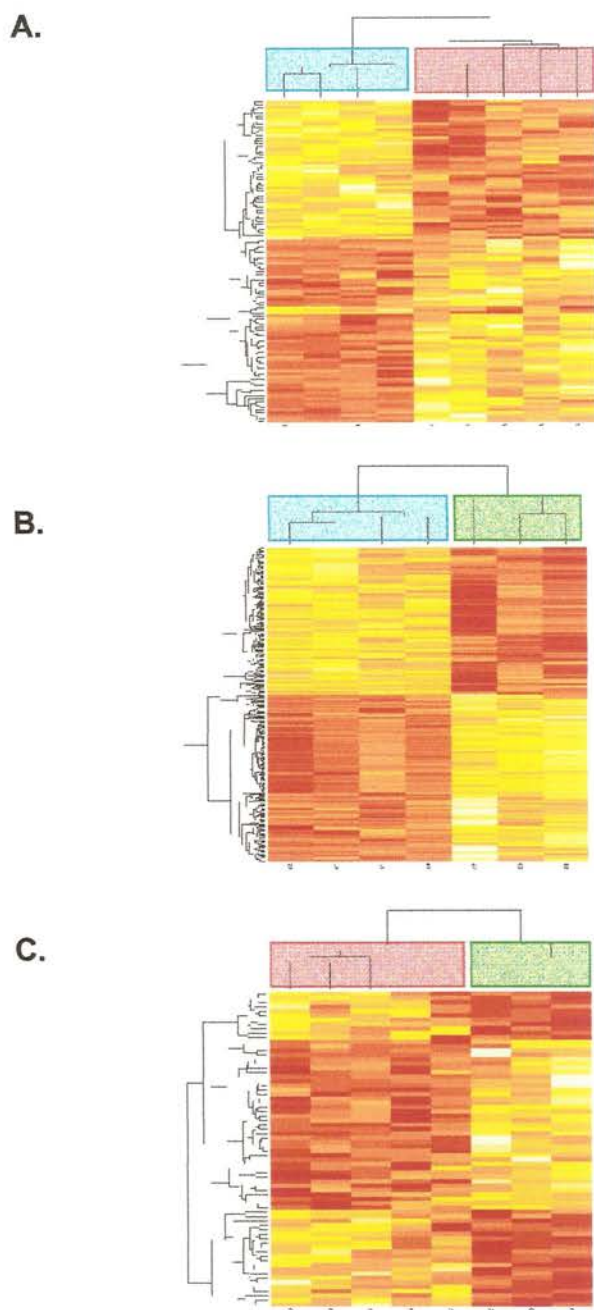
Essa análise permitiu identificar processos biológicos comuns envolvidos em mais de uma comparação mostrando que entre as comparações componente blastematoso *versus* componente estromal e *versus* componente epitelial existe um número maior de processos

biológicos comuns. Função molecular e a localização celular parecem estar distribuídos sem ter uma tendência específica entre as comparações.

5.2 PERFIL MOLECULAR DOS COMPONENTES DE TW

Para verificar se os genes diferencialmente expressos dados pelo teste t de *Student* permutado ($p \leq 0,01$) era capaz de discriminar as duas classes de componentes tumorais, foi realizada a clusterização hierárquica com distância euclidiana. Em todas as comparações, usando todos os genes diferencialmente expressos (com pelo menos duas vezes de diferença e com valor de p menor que 0,01), foi possível discriminar os componentes dois a dois, como pode ser observado na Figura 14.

O número de genes diferencialmente expressos foram de 115 genes a comparação entre os componentes blastematoso e epitelial (Figura 14A), 365 genes na comparação entre os componentes blastematoso e estromal (Figura 14B) e 72 genes na comparação entre os componentes estromal e epitelial (Figura 14C).

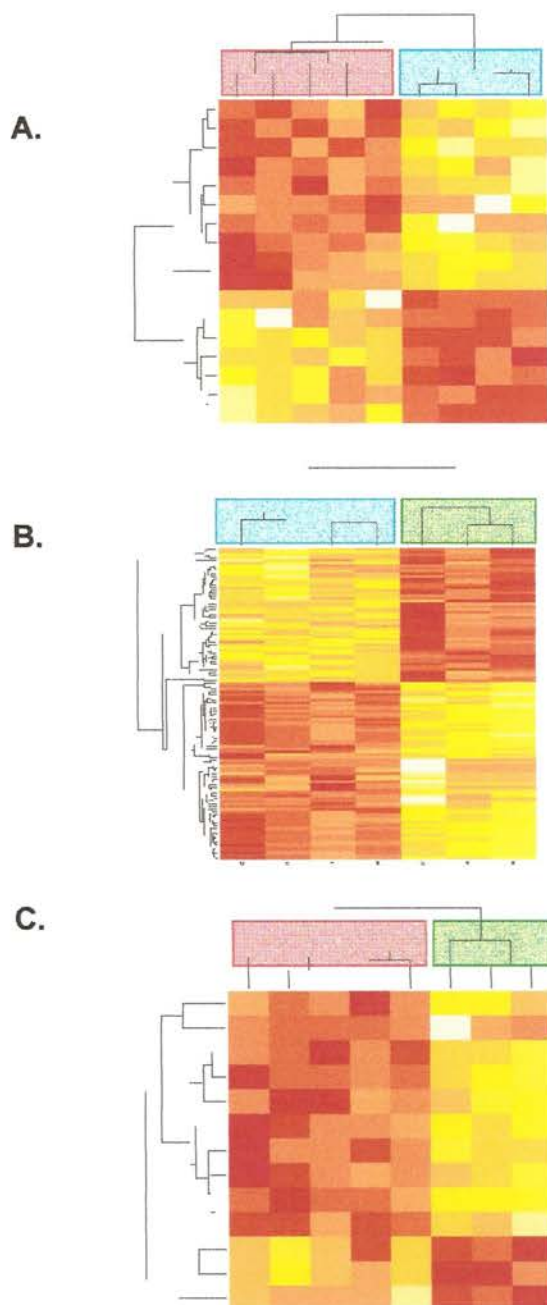


Legenda: A: Cluster Componente Blastematoso versus Componente Epitelial. B: Cluster Componente Blastematoso versus Componente Estromal. C: Cluster Componente Estromal versus Componente Epitelial. Em azul: componente blastematoso, em verde: componente estromal, em vermelho: componente epitelial.

Figura 14 - Clusters hierárquico utilizando os genes diferencialmente expressos ($\text{Fold} \geq 2$ e $p \leq 0,01$) na comparação entre dois componentes.

Usando apenas os genes com mínimo de duas vezes de diferença de expressão entre os componentes e com valor de p menor que 0,0001, os genes diferencialmente expressos foram capazes de discriminar as duas classes em todas as comparações.

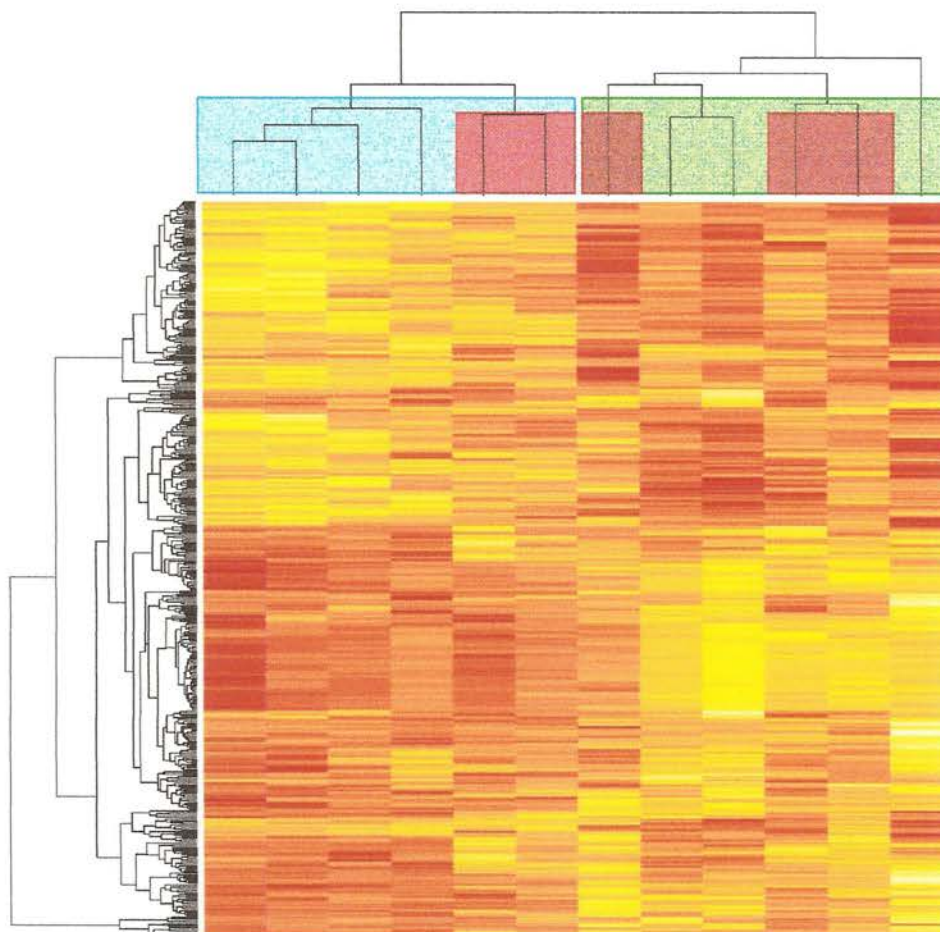
A comparação entre os componentes blastematoso e epitelial resultou em 17 genes, sendo dez genes super-expressos no componente blastematoso e sete genes super-expressos no componente epitelial (Figura 15A). A comparação entre os componentes blastematoso e estromal mostrou 114 genes diferencialmente expressos, sendo 49 genes super-expressos no componente blastematoso e 65 genes super-expressos no componente estromal (Figura 15B). E, por fim, a comparação entre os componentes estromal e epitelial resultou em 13 genes desregulados, sendo que 4 apresentaram super-expressão no componente estromal e 9 genes apresentaram super-expressão no componente epitelial (Figura 15C).



Legenda: A: Cluster Componente Blastematoso *versus* Componente Epitelial. B: Cluster Componente Blastematoso *versus* Componente Estromal. C: Cluster Componente Estromal *versus* Componente Epitelial. Em azul: componente blastematoso, em verde: componente estromal, em vermelho: componente epitelial.

Figura 14 - Clusters hierárquico utilizando os genes diferencialmente expressos ($\text{Fold} \geq 2$ e $p \leq 0,0001$) na comparação entre dois componentes.

Considerando todos os genes diferencialmente expressos em todos os componentes ($p \leq 0,01$ e $Fold \geq 2$), soma-se um total de 456 genes nas três comparações, que foram usados para fazer uma clusterização hierárquica (Figura 16).



Legenda: Em azul: componente blastematoso, em verde: componente estromal, em vermelho: componente epitelial.

Figura 15 - Clusters hierárquico utilizando os genes diferencialmente expressos em todas as comparações ($Fold \geq 2$ e $p \leq 0,01$).

É interessante notar que as amostras do componente epitelial que ficaram no mesmo ramo do componente blastematoso receberam cirurgia como primeiro tratamento e as amostras do componente epitelial que ficaram no braço do componente estromal, receberam quimioterapia pré-operatória, indicando que a quimioterapia altera a expressão gênica dos componentes e os torna, em nível de padrão de expressão, mais semelhantes ao padrão de expressão do componente estromal.

5.2.1 Classificação dos Genes Diferencialmente Expressos Segundo as Vias (KEGG)

Ao fazer a classificação dos genes diferencialmente expressos pelo KEGG (www.kegg.com), algumas vias de sinalização celular parecem estar diferentemente reguladas entre os componentes, como as vias de sinalização celular Fosfatidilinositol e WNT, além das vias de crescimento e morte celular (ciclo celular e apoptose).

O número de genes das vias de transdução de sinal foram verificados para encontrar quais eram diferencialmente expressos. Entre os genes desregulados entre os componentes do TW, foi analisado aqueles que pertenciam as vias de transdução de sinal (classificada pelo KEGG – atualização de setembro/2004) e foi verificado quantos dos genes representantes de cada via estavam presentes na lâmina (tabela 8) .

Fundação Antonio Prudente

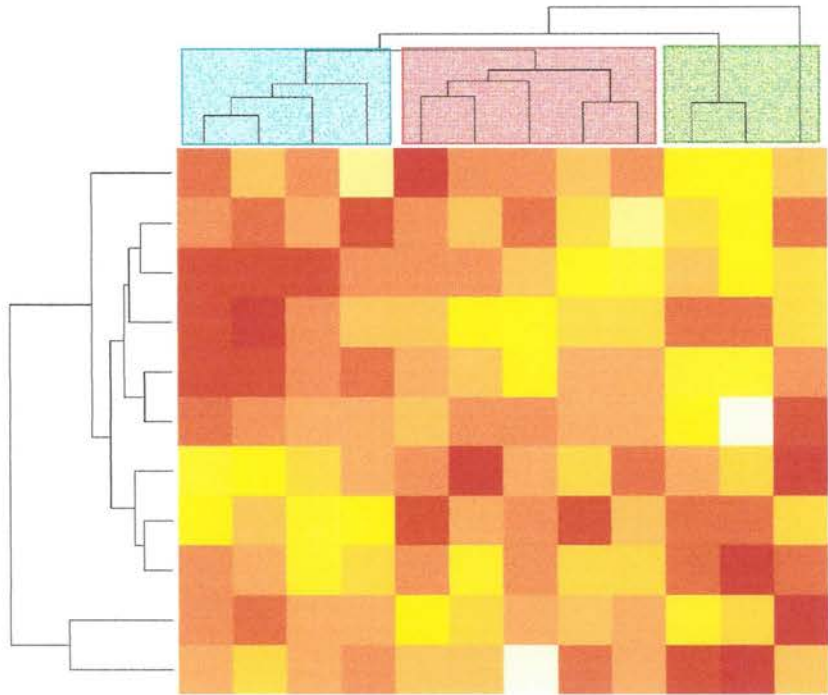
*Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação*

Tabela 8 - Distribuição dos genes das vias de transdução de sinal (KEGG – setembro/2004).

Vias	Número de genes	Genes na lâmina	Genes desregulados (%)
MAPK signaling pathway	261	90	12 (13,3%)
Wnt signaling pathway	163	54	12 (22,2%)
TGF-beta signaling pathway	83	26	5 (9,2%)
Toll-like receptor signaling pathway	92	31	3 (9,7%)
Jak-STAT signaling pathway	97	31	1 (3,2%)
Phosphatidylinositol signaling system	74	32	8 (25%)

5.2.1.1 Via WNT

Dentre os 163 genes relacionados no KEGG como fazendo parte da via WNT, 54 estão representados na lâmina. Desses, 12 genes estão diferencialmente expressos entre os componentes: PRKCBP1, PPP2R2A, SFRP1, SFRP2 e PRICKLE1 na comparação entre os componentes blastematoso e epitelial, SFRP2, NFAT5 e ROCK2 na comparação entre os componentes blastematoso e estromal, e PLCG2, NFATC4, FRAT2 e WIF1 na comparação entre os componentes estromal e epitelial. Esses 11 genes (SFRP2 foi comum em duas comparações) conseguem discriminar todos os componentes perfeitamente (Figura 17).



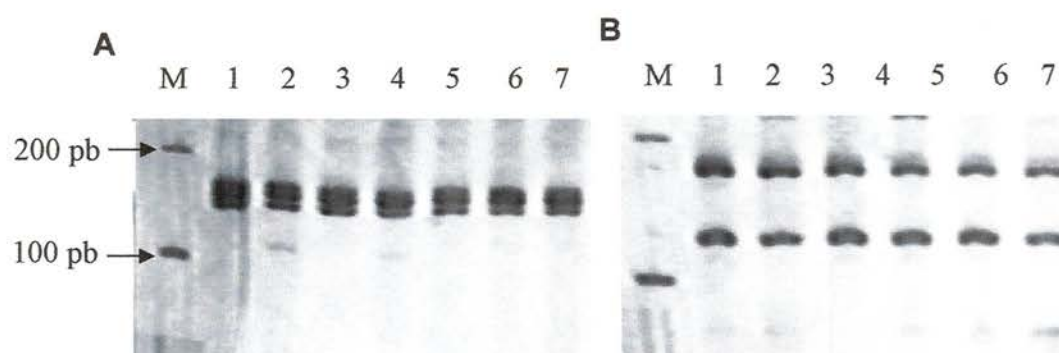
Legenda: Em azul: componente blastematoso, em verde: componente estromal, em vermelho: componente epitelial.

Figura 16 - Cluster hierárquico usando apenas os genes diferencialmente expressos da via WNT.

Esses 11 genes não fazem parte do mesmo braço da via WNT. Os genes PRKCBP1, PPP2R2A, SFRP2, FRAT2 E WIF1 pertencem ao braço canônico da via, PRICKLED1, SFRP1 e ROCK2 pertencem ao braço de polaridade celular planar e NFAT5, NFATC4 e PLCG2 pertencem ao braço WNT/Ca²⁺.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS DE WT1

A análise das 4 isoformas nos 3 componentes de TW, no rim normal e fetal mostrou algumas alterações quanto a ausência ou presença das isoformas de WT1 nos diferentes componentes de algumas amostras. No entanto, não foi observado nenhum padrão característico quanto ao componente (Figura 18), e sim padrão específico de cada tumor, independente do componente analisado, como é o caso dos 2 componentes do mesmo tumor, conforme Tabela 9.



Legenda: **A:** KTS do WT1. **B:** Exon 5 do WT1. M: Marcador. Amostras: 1-WB1, 2-WB2, 3-WB4, 4-WB7, 5-WB11, 6-WB20, 7-WM7.

Figura 17 - Gel de poliacrilamida 8%.

Tabela 9 - Distribuição das isoformas do WT1 em todas as amostras.

Amostras	Variantes WT1	Amostras	Variantes WT1
WB1	A/B/C/D	WM27	*1
WB2	A/B/C/D	WM28	C
WB3	A/B/C/D	WE15	A/B
WB4	A/B/C/D	WE17	*1
WB5	A/B/C/D	WE18	A/B/C/D
WB7	A/B/C/D	WE19	D
WB16	*1	WE26	A/B/C/D
WB20	A/B/C/D	WE27	*1
WB27	*1	WE30	A/B/C/D
WB39	*1	KN2	A/B/C/D
WB40	*1	KN13	A/B
WM7	A/B/C/D	KN15	B/D
WM20	A/B/C/D	FK1	A/B/C/D

Legenda:*1: as reações deverão ser repetidas para confirmação de amplificação de bandas inespecíficas ou da ausência de amplificado. FK1: *pool* de rins de fetos com 16 a 32 semanas de idade (colaboração AMC Medical School Amsterdam-Neetherlands).

6 DISCUSSÃO

Estudos de expressão gênica em larga escala são de extrema importância porque são capazes de revelar o comportamento de um conjunto de genes que pode estar envolvido num determinado processo. Nesse estudo, nós utilizamos cDNA *microarray* contendo 4.608 genes humanos para caracterizar o padrão de expressão gênica dos três componentes histologicamente distintos do TW. Essa análise revelou vários grupos de genes desregulados entre os componentes.

As células do componente blastematoso são indiferenciadas em relação às células dos componentes epitelial e estromal. Morfologicamente, as células do componente epitelial são muito parecidas com as células epiteliais renais, e as células do componente estromal são semelhantes ao estroma renal, enquanto que as células do componente blastematoso preservam a morfologia de pequenas células redondas e azuis, típicas de células mais indiferenciadas. O número de genes diferencialmente expressos na comparação entre os componentes blastematoso e estromal foi muito maior (365 genes) do que na comparação entre os componentes blastematoso e epitelial (115 genes). Com base nessas considerações, é possível especular que a alteração da expressão dos genes no clone que dará origem aos componentes com predomínio blastematoso ocorre mais precocemente do que no clone que dará origem aos tumores com predomínio de componente estromal e epitelial. Essa observação vai ganhar mais credibilidade quando os componentes forem comparados com o padrão

de expressão do rim normal. Considerando a morfologia, os componentes estromal e epitelial são bastante distintos. No entanto, por serem estruturas mais diferenciadas, o número de genes diferencialmente expressos foi o menor (72), sendo que um número muito grande de genes são comumente regulados entre eles quando ambos são comparados ao componente blastematoso.

As análises dadas pelo GO indicaram que as comparações entre os componentes blastematoso *versus* estromal e *versus* epitelial mostram que há um número maior de processos biológicos comuns envolvidos sugerindo que o componente blastematoso difere dos componentes estromal e epitelial, ao menos em parte, por processos biológicos similares.

Genes de ciclo e proliferação celular (CCNE1, CCNA2, MCM4) se mostraram super-expressos no componente blastematoso em relação aos outros dois componentes e genes de diferenciação celular (DUSP10, HRAS, SFRP2, NFAT5, PRKCBP1, PRICKLE1), encontrados diferencialmente expressos nas comparações entre os componentes blastematoso e epitelial e/ou blastematoso e estromal, o que já era esperado. O gene CCNE1 (ciclina E1) se apresentou altamente expresso no componente blastematoso tanto em relação ao componente epitelial quanto em relação ao componente estromal. CCNE1 foi sugerido como determinante do potencial metastático em células de carcinoma de mama e o seu aumento progressivo de expressão foi associado ao aumento do estadió e ao grau tumoral, sugerindo ser um marcador potencial para prognóstico (OMIM).

O gene WHSC1 (*Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1*) foi primeiramente associado à síndrome de Wolf Hirschhorn e tem alta similaridade ao domínio SET de drosófila, que é encontrado em proteínas envolvidas no desenvolvimento embrionário. É preferencialmente expresso em tecidos embrionários de crescimento rápido, num padrão que corresponde aos órgãos afetados por pacientes com a síndrome de Wolf Hirschhorn (OMIM), na qual são observadas várias anomalias, entre elas retardo de crescimento pré e pós-natal, retardo mental e má-formações do sistema urogenital. Em uma análise feita com 5 fetos que apresentavam essa síndrome, foi observado que o rim foi o único órgão visceral constantemente afetado em todos os fetos, apresentando uma hipoplasia renal maior sem lobulação, conseqüente de uma oligonefrosia, provavelmente decorrente da não maturação do blastema metanéfrico (TACHDJIAN et al. 1992). Este gene se mostrou altamente expresso no componente blastematoso em relação aos outros dois componentes, havendo uma pequena tendência de maior expressão do componente epitelial em relação ao estromal. O nível de expressão desse gene nos dois componentes é pouco mais elevado do que no rim normal, dado observado na comparação desses componentes com a amostra-referência. Com base nesses dados, é possível especular que o fato da expressão desse gene estar mais alta no componente blastematoso pode ser um indicativo de sua importância no processo de amadurecimento das células blastematosas. Quando esse processo é interrompido, pode dar origem aos restos nefrogênicos e ao componente blastematoso do TW. LI et al. (2005) mostrou

que esse gene está super-expresso em TWs, principalmente os que mostram anaplasia, quando comparados com rim fetal. O aumento de expressão de WHSC1 foi recentemente associado com pior prognóstico em mieloma múltiplo (STERWART et al. 2004).

O gene PROM1 (CD133) está super-expresso no componente blastematoso na comparação com os componentes epitelial e estromal. Esse gene é considerado marcador de uma sub-população de células circulantes, que quando colocadas em co-cultura com células miogênicas ou quando expostas *in vitro* a células produtoras de WNTs, sofrem miogênese (TORRENTE et al. 2004). Considerando o subtipo rabdomioblástico de TW, o gene PROM1 poderia ser o responsável pela ativação das vias que resultariam nesse fenótipo. Como estão super-expressos nas células blastematosas, e essas células têm alta capacidade de replicação, poderíamos sugerir que as células blastematosas sejam as *stem cells* do TW, e, portanto, as células mantedoras do tumor. Apenas algumas células de tumor cerebral expressam PROM1. Essas células foram consideradas as *stem cells* desse tipo tumoral porque têm capacidade de renovação e exata recapitulação do tumor original (SINGH et al. 2003), sendo que somente elas foram capazes de formar um tumor cerebral em ratos NOD-SCID (SINGH et al. 2004).

No rim adulto, o epitélio renal normal provém de duas fontes: o sistema de ductos coletores vem da arborização de um tubo uretérico inicialmente sem ramificação, de maneira similar a outros órgãos glandulares, enquanto que o epitélio do néfros nasce de uma transição

mesênquima-epitélio, num processo muito mais complexo. Ambos os tipos de desenvolvimento requerem controle da proliferação celular, interação célula-célula e célula-matriz, atividade proteásica entre outros (DAVIES et al. 1999). Ambos os tipos de desenvolvimento requerem controle da proliferação celular, interação célula-célula e célula-matriz, atividade proteásica entre outras (DAVIES et al. 1999). Muitos dos genes da diferenciação do epitélio dos néfrons desempenham papel importante nos TWs como o WT1 e o IGF2. Aparentemente, o componente epitelial do TW imita o epitélio glomerular, formado a partir da interação mesênquima-epitélio, e não o epitélio dos túbulos renais.

Algumas moléculas regulatórias são cruciais para o desenvolvimento do rim, tanto em homens quanto em ratos: WT1, PAX2, RET e GDNF (BATES 2000). Nenhum desses genes está representado na lâmina, mas o PAX2, detectado no ducto mesonéfrico caudal, tubo uretérico e mesênquima condensado induzido pelo tubo, age sinergicamente ao PAX8 na diferenciação das células da tireóide (BOUCHARD et al. 2002), e está imobilizado na lâmina. Apesar de estarem envolvidos com a diferenciação das células da tireóides, PAX8 não mostrou diferença de expressão em nenhuma das comparações.

Coincidente com a formação dos elementos epiteliais, particularmente os néfrons, ocorre a vascularização do rim por angiogênese e vasculogênese, que envolve vários grupos de moléculas com atividades interligadas, e regulam, de certa maneira, a diferenciação e maturação dos rins. Essas moléculas incluem moléculas de matriz extracelular e seus

receptores, proto-oncogenes e fatores de transcrição (WALLNER et al. 1997). Na comparação entre os componentes blastematoso e estromal, foram encontradas super-expressas no componente estromal proteínas de matriz extracelular como MMP13, ECM2, KLK4 e proto-oncogenes como RAP2C, RAB31, RABL3, H-RAS. MMP13 está envolvida com a degradação de matriz celular durante o desenvolvimento osteogênico (INADA et al.2004). Aparentemente a proteína ECM2 tem papel no reconhecimento da interação célula-célula e/ou célula matriz (NISHIU et al. 1998). KLK4 é o único membro da família das kaliceínas com localização intracelular (nuclear) regulada por andrógenos e com expressão específica em próstata. Está associada com as formas mais agressivas de câncer de ovário e com a resistência a paclitaxel nesses tumores, sendo que esse mecanismo ainda não foi descrito (OBIEZU et al. 2001; XI et al. 2004, XI et al. 2004). O componente estromal é reconhecidamente resistente ao tratamento quimioterápico, uma vez que não há diminuição da massa tumoral ocorrendo muitas vezes uma diferenciação celular para rabiomioblastos (SABA et al. 1998). Com essas evidências, talvez o gene KLK4 tenha um papel importante no mecanismo da resistência de alguns tumores ao paclitaxel. H-RAS parece ser importante para a hipertrofia e crescimento compensatório renal pós-natal (SAWCZUK et al. 1988), o que está em acordo com o achado de que está super-expresso no componente estromal. Os outros proto-oncogenes citados não tem a função descrita no NCBI.

DAVIES et al. (1999) resumiram numa revisão os genes que foram descritos na literatura como estando envolvidos com o desenvolvimento

renal normal, dos quais 9 estão presentes na lâmina (GDNF1, TGF α , TIMP2, LIF, SFRP1, SFRP2, NOTCH1, NOTCH2, JAGGED1). Desses, GDNF1, LIF, JAGGED1, NOTCH1 e NOTCH2 não apresentaram diferença de expressão entre os componentes. Dois genes são descritos como estando envolvidos na formação do estroma renal: TGF α e TIMP2. TGF α está super-expresso no componente blastematoso na comparação entre os componentes blastematoso e epitelial. TIMP2 está super-expresso no componente estromal nas duas comparações que envolvem esse componente.

Vários membros das famílias das vias de sinalização celular foram descritos como estando envolvidos na nefrogênese (PERANTONI 2003). As vias, que apresentaram um maior número relativo de genes diferencialmente expressos nos nossos resultados foram as vias de diferenciação celular WNT e Fosfatidilinositol.

A via Fosfatidilinositol parece estar envolvida com a diferenciação dos túbulos renais (KHWAJA et al. 1998), especificamente na transição mesênquima-epitélio (Peinado et al. 2003). BENTORE et al. (2003) sugeriram que o gene WT1 é alvo dessa via.

A literatura sugere que a via clássica WNT esteja envolvida na tumorigênese dos TWs, uma vez que descreve a β -catenina, seu efetor central, como estando com expressão anômala nesses tumores. As vias não canônicas da WNT (que não tem a β -catenina agindo como fator de transcrição) também já foram sugeridas como sendo importantes para a tumorigênese do câncer colorretal, pela análise de expressão do gene

SFRP1, que é um inibidor dessa via (CALDWELL et al. 2004). Elas também podem ser importantes para a tumorigênese dos TWs já que alguns dos genes pertencentes a elas estão diferencialmente expressos, e dentre ele, o próprio SFRP1. Os resultados desse trabalho mostra que pelo menos 11 genes das vias WNTs estão desregulados entre os componentes dos TWs. Além disso, esses genes diferencialmente regulados foram capazes de discriminar os três componentes perfeitamente, sugerindo um papel importante desses genes durante a formação do tumor e conseqüentemente o desenvolvimento do rim. As SFRPs regulam o desenvolvimento do rim normal. A proteína SFRP1 está distribuída pelo estroma cortical e medular nos metanefros e ausente no mesênquima condensado e no epitélio tubular primitivo do néfrom em desenvolvimento, onde WNT4 é altamente expresso. Já a proteína SFRP2 é expressa nos túbulos primitivos. Tanto a formação dos túbulos e a arborização dos ductos coletores são inibidas por SFRP1 e a adição de SFRP2 induz esses dois processos (YOSHINO et al. 2001). SFRP1 e SFRP2 estão super-expressos no componente epitelial na comparação entre os componentes blastematoso e epitelial, e SFRP2 está super-expresso no componente estromal na comparação entre os componentes blastematoso e estromal. Não há diferença de expressão dessas proteínas na comparação entre os componentes estromal e epitelial, indicando que são proteínas de estágios mais tardios da diferenciação celular. Na tentativa de verificar em qual dos componentes a via de sinalização WNT está mais ativada nós verificamos os genes alvos da β -

catenina, que seriam ativados por ela, no caso da proteína estar indo até o núcleo e ativando a transcrição.

Apesar de estar entre os tumores sólidos mais freqüentes da infância, os TWs têm uma incidência baixa. Como atual protocolo brasileiro de tratamento, a maioria desses pacientes recebe quimioterapia pré-operatória, tornando inviável um estudo em que se use exclusivamente amostras sem tratamento quimioterápico, justificando o uso, nesse trabalho, de amostras que receberam ou não quimioterapia.

Apesar de terem sido usadas amostras com quimioterapia e amostras que não receberam a quimioterapia, quando foi realizada a clusterização dos componentes, dois a dois, os genes diferencialmente expressos foram capazes de discriminar os componentes com perfeição, em todas as comparações, independente do tratamento, sugerindo que a expressão diferencial dos componentes ainda é maior que a alteração da expressão pela quimioterapia.

Pode ser observada a influência do tratamento quimioterápico no cluster que usou todos os genes diferencialmente expressos em todas as comparações para discriminar as amostras. Nesse cluster, as amostras do componente epitelial se dividiram agrupando-se nos dois principais ramos, do componente blastematoso e do componente estromal. Essa divisão ocorreu segundo o tratamento quimioterápico. As amostras que não receberam quimioterapia ficaram no ramo do componente blastematoso e amostras que receberam quimioterapia ficaram no ramo do componente estromal, sugerindo que apesar de manter as mesmas características

morfológicas, o padrão de expressão gênica do componente epitelial é alterado a ponto de se tornar mais próximo do componente estromal, no caso das amostras com quimioterapia, e também com o componente blastematoso, amostras sem quimioterapia prévia. Esses dados refletem que apesar de morfologicamente o componente epitelial apresentar a mesma característica entre as diferentes amostras, eles alteram muito o padrão de expressão gênica quando considerado todos os genes desregulados entre os componentes. Infelizmente, não pudemos identificar o paciente em uma das amostras usadas nesse projeto. Considerando que essa amostra se agrupou no ramo das amostras do componente estromal, poderíamos inferir que o componente epitelial do paciente sem informação clínica, deve ter recebido quimioterapia pré-operatória.

RIGOLET et al. (2001) analisou o perfil de expressão gênica de 5 TWs usando a técnica de cDNA *microarray* e ao comparar os padrões de expressão desses tumores, encontrou apenas 13% (de 588 genes) dos genes desregulados foram comuns em pelo menos 3 tumores, e concluiu que esse achado é decorrência da heterogeneidade das amostras, uma vez que eles usaram um TW anaplásico, um TW multicístico e fibromatoso, um TW com predomínio epitelial e 2 TWs com predomínio blastematoso.

Até onde sabemos, todos os trabalhos publicados na literatura em que se analisa TWs por cDNA *microarray*, analisaram TWs favoráveis e desfavoráveis com o objetivo de encontrar genes marcadores de prognóstico (TAKAHASHI et al. 2002; WILLIAMS et al. 2004; LI et al. 2005), e em relação ao *status* de WT1 (com ou sem mutação) com o objetivo de encontrar genes

regulados por esse gene nos TWs (SCHUMACHER et al. 2003). Nenhum desses trabalhos analisa os componentes separadamente. Ainda assim, o gene CRABP2 que foi encontrado com super-expressão nos TWs de pacientes que tinham pior prognóstico, e esse gene foi encontrado com tendência a super-expressão no componente blastematoso em relação ao componente epitelial. Esses dados de certa forma apresentam concordância uma vez que o componente blastematoso apresenta maior possibilidade de emitir metástases.

O gene WT1 tem papel fundamental durante o desenvolvimento do rim e se apresenta em quatro diferentes isoformas. No rim adulto, este gene continua funcionando nos glomérulos, uma vez que é expresso nos podócitos. Alterações de WT1 podem resultar num largo espectro de patologias do trato genito-urinário, que vão desde o desenvolvimento de TWs, ausência dos rins até displasia gonadal severa (MENKE e SCHEDL 2003). Alterações da proteína do WT1 estão diretamente relacionadas à maior probabilidade de desenvolvimento de TW e mutações na sua seqüência genômica é um evento relativamente raro, BAUDRY et al (2000) analisaram o padrão de expressão das diferentes isoformas do WT1 e encontraram quase 90% dos TWs tinham um desbalanço da expressão de WT1, através de RT-PCR em tempo real, mas não conseguiram descrever nem o mecanismo nem a consequência desse desbalanço. Esses dados sugerem que tanto a seqüência genômica do WT1 deve estar correta quanto deve haver um balanceamento extremamente fino das isoformas para que sua função seja realizada com perfeição.

As análises das quatro isoformas do WT1 nos três componentes dos TWs realizadas nesse trabalho tiveram a intenção de verificar se essas estavam presentes em todos os componentes, ou se apresentavam um padrão característico para cada componente em relação ao rim normal e fetal. Nossos dados mostraram que as 4 formas estavam presentes em todos os componentes, não apresentando nenhum padrão característico de cada um. No entanto, o fato das 4 isoformas serem expressas nos componentes e no rim normal, não descarta a possibilidade de balanceamento distinto entre elas nos diferentes componentes, porém isso só poderia ser analisado através da realização da RT-PCR em tempo real.

Em cinco amostras (WB16, WB27, WB39, WB40, WM27) não houve amplificação das seqüências que identificam a presença e a ausência do KTS mas houve amplificação da região que identifica o *splicing* alternativo do exon 5 (exons 4 e 6), sugerindo que a região de ligação dos *primers* para identificação do *splicing* alternativo KTS (exons 9 e 10) esteja deletada. Uma amostra (WE17) não amplificou nenhuma das bandas do exon 5 e amplificou a banda da ausência do KTS, sugerindo que essa amostra existe uma região do WT1 deletada que engloba os exons 2 e 6, e não está ocorrendo a retirada do KTS pelo *splicing* alternativo. Uma outra amostra (WE27) amplificou apenas a banda de ausência do exon 5, sugerindo que não esteja ocorrendo a inserção do exon 5 pelo *splicing* alternativo e que a região próxima ao KTS esteja deletada (exons 9 e 10). Essas são considerações que devem ser confirmadas por sequenciamento.

Apesar de não ter sido detectado nenhum padrão característico de isoformas de WT1 para cada componente, mutações nesse genes estão associadas a TWs com predomínio do componente estromal (SCHUMACHER et al. 1997). SIMMS et al. (1995) encontrou diferença de expressão por RT-PCR em tempo real no *splicing* alternativo do exon 5, quando comparou TWs esporádicos com rins normais pareados, resultando em maior número de transcritos sem o exon 5 nos TWs. TWs trifásicos e TWs com predomínio do componente blastematoso foram os que apresentaram o maior número de transcritos de WT1 sem o exon 5.

A literatura sugere que os TWs, assim como todos os tumores embrionários, tenham se originado como consequência de uma falha dos genes durante o processo de diferenciação celular (DEHNER 1998), porém alguns tumores, como o TW, mantêm em parte seu potencial proliferativo e de diferenciação, sem que haja um controle desse processo. Como consequência, resultaria em diversos níveis de diferenciação celular, desde células mais indiferenciadas (células blastematosas) até células quase maduras (células epiteliais), e por isso, a sua complexidade morfológica. Os TWs são tumores embrionários didáticos por apresentar células com morfologias suficientemente diferentes, representando de forma clara diversas fases da nefrogênese. Um paralelo entre a embriogênese e a tumorigênese poderia facilitar o encontro dos pontos importantes em que ocorre a interrupção do processo normal de desenvolvimento e se inicia a transformação maligna.

A caracterização molecular dos 3 componentes apresenta importância clínica, uma vez que o prognóstico baseia-se na histologia dos TW segundo protocolo SIOP 2001 estabelecido, o qual é seguido pelo Europa e Brasil. Uma análise mais detalhada nos genes mais expressos no componente blastematoso, que quando não responde a quimioterapia é o de pior prognóstico, pode ter importância na pesquisa de resistência a drogas e de alvos terapêuticos.

Para melhor caracterização dos aspectos moleculares do paralelo que existe entre nefrogênese e tumorigênese do TW, será necessário ainda comparar esses dados com o padrão de expressão gênica dos diferentes rins rins fetais e normais, dados que estão sendo gerados por nosso grupo e poderão contribuir para uma melhor compreensão desse processo.

7 CONCLUSÕES

7.1 É notável que os perfis moleculares dos 3 componentes dos TWs são diferentes entre si. Ao se observar o número de genes diferencialmente expressos entre eles, torna-se evidente que o componente blastematoso é mais distinto do componente estromal do que do componente epitelial, e essa diferença é menor entre os componentes estromal e epitelial.

7.2 A via de sinalização celular WNT parece ser importante na determinação do fenótipo celular dos componentes de TW uma vez apenas os genes diferencialmente regulados dessa via são capazes de discriminar os diferentes componentes dos TWs.

7.3 As 4 isoformas de WT1 apresentam padrão característico dependente do tumor e não do componente histológico do mesmo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne et al. Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project. **Science** 1991; 252: 1651-1656.

Agaton C, Unneberg P, Sievertzon M, et al. Gene expression analysis by signature pyrosequencing. **Gene** 2002; 289:31-9.

Allsbrook WC Jr, Boswell WC Jr, Takahashi H et al. Recurrent renal cell carcinoma arising in Wilms' tumor. **Cancer** 67: 690-5.

Andersen SR, Geertinger P, Larsen HW, Mikkelsen M, Vestermark S, Warburg M. P 11 deletion syndrome. Aniridia, urogenital malformation and mental Retardation. **Ugeskr Laeger** 1978; 140: 2112.

Bates CM. Kidney development: regulatory molecules crucial to both mice and men. **Mol Genet Metab** 2000; 71: 391-6.

Baudry D, Hamelin M, Cabanis MO et al. WT1 splicing alterations in Wilms' tumors. **Clin Cancer Res** 2000; 6: 3957-65.

Beckwith JB, Kiviat NB, Bonadio JF. Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' tumor. **Pediatr Pathol** 1990; 10:1-36.

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

Beckwith JB. Macroglossia, omphalocele, adrenal cytomegaly, gigantism and hiperplastic visceromegaly. **Birth Defects** 1969; 41:188-96.

Beckwith JB. Nephrogenic rests and the pathogenesis of Wilms tumor: developmental and clinical considerations. **Am J Med Genet** 1998; 79:268-73.

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

Beckwith JB. Wilms' tumor and other renal tumors of childhood: a selective review from the National Wilms' Tumor Study Pathology Center. **Hum Pathol** 1983; 14:481-92.

Beniers AJ, Efferth T, Fuzesi L, Granzen B, Mertens R, Jakse G. p53 expression in Wilms' tumor: a possible role as prognostic factor. **Int J Oncol** 2001; 18:133-9.

Bentov I, LeRoith D, Werner H. The WT1 Wilms' tumor suppressor gene: a novel target for insulin-like growth factor-I action. **Endocrinology** 2003; 144: 4276-9.

Birch JM, Alston RD, McNally RJ, et al. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. **Oncogene** 2001; 20:4621-8.

Bonafoux B, Lejeune M, Piquemal D et al. Analysis of remnant reticulocyte mRNA reveals new genes and antisense transcripts expressed in the human erythroid lineage. **Haematologica** 2004; 89: 1434-8.

Bouchard M, Souabni A, Mandler M, Neubuser A, Busslinger M. Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. **Genes Dev** 2002; 16: 2958-70.

Breslow NE, Olson J, Moksness J, Beckwith JB, Grundy P. Familial Wilms' tumor: a descriptive study. **Med Pediatr Oncol** 1996; 27:398-403.

Brown KW, Malik KT. The molecular biology of Wilms tumour. **Expert Rev Mol Med** 2001; 2001:1-16.

Bruening W, Pelletier J. A non-AUG translational initiation event generates novel WT1 isoforms. **J Biol Chem** 1996; 271: 8646-54.

Caldwell GM, Jones C, Gensberg K et al. The Wnt antagonist sFRP1 in colorectal tumorigenesis. **Cancer Res** 2004; 64: 883-8.

Call KM, Glaser T, Ito CY, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. **Cell** 1990; 60:509-20.

Camargo AA, Samaia HP, Dias-Neto E et al. The contribution of 700,000 ORF sequence tags to the definition of the human transcriptome. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98: 12103-8. Erratum in: **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2004; 101: 414.

Carraro DM, Sredni, ST, Maschietto M, Castro NP, De Camarto C, Brentani HP. Aplicações da Tecnologia de Microarrays na Oncologia Clínica. **Biosci J**. *In press*.

Carraro DM, Brentani HP, Soares FA, Reis LFL, Brentani RR. From tissue samples to tumor markers In: Appasani K. DNA and or Protein arrays or any other new methods. *In press*.

Charles AK, Brown KW, Berry PJ. Microdissecting the genetic events in nephrogenic rests and Wilms' tumor development. **Am J Pathol** 1998; 153:991-1000.

Chatten J. Epithelial differentiation in Wilms' tumor: a clinicopathologic appraisal. **Perspect Pediatr Pathol** 1976; 3: 225-54.

Cheah PL, Looi LM, Chan LL. Immunohistochemical expression of p53 proteins in Wilms' tumour: a possible association with the histological prognostic parameter of anaplasia. **Histopathology** 1996; 28:49-54.

Chen S, Jim B, Ziyadeh FN. Diabetic nephropathy and transforming growth factor-beta: transforming our view of glomerulosclerosis and fibrosis build-up. **Semin Nephrol** 2003; 23: 532-43.

Cheng J, Grande JP. Transforming growth factor-beta signal transduction and progressive renal disease. **Exp Biol Med** 2002; 227: 943-56

Copland JA, Luxon BA, Ajani L et al. Genomic profiling identifies alterations in TGFbeta signaling through loss of TGFbeta receptor expression in human renal cell carcinogenesis and progression. **Oncogene** 2003; 22: 8053-62.

Davies JA, Perera AD, Walker CL. Mechanisms of epithelial development and neoplasia in the metanephric kidney. *Int J Dev Biol* 1999; 43: 473-8.

De Camargo B. **Sobrevida e mortalidade da criança e adolescente com câncer: 25 anos de experiência em uma instituição brasileira**. São Paulo; 2003. [Tese de Livre Docência-Fuaculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Dehner LP. The evolution of the diagnosis and understanding of primitive and embryonic neoplasms in children: living through an epoch. **Mod Pathol** 1998; 11:669-85.

Dejong V, Degeorges A, Filleur S et al. The Wilms' tumor gene product represses the transcription of thrombospondin 1 in response to overexpression of c-Jun. **Oncogene** 1999; 18: 3143-51.

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

Drash A, Sherman F, Hartmann WH, Blizzard RM. A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, hypertension, and degenerative renal disease. **J Pediatr** 1970; 76:585-93.

Ellisen LW, Carlesso N, Cheng T, Scadden DT, Haber DA. The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. **EMBO J** 2001; 20:1897-909.

Englert C, Vidal M, Maheswaran S, Ge et al. Truncated WT1 mutants alter the subnuclear localization of the wild-type protein. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1995; 92:11960-4.

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

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.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell** 1990; 61:759-67.

Ferreira EN, Pires LC, Parmigiani RB et al. Identification and complete sequencing of novel human transcripts through the use of mouse orthologs and testis cDNA sequences. **Genet Mol Res** 2004; 3:493-511.

Francke U, Holmes LB, Atkins L, Riccardi VM. Aniridia-Wilms' tumor association: evidence for specific deletion of 11p13. **Cytogenet Cell Genet.** 1979; 24: 185-92.

Franco EL, de Camargo B, Saba L, Marques LA. Epidemiological and clinical correlations with genetic characteristics of Wilms' tumor: results of the Brazilian Wilms' Tumor Study Group. **Int J Cancer** 1991; 48:641-6.

Fukuzawa R, Heathcott RW, Sano M, Morison IM, Yun K, Reeve AE. Myogenesis in Wilms' tumors is associated with mutations of the WT1 gene and activation of Bcl-2 and the Wnt signaling pathway. **Pediatr Dev Pathol** 2004; 7: 125-37.

Gessler M, Konig A, Bruns GA. The genomic organization and expression of the WT1 gene. **Genomics** 1992; 12: 807-13.

Ghanem MA, Van der Kwast TH, Den Holleer JC, et al. Expression and prognostic value of Wilms' tumor 1 and early growth response 1 proteins in nephroblastoma. **Clin Cancer Res** 2000; 6:4265-71.

Glisin V, Crkvenjakov R, Byus C. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. **Biochemistry** 1974; 13:2633-7.

Gomes LI, Silva RL, Stolf BS, et al. Comparative analysis of amplified and nonamplified RNA for hybridization in cDNA microarray. **Anal Biochem** 2003; 321:244-51.

Grundy PE, Telzerow PE, Breslow N, Moksness J, Huff V, Paterson MC. Loss of heterozygosity for chromosomes 16q and 1p in Wilms' tumors predicts an adverse outcome. **Cancer Res** 1994; 54:2331-3.

Haber DA, Buckler AJ. WT1: a novel tumor suppressor gene inactivated in Wilms' tumor. **New Biol** 1992; 4:97-106.

Hammerman MR. Growth factors in renal development. **Semin Nephrol** 1995; 15: 291-9.

Hanna W, Kahn HJ, Trudeau M. Evaluation of HER-2/neu (erbB-2) status in breast cancer: from bench to bedside. **Mod Pathol** 1999; 12:827-34.

Hastie ND. The genetics of Wilms tumor: a case of disrupted development. **Annu Rev Genet** 1994; 28:523-58.

Hirose M. The role of Wilms' tumor genes. **J Med Invest** 1999; 46:130-40.

Hosono S, Luo X, Hyink DP et al. WT1 expression induces features of renal epithelial differentiation in mesenchymal fibroblasts. **Oncogene** 1999; 18: 417-27.

Inada M, Wang Y, Byrne MH et al. Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004; 101: 17192-7.

Innis MD. Nephroblastoma: index cancer of childhood. **Med J Aust** 1973; 2:322-3.

Jarvinen TA, Tanner M, Rantanen V et al. Amplification and deletion of topoisomerase IIalpha associate with ErbB-2 amplification and affect

sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. **Am J Pathol** 2000; 156: 839-47.

Jenkins MC, Allibone EB, Berry PJ. Neuroglial tissue in partially cystic Wilms' tumour. **Histopathology** 1991; 18: 309-13.

Junien C, Turleau C, de Grouchy J et al. Regional assignment of catalase (CAT) gene to band 11p13. Association with the aniridia-Wilms' tumor-Gonadoblastoma (WAGR) complex. **Ann Genet** 1980; 23: 165-8.

Kaneko Y, Homma C, Maseki N, Sakurai M, Hata J. Correlation of chromosome abnormalities with histological and clinical features in Wilms' and other childhood renal tumors. **Cancer Res** 1991; 51: 5937-42.

Khwaja A, Lehmann K, Marte BM, Downward J. Phosphoinositide 3-kinase induces scattering and tubulogenesis in epithelial cells through a novel pathway. **J Biol Chem** 1998; 273: 18793-801.

Kim J, Prawitt D, Bardeesy N et al. The Wilms' tumor suppressor gene (wt1) product regulates Dax-1 gene expression during gonadal differentiation. **Mol Cell Biol** 1999; 19: 2289-99.

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; 22:287-94.

Knudson AG Jr, Strong LC. Mutation and cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney. **J Natl Cancer Inst** 1972; 48: 313-24.

Knudson AG, Jr, Strong LC. Mutation and cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney. **J Natl Cancer Inst** 1972; 48:313-24.

Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1971; 68:820-3.

Kodet R, Marsden HB. Papillary Wilms' tumour with carcinoma-like foci and renal cell carcinoma in childhood. **Histopathology** 1985; 9: 1091-102.

Koesters R, Niggli F, von Knebel Doeberitz M, Stallmach T. Nuclear accumulation of beta-catenin protein in Wilms' tumours. **J Pathol** 2003; 199: 68-76.

Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A, et al. Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. **Cancer Res** 1999; 59:3880-2.

Koseki C, Herzlinger D, al-Awqati Q. Apoptosis in metanephric development. **J Cell Biol** 1992; 119: 1327-33.

Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, et al. WT-1 is required for early kidney development. **Cell** 1993; 74:679-91.

Kurella M, Hsiao LL, Yoshida T, et al. DNA microarray analysis of complex biologic processes. **J Am Soc Nephrol** 2001; 12:1072-8.

Kusafuka T, Miao J, Kuroda S, Udatsu Y, Yoneda A. Codon 45 of the beta-catenin gene, a specific mutational target site of Wilms'tumor. **Int J Mol Med** 2002; 10:395-9.

Kuure S, Vuolteenaho R, Vainio S. Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. **Mech Dev** 2000; 92: 31-45.

Laity JH, Dyson HJ, Wright PE. Molecular basis for modulation of biological function by alternate splicing of the Wilms' tumor suppressor protein. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2000; 97: 11932-5.

Lakhani SR, Ashworth A. Microarray and histopathological analysis of tumors: the future and the past? **Nat Rev Cancer** 2001; 1:151-7.

Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature** 2001; 409:860-921.

Lee SB, Huang K, Palmer R et al. The Wilms tumor suppressor WT1 encodes a transcriptional activator of amphiregulin. **Cell** 1999; 98: 663-73.

Levi F, La Vecchia C, Lucchini F, Negri E, Boyle P. Patterns of childhood cancer mortality: America, Asia and Oceania. **Eur J Cancer** 1995; 31A: 771-82.

Lewis WH, Yeger H, Bonetta L et al. Homozygous deletion of a DNA marker from chromosome 11p13 in sporadic Wilms tumor. **Genomics** 1988; 3: 25-31.

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.

Little J. **Epidemiology of childhood cancer**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization; 1999. Introduction; p.1-9. (IARC Scientific Publications no. 149).

Little M, Wells C. A clinical overview of WT1 gene mutations. **Hum Mutat** 1997; 9:209-25.

Little SE, Hanks SP, King-Underwood L, et al. Frequency and heritability of WT1 mutations in nonsyndromic Wilms' tumor patients: a UK Children's Cancer Study Group Study. **J Clin Oncol** 2004; 22:4140-6.

Loeb DM, Sukumar S. The role of WT1 in oncogenesis: tumor suppressor or oncogene? **Int J Hematol** 2002; 76:117-26.

Mannens M, Slater RM, Heyting C et al. Molecular nature of genetic changes resulting in loss of heterozygosity of chromosome 11 in Wilms' tumours. **Hum Genet** 1988; 81: 41-8.

Mannens M, Slater RM, Heyting C et al. Regional localization of DNA probes on the short arm of chromosome 11 using aniridia-Wilms' tumor-associated deletions. **Hum Genet** 1987; 75: 180-7.

Martos MC, Olsen JH. Childhood cancer mortality in the European Community, 1950-1989. **Eur J Cancer** 1993; 29A: 1783-9.

Menke AL, Schedl A. WT1 and glomerular function. **Semin Cell Dev Biol** 2003; 14: 233-40.

Mierau GW, Beckwith JB, Weeks DA. Ultrastructure and histogenesis of the renal tumors of childhood: an overview. **Ultrastruct Pathol** 1987; 11: 313-33.

Ministério da Saúde. Funasa-CENEPI. **Sistema de Informações sobre mortalidade-SIM**. Disponível em: <URL:<http://datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?IDB2000/c07.def>> [2001 Ago 20].

Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. **Science** 2002; 296:1644-6.

Mrowka C, Schedl A. Wilms' tumor suppressor gene WT1: from structure to renal pathophysiologic features. **J Am Soc Nephrol** 2000; Suppl 16:S106-15.

Narahara K, Kikkawa K, Kimira S et al. Regional mapping of catalase and Wilms tumor--aniridia, genitourinary abnormalities, and mental retardation triad loci to the chromosome segment 11p1305-p1306. **Hum Genet** 1984; 66: 181-5.

Nicholson GW. An embryonic tumor of the kidney in a foetus. **J Pathol Bacteriol** 1931; 34:711-30.

Nishiu J, Tanaka T, Nakamura Y. Identification of a novel gene (ECM2) encoding a putative extracellular matrix protein expressed predominantly in adipose and female-specific tissues and its chromosomal localization to 9q22.3. **Genomics** 1998; 52: 378-81.

Novoradovskaya N, Whitfield ML, Basehore LS, et al. Universal Reference RNA as a standard for microarray experiments. **BMC Genomics** 2004; 5: 20.

Obiezu CV, Scorilas A, Katsaros D et al. Higher human kallikrein gene 4 (KLK4) expression indicates poor prognosis of ovarian cancer patients. **Clin Cancer Res** 2001; 7:2380-6.

Oh S, Song Y, Yim J, Kim TK. The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. **J Biol Chem** 1999; 274: 37473-8.

[OMIN] Online Mendelian Inheritance in Man. Available from:
[URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi)

Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ, Bieber CA, Terracini B, Young JL. **International incidence of childhood cancer, v. I.** Lyon: Lyon: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization; 1988. (IARC Scientific Publications, 87).

Pastore G, Mosso ML, Magnani C, Luzzatto L, Bianchi M, Terracini B. Physical impairment and social life goals among adult long-term survivors of childhood cancer: a population-based study from the childhood cancer registry of Piedmont, Italy. **Tumori** 2001; 87:372-8.

Peinado H, Quintanilla M, Cano A. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. **J Biol Chem** 2003; 278: 21113-23.

Perantoni AO. Renal development: perspectives on a Wnt-dependent process. **Semin Cell Dev Biol** 2003; 14: 201-8.

Ping AJ, Reeve AE, Law DJ, Young MR, Boehnke M, Feinberg AP. Genetic linkage of Beckwith-Wiedemann syndrome to 11p15. **Am J Hum Genet** 1989; 44:720-3.

Plesko I, Kramarova E, Stiller CA, Coebergh JW, Santaquilani M; EUROCORE Working Group. Survival of children with Wilms' tumour in Europe. **Eur J Cancer** 2001; 37:736-43.

Pollock JD. Gene expression profiling: methodological challenges, results, and prospects for addiction research. **Chem Phys Lipids** 2002; 121:241-56.

Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, et al. The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. **Nature** 1990; 346:194-7.

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

Rahman N, Arbour L, Tonin P, et al. The familial Wilms' tumour susceptibility gene, FWT1, may not be a tumour suppressor gene. **Oncogene** 1997; 14:3099-102.

Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, et al. **Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program: 1975-95**. Bethesda: National Cancer Institute; 1999. Available from: <URL:<http://www.seer.ims.nci.nih.gov>> [2004].

Rigolet M, Faussillon M, Baudry D, Junien C, Jeanpierre C. Profiling of differential gene expression in Wilms tumor by cDNA expression array. **Pediatr Nephrol** 2001; 16: 1113-21.

Rosenfeld C, Cheever MA, Gaiger A. WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of WT1 targeted therapies. **Leukemia** 2003; 17:1301-12.

Russo G, Zegar C, Giordano A. Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. **Oncogene** 2003; 22:6497-507.

Saba LM, de Camargo B, Gabriel-Arana M. Experience with six children with fetal rhabdomyomatous nephroblastoma: review of the clinical, biologic, and pathologic features. **Med Pediatr Oncol** 1998; 30: 152-5.

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

Sawczuk IS, Olsson CA, Buttyan R et al. Gene expression in renal growth and regrowth. **J Urol** 1988; 140:1145-8.

Scharnhorst V, Dekker P, van der Eb AJ, Jochemsen AG. Internal translation initiation generates novel WT1 protein isoforms with distinct biological properties.

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

Sharma PM, Bowman M, Madden SL, Rauscher FJ 3rd, Sukumar S. RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, WT1. **Genes Dev** 1994; 8: 720-31.

Sharpe CR, Franco EL et al. Parental exposures to pesticides and risk of Wilms' tumor in Brazil. **Am J Epidemiol** 1995; 141: 210-7.

Sharpe CR, Franco EL. Use of dipyrrone during pregnancy and risk of Wilms' tumor. Brazilian Wilms' Tumor Study Group. **Epidemiology** 1996; 7: 533-5.

Sim EU, Smith A, Szilagi E, Rae F, Ioannou P, Lindsay MH, Little MH. Wnt-4 regulation by the Wilms' tumour suppressor gene, WT1. **Oncogene** 2002; 21: 2948-60.

Simms LA, Algar EM, Smith PJ. Splicing of exon 5 in the WT1 gene is disrupted in Wilms' tumour. **Eur J Cancer** 1995; 31A: 2270-6. Erratum in: **Eur J Cancer** 1996;32A:185.

Simpson AJ, Reinach FC, Arruda P et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. **Nature** 2000; 406: 151-7.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. **Cancer Res** 2003; 63: 5821-8.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID et al. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature**. 2004; 432: 396-401.

Skotnicka-Klonowicz G, Rieske P, Bartkowiak J, Szymik-Kantorowicz S, Daszkiewicz P, Debiec-Rychter M. Loss of heterozygosity of WT1 gene in the prognosis of sporadic Wilms' tumour in children. **Anticancer Res** 1999; 19:1451-4.

Slater RM, Mannens MM. Cytogenetics and molecular genetics of Wilms' tumor of childhood. **Cancer Genet Cytogenet** 1992; 61: 111-21.

Smith MA, Ries LAG. Childhood cancer: incidence, survival and mortality. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. **Principles and practice of pediatric oncology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p.1-12.

Sredni ST, de Camargo B, Lopes LF, Teixeira R, Simpson A. Immunohistochemical detection of p53 protein expression as a prognostic indicator in Wilms tumor. **Med Pediatr Oncol** 2001; 37:455-8.

Sredni ST, Maschieto M, de Camargo B, Soares FA. Myogenesis in Wilms tumors. (Author reply 670) **Pediatr Dev Pathol**. 2004; 7: 668-9.

Stanhope-Baker P, Williams BR. Identification of connective tissue growth factor as a target of WT1 transcriptional regulation. **J Biol Chem** 2000; 275: 38139-50.

Steenman M, Redeker B, de Meulemeester M et al. Comparative genomic hybridization analysis of Wilms tumors. **Cytogenet Cell Genet** 1997; 77: 296-303.

Steenman M, Westerveld A, Mannens M. Genetics of Beckwith-Wiedemann syndrome-associated tumors: common genetic pathways. **Genes Chromosomes Cancer** 2000; 28:1-13.

Stewart JP, Thompson A, Santra M, Barlogie B, Lappin TR, Shaughnessy J, Jr. Correlation of TACC3, FGFR3, MMSET and p21 expression with the t(4;14)(p16.3;q32) in multiple myeloma. **Br J Haematol** 2004; 126:72-6.

Tachdjian G, Fondacci C, Tapia S, Hutten Y, Blot P, Nessmann C. The Wolf-Hirschhorn syndrome in fetuses. **Clin Genet** 1992; 42: 281-7.

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.

Takahashi M, Yang XJ, Sugimura J et al. Molecular subclassification of kidney tumors and the discovery of new diagnostic markers. **Oncogene** 2003; 22: 6810-8.

Tanaka K, Granata C, Wang Y, O'Briain DS, Puri P. Apoptosis and bcl-2 oncogene expression in Wilms' tumor. **Pediatr Surg Int** 1999; 15:243-7.

Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M et al. Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. **J Clin Invest** 2004; 114:182-95.

Udtha M, Lee SJ, Alam R, Coombes K, Huff V. Upregulation of c-MYC in WT1-mutant tumors: assessment of WT1 putative transcriptional targets using cDNA microarray expression profiling of genetically defined Wilms' tumors. **Oncogene** 2003; 22: 3821-6.

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

Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. **Science** 2001; 291:1304-51. Erratum in: *Science* 2001; 292:1838.

Wallner EI, Carone FA, Abrahamson DR, Kumar A, Kanwar YS. Diverse aspects of metanephric development. **Microsc Res Tech** 1997; 39: 261-84.

Waltzer L, Bienz M. The control of beta-catenin and TCF during embryonic development and cancer. **Cancer Metastasis Rev** 1999; 18:231-46.

Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA, Liu ET, Marincola FM. High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. **Nat Biotechnol** 2000; 18:457-9.

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.

Wiedemann HR. Complexe malformatif familial avec hernie ombilicalie et macroglossie: un syndrome nouveau? **J. Genet Hum** 1964; 13:223-32.

Wigger HJ. Fetal rhabdomyomatous nephroblastoma-a variant of Wilms' tumor. **Hum Pathol** 1996; 7:613-23.

Udtha M, Lee SJ, Alam R, Coombes K, Huff V. Upregulation of c-MYC in WT1-mutant tumors: assessment of WT1 putative transcriptional targets using cDNA microarray expression profiling of genetically defined Wilms' tumors. **Oncogene** 2003; 22: 3821-6.

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

Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. **Science** 2001; 291:1304-51. Erratum in: *Science* 2001; 292:1838.

Wallner EI, Carone FA, Abrahamson DR, Kumar A, Kanwar YS. Diverse aspects of metanephric development. **Microsc Res Tech** 1997; 39: 261-84.

Waltzer L, Bienz M. The control of beta-catenin and TCF during embryonic development and cancer. **Cancer Metastasis Rev** 1999; 18:231-46.

Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA, Liu ET, Marincola FM. High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. **Nat Biotechnol** 2000; 18:457-9.

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.

Wiedemann HR. Complexe malformatif familial avec hernie ombilicalie et macroglossie: un syndrome nouveau? **J. Genet Hum** 1964; 13:223-32.

Wigger HJ. Fetal rhabdomyomatous nephroblastoma-a variant of Wilms' tumor. **Hum Pathol** 1996; 7:613-23.

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: 65-79.

Willis RA. The borderline of embryology and pathology. 2nd ed. London: Butterworths; 1962.

Xi Z, Kaern J, Davidson B, Klokk TI, Risberg B, Trope C, Saatcioglu F. Kallikrein 4 is associated with paclitaxel resistance in ovarian cancer. **Gynecol Oncol** 2004; 94: 80-5.

Xi Z, Kaern J, Davidson B, Klokk TI, Risberg B, Trope C, Saatcioglu F. Kallikrein 4 is associated with paclitaxel resistance in ovarian cancer. **Gynecol Oncol** 2004; 94: 80-5.

Xi Z, Klokk TI, Korkmaz K et al. Kallikrein 4 is a predominantly nuclear protein and is overexpressed in prostate cancer. **Cancer Res** 2004; 64: 2365-70.

Yashima K, Maitra A, Timmons CF, et al. Expression of the RNA component of telomerase in Wilms tumor and nephrogenic rest recapitulates renal embryogenesis. **Hum Pathol** 1998; 29:536-42.

Yoshino K, Rubin JS, Higinbotham KG et al. Secreted Frizzled-related proteins can regulate metanephric development. **Mech Dev** 2001; 102: 45-55.

Young JL, Ries LG, Silverberg E, Horm JW, Miller RW. Cancer incidence, survival and mortality for children younger than 15 years. **Cancer** 1986; 58:598-602.

Yunis JJ, Ramsay NK. Familial occurrence of the aniridia-Wilms tumor syndrome with deletion 11p13-14.1. **J Pediatr** 1980; 96: 1027-30.

Zhuang Z, Merino MJ, Vortmeyer AO, et al. Identical genetic changes in different histologic components of Wilms' tumors. **J Natl Cancer Inst** 1997; 89:1148-52.

Anexo 1 - Gel de Agarose 1%

- 0,30 gramas de agarose
- 30 ml de TAE

Misturar os reagentes, esquentar no microondas até a agarose estar totalmente diluída (cerca de 40 segundos) e transferir para uma cuba de eletroforese.

Aguardar o gel solidificar.

Fundação Antonio Prudente

Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

Anexo 2 - Amplificação de RNA - Baseado em WANG et al. (2000) e modificado conforme GOMES et al. (2003).

Seqüências dos primers (Empresa IDT)

Oligo dT(15)-T7 primer: (5'AAA CGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGC T(15)3')[57-mer]

Oligo dT(24)-T7 primer: (5'GGC CAG TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGG CGG VTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T3')[64-mer]

TS (template switch) oligo primer: (5' AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG 3') [30-mer]

Nota: As incubações são todas feitas em termocicladores.

Para iniciar o experimento, deve-se entrar com 3 a 5 µg de RNA total.

Obs: Gel de agarose para verificar qualidade e integridade do RNA, através da análise das beas correspondentes ao RNA ribossômico 18S e 28S

Primeiro *round* de amplificação

1. Síntese da primeira fita de cDNA:

Tubo de PCR 0,2 ml

Mix:

3-5ug de RNA total (máximo de 6 ul)

H²O DEPC q.s.p. 6ul.

1ul 0,5 ug/ul oligo dT(15)-T7 primer

Incubar 70 °C por 5 minutos

4 °C

1.1. Mix para reação da 1a. fita de cDNA:

4ul 5x First stre buffer

3ul 0,5 ug/ul TS (template switch) primer

2ul 0,1 M DTT

1ul Rnase IN

2ul 10mM dNTP

2ul Superscript II

Spin

Incubar a 42°C por 1 hora no termociclador

Adicionar 1 ul de Superscript II

Incubar a 42o.C por 1 hora

4 °C

2. Síntese da 2a. fita de cDNA:

Mix:

104ul DEPC H²O

15ul Advantage PCR buffer

3ul 10mM dNTP mix

1ul RNase H

5ul Advantage Polymerase

Incubar:

37°C por 10 min para digestão do RNA

94°C por 3 min para denaturação

65°C por 5 min para a ligação dos primers

75°C por 30 min para extensão

Parar a reação com solução de 7,5ul 1M NaOH 2mM EDTA.

Incubar a 65°C por 10 minutos para inativação enzimática

3. Purificação com Fenol : Clorofórmio : Álcool isoamílico

Adicionar 150ul de Ph:chlo:Isoamilico (25:24:1) pH 8.0

Vortex bem e descansar 1min

Centrifugar TA por 10 min a 14000 rpm

Cuidadosamente retirar ≈140ul da fase aquosa

Dispensar em um tubo novo

Adicionar 150ul de Clorofórmio
Vortex bem e descansar 1min
Centrifugar TA por 10 min a 14000 rpm
Cuidadosamente retirar ≈140ul da fase aquosa
Dispensar em um tubo novo

4. Precipitação

Adicionar 70ul de Acetato de sódio (Na₂OAC) 3M, pH 5.2
Adicionar 500 ul de etanol absoluto (-20C)
Vortex bem
Centrifugar a 14000 rpm/ 4°C/ 30min
Remover com a pipeta o sobrenadante e reservar
Lavar 3x com 1ml de etanol 70% DEPC (-20C)
Centrifugar a 14000 rpm/ 4°C/ 5min
Secar a 37°C por 10 min para evaporar o etanol residual
Diluir em 21ul H₂O DEPC e quantificar o dscDNA com diluição 1:100

5. Transcrição in vitro

20μl dscDNA (entrar com máximo de 40μg de cDNA)

Mix:

20ul ds cDNA

15ul of 25mM rNTP (A,G,C e UTP, make it just about to use it)

10ul 5x reaction buffer

5ul enzyme mix (Rnase inhibitor e T7 phage polymerase)

Incubar a 37°C por 5-6hs.

6. Purificação do RNA useo Trizol

(centrifuga refrigerada a 4°C e ETOH a -20°C)

Adicionar 1ml of Trizol em cada tubo.

Adicionar 200 ul clorofórmio por 1 ml de solução de Trizol.

Vortex.

Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.

Centrifugar 12.000g por 15 minutos a 4°C

Transferir a fase aquosa para um novo tubo e adicionar isopropanol na proporção de 1:1 em relação à fase aquosa.

Vortex

Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.

Centrifugar a 14.000 rpm por 15 minutos.

Lavar os pellets 3 vezes com 1 ml de solução 70% ETOH in DEPC

H₂O.

Centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos.

Secar os pellets e ressuspender em 10ul de água DEPC.

Checar a concentração e a qualidade do RNA com espectrofotômetro (OD 260 e OD 280).

Segundo *round* de amplificação (fase exponencial)

7. Síntese da 1a. fita de cDNA:

Concentrar o RNA amplificado (0.5-1ug) para um volume de 7ul.

Adicionar 1ul (2ug/ul) reom hexamer (i.e. dN6).

Incubar 70 °C por 5 minutos

4° C

Mix:

4ul 5x First stre buffer

1ul 0,5 ug/ul oligo dT(15)-T7 primer

2ul 0,1 M DTT

1ul Rnase IN

2ul 10mM dNTP

2ul Superscript II (SS II)

Incubar a 42°C por 1hora no termociclador

Adicionar 1ul de Superscript II

Incubar a 42o.C por 1 hora

4°C

8. Síntese da 2a. fita de cDNA

Mix:

- 104ul DEPC H²O
- 15ul Advantage PCR buffer
- 3ul 10mM dNTP mix
- 1ul RNase H
- 5ul Advantage Polymerase

Incubar:

- 37°C por 10 min para digestão do RNA
- 94°C por 3 min para denaturação
- 65°C por 5 min para a ligação dos primers
- 75°C por 30 min para extensão

Parar a reação com solução de 7,5ul 1M NaOH 2mM EDTA.

Incubar a 65°C por 10 minutos para inativação enzimática

9. Purificação com Fenol : Clorofórmio : Álcool isoamílico

Adicionar 150ul de Ph:chlo:Isoamilico (25:24:1) pH 8.0

Vortex bem e descansar 1min

Centrifugar TA por 10 min a 14000 rpm

Cuidadosamente retirar ≈140ul da fase aquosa

Dispensar em um tubo novo

Adicionar 150ul de Clorofórmio

Vortex bem e descansar 1min

Centrifugar TA por 10 min a 14000 rpm

Cuidadosamente retirar ≈140ul da fase aquosa

Dispensar em um tubo novo

4. Precipitação

Adicionar 70ul de Acetato de sódio (Na₂OAC) 3M, pH 5.2

Adicionar 500 ul de etanol absoluto (-20C)

Vortex bem

Centrifugar a 14000 rpm/ 4°C/ 30min

Remover com a pipeta o sobrenadante e reservar

Lavar 3x com 1ml de etanol 70% DEPC (-20C)

Centrifugar a 14000 rpm/ 4°C/ 5min

Secar a 37°C por 10 min para evaporar o etanol residual

Eluir em 21ul H₂O DEPC e quantificar o dscDNA com diluição 1:100

5. Transcrição in vitro

20µl dscDNA (entrar com máximo de 40µg de cDNA)

Mix:

20ul ds cDNA

15ul of 25mM rNTP (A,G,C e UTP, make it just about to use it)

10ul 5x reaction buffer

5ul enzyme mix (Rnase inhibitor e T7 phage polymerase)

Incubar a 37°C por 5-6hs.

10. Purificação do RNA useo Trizol

(centrifuga refrigerada a 4°C e ETOH a -20°C)

Adicionar 1ml of Trizol em cada tubo.

Adicionar 200 ul clorofórmio por 1 ml de solução de Trizol.

Vortex.

Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.

Centrifugar 12.000g por 15 minutos a 4°C

Transferir a fase aquosa para um novo tubo e adicionar isopropanol na proporção de 1:1 em relação à fase aquosa.

Vortex

Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.

Centrifugar a 14.000 rpm por 15 minutos.

Lavar os pellets 3 vezes com 1 ml de solução 70% ETOH in DEPC H₂O.

Centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos.

Secar os pellets e ressuspender em 10ul de água DEPC.

Checar a concentração e a qualidade do RNA com espectrofotômetro, chequeo OD 260 e OD 280.

11. Gel de agarose para checar integridade e qualidade do RNA amplificado.

Entrar com 0,5 a 1 µg de RNA.

Anexo 3 - Extração de RNA por TRIzol

- 1- Em tubos de politron, pipetar 1ml de TRIzol.
- 2- Colocar o tumor e politronar. Limpar ou trocar todo o material sempre que mudar de amostra.
- 3- Deixar as amostras descansar no trizol entre 10 minutos e uma hora. A partir daqui as amostras podem ser congeladas ou processadas imediatamente.
- 4- Centrifugar as amostras por 10 minutos a 4°C e 14000 rpm.
- 5- Transferir o sobrenadante para um novo tubo eppendorf e adicionar 200µl de clorofórmio, agitar vigorosamente por 15 segundos e centrifugar 15 minutos a 4°C e 14000rpm.
- 6- Transferir o sobrenadante para um novo tubo e adicionar 500µl de Isopropanol.
- 7- Deixar precipitar por no mínimo 12 horas a -20°C
- 8- Centrifugar as amostras 15 minutos a 4°C e 14000rpm.
- 9- Descartar o sobrenadante.
- 10- Lavar o pellet com Etanol 70%.
- 11- Centrifugar 10 minutos a 4°C e 14000rpm duas vezes.
- 12- Quantificar.

Anexo 4 - Extração de RNA por Cloreto de Césio

Soluções

- 1- Cloreto de Césio 5,7M:

CsCl	95,97g
Acetato de sódio 1M	2,5ml

Completar com H₂O/DEPC em q.s.p.100ml. Autoclavar a solução.

- 2- Solução de lise:

(100ml) 4M Isotiocianato de guanidina/ 25mM Citrato- pH 7.0

Isotiocianato de guanidina	47,44g
Citrato de sódio	0,735g

Completar com H₂O/DEPC em q.s.p.100ml. Autoclavar a solução.

No momento da utilização adicionar a cada ml de solução de lise 7 μ l de β -mercaptol.

- 3- Solução estoque de acetato de sódio 1M:

Pesar 41,01g de acetato de sódio e diluir em 500ml de H₂O/DEPC. Autoclavar.

Procedimento

- 1- Nos tubos do politron pipetar 2 ml de solução de lise. Politronar o tumor com a solução de lise. Em seguida dividir o material em outro tubo e adicionar 1ml de solução de lise em cada tubo.
- 2- Preparar os tubos da ultracentrifuga adicioneo 4ml da solução de cloreto de Césio 5,7 M.

- 3- Politronar cuidadosamente para não esquentar a amostra e ao final adicionar a solução de lise até completar 4ml em cada tubo.
- 4- Balancear os tubos queo necessário.
- 5- Centrifugar 29000rpm, 20°C, 20horas.
- 6- Com o auxílio de uma pipeta Pasteur plástica retirar cuidadosamente o material do tubo, deixo aproximadamente 1ml do colchão de césio.
- 7- Emborcar o tubo e deixá-lo de ponta cabeça sobre um lenço de papel autoclavado.
- 8- Com auxílio de uma pinça e lenço de papel autoclavado limpar o interior da parede do tubo retireo o excesso de Cloreto de Césio que pode ter ficado na parede, tendo sempre o cuidado de não tocar o fundo do tubo.
- 9- Ressuspender o pellet em 30 μ l de H₂O DEPC e passar o material para um tubo eppendorf de 2ml
- 10- Ressuspender novamente o pellet com mais 30 μ l de H₂O DEPC e passar o material para o mesmo tubo.
- 11- Fazer a leitura espectrofotométrica (OD₂₆₀ e OD₂₈₀) e o gel de agarose 1%.

Anexo 5 - Protocolos Hibridização em Lâmina de Vidro

1. SÍNTESE DO CDNA MARCADO COM FLUOROCROMOS.

RNA/oligo mix:

- 4 ug de aRNA
- 3 ul de dN6 (3 ug/ul)
- 1,1 ul controle¹ 4.5x (Q-gene)

Completar volume para 14,4 µl com água DEPC.

Incubar a 70°C por 10min. Retirar e colocar em gelo.

A essa reação, adicionar:

- 6 µl first stre buffer 5x pré-aquecido a 42°C
- 3 µl 0,1M DTT
- 0,6 µl Low C²
- 0.5 ul Rnasin (Promega, cat # N251B, 40 U / ul).
- 2,5 µl SuperScript II (Invitrogen Cat # 19064-014)
- 3 µl dCTP³ (25 nmol; CY3 ou CY5, cat # PA53021 ou PA55021

respectivamente, amersham pharmacia).

Incubar a 42°C por 42 horas.

2. DEGRADAÇÃO DO RNA – VOLUME: VOLUME

- 1,5 ul 0,5M EDTA
- 1,5ul 1M NaOH

Incubar a 70°C por 20 min

- Neutralizar a reação adicioneo 1,5 ul 1M HCl.

Incubar no escuro enquanto aguarda a preparação da coluna.

3. PURIFICAÇÃO DO CDNA EM COLUNA AUTOSEQ G50 (Amersham Pharmacia, cat # 27-5340-01):

- Ressuspender a resina vortexeo.
- Quebrar a ponta da coluna e desatarrachar a tampa com meia volta.

- Spin a 2000g / 1min com a coluna adaptada em tubo eppendorf 2 ml.
- Adicionar cada reação de cDNA (+/- 34,5 ul) ss cDNA no centro da resina de cada coluna, adicioneo gotinha por gotinha com cuidado. Use uma coluna por reação de cDNA.
- Transferir coluna para tubo eppendorf 1,5 ml.
- Spin a 2000g / 1min com a coluna adaptada em tubo de 2000ul.
- Guardar eluato a 4⁰C ao abrigo da luz.
- Os cDNAs poderão ser utilizados para a hibridização em estação de hibridização

4. GEL DE AGAROSE (*)

Retirar 2 ul do cDNA marcado, adicionar 2 ul de azul de bromofenol-3X.

Preparar mini-gel de agarose 1% em lamina de vidro com o pente de 1 mm.

Aplicar as amostras

Manter protegido da luz

60W -1h

Escanear o gel

5. PRÉ-HIBRIDIZAÇÃO DAS LÂMINAS:

Incubar lâmina em tubo Falcon 50ml ou caixa de lamina contendo 5X SSC; 0,2% SDS; 1% BSA,5X solução Denhardt's (Filtrada em membrana 0,22 ou 0,45 um)

Aquecer a solução a 42°C para o uso.

Lavar mergulho 10X em H₂O destilada e centrifugar a 1000 rpm / 1 min/ (tubo Falcon 50 ml).

Utilizar a lamina imediatamente, pois a eficiência de hibridização diminui se secarem por mais de uma hora.

6. HIBRIDIZAÇÃO

Tampão de hibridização 2X: 10 X SSC; 0,2% SDS. Filtrar (filtro 0,22 ou 0,45 μm), aliquotar e guardar em temp. ambiente. Aquecer a 70⁰C antes do uso ate ressuspender todo o pptado.

6.1 ESTAÇÃO DE HIBRIDIZAÇÃO:

- Misturar as duas reações de ss cDNA Cy3 e Cy5 purificadas.

Adicionar:

- 2 ul poly A DNA (2 ug /ul, Amersham-Pharmacia, cat # 27-7988-01).
- 2 ul Cot1 DNA (2 ug/ul, Gibco BRL, cat# 15279-011).
- 2 ul de BSA 10 mg/ml.

Diminuir o volume em SpeedVac para 12,25 μl .

Adicionar

- 47,5 ul de tampão de hibridização previamente aquecido a 70⁰C e devidamente solubilizado.
- 23,75 ul de Formamida deionizada (mantida no escuro e em temperatura ambiente).
- 9,5 ul de solução Denhardt's 50X.
- 2ul de Esperma de Salmão 5ug/ul.

Misturar com cuidado e incubar a 45⁰C até o momento de uso.

Montar a lamina já pré hibridizada na estação de hibridização.
Aquecer a 70⁰C / 2 min. Manter nesta temperatura até adicionar o cDNA.

Aquecer a amostra para 95⁰C por 5 minutos. Spin

7. HIBRIDIZAÇÃO:

Adicionar o cDNA mix na câmara de hibridização e incubar a 42⁰C por pelo menos 16 horas.

Desmontar a câmara de hibridização, retireo a lâmina e emergir em solução de SSC 2X por aproximadamente 1minuto. Proceder lavagem.

8. LAVAGENS:

Pré-aquecer os tampões a 37 ⁰C antes do uso.

Lavar as lâminas sob agitação e devidamente acondicionada (estante de imunohistoquímica). Para um máximo de 4 lâminas utilizar em torno de 400ml de cada tampão.

- 1X em 2X SSC por 10 minutos.
- 2X em 0,1X SSC; 0,1% SDS por 10 minutos.
- 2X em 0,1 X SSC por 10 minutos.
- Spin a 1000 rpm por 2 minutos em tubo Falcon 50ml.

9. CAPTURA DAS IMAGENS

¹ 1 ul da mistura do mRNA controles 1X contém:

Q do fago λ "lemark" na concentração de 45 ng/ul.

Clone de B. subtilis trp gene (ATCC, 87485) 30 ng/ul

Clone de B. subtilis dapB gene (ATCC, 87485) 15 ng/ul

Clone de B. subtilis thrB gene (ATCC, 87485) 3 ng/ul

Clone de B. subtilis pheB gene (ATCC, 87485) 1,5 ng/ul

Clone de B. subtilis lysA gene (ATCC, 87485) 0,3 ng/ul

Esta mistura de genes está diluída em etanol 75%.

Adicioneo 1ul desta mistura 1X em 25 a 50 ug de RNA total resulta em uma contaminação do RNA total de mamíferos com mRNAs que correspondem a genes com níveis de transcrição de aproximadamente 1:20.000 (lysA), 1:4000 (pheB), 1:2000 (thrB), 1:400 (dapB), 1:200 (trp).

² dNTPs mix (Low C dDNTp mix): uso com dCTP marcado

Conc. Inicial	Vol	Conc. final
dATP (100 mM)	5 μ L	25 mM
dCTP (100 mM)	2 μ L	10 mM
dGTP (100 mM)	5 μ L	25 mM
dTTP (100 mM)	5 μ L	25 mM
H ₂ O DEPC q.s.p 20,0 μ L	3 μ L	
Total	20 μ L	

*Incluídos no kit 18064-014, SSII reverse transcriptase, Life Technologies

³ dNTPs mix (Low T dNTP mix): uso com dUTP marcado

Conc. Inicial	Vol	Conc. final
dATP (100 mM)	5 μL	25 mM
dCTP (100 mM)	5 μL	25 mM
dGTP (100 mM)	5 μL	25 mM
dTTP (100 mM)	2 μL	10 mM
H ₂ O DEPC q.s.p 20,0μL	3 μL	
Total	20 μL	

³ O dCTP deve ser aliqotado em 3ul/tubo e guardado no escuro a – 20°C. Durante as reações evitar sempre a luz, p/ex: cobrindo tubos e aquecedores com papel alumínio.

* Referência: Glass slide-based agarose gel electrophoresis for determining the efficiency of RNA amplification e cyanine dye incorporation during RNA labeling. Carvalho AF, Neves EJ, Hirata Junior R, Reis LF. Biotechniques. 2003 Oct 35(4):688-90, 692.

Anexo 6 - Soluções usadas nos experimentos

1. Água DEPC
1 ml de DEPC (Sigma Chemical Company - Catalog # 5758)
999 ml de água mili-Q.
Autoclavar 2 vezes.
2. SSC 20x (pH 7.0)
350,67 g de NaCl 3M.
176,47 g de Citrato de Sódio 0,3M.
Completar com água mili-Q para 2 L.
3. SDS 20%
100 g de SDS.
Completar para 1 L de água-Q.
4. Denhart 50x
5 g de Ficoll.
5 g Polivinil Polidon (PVP).
5 g BSA fração V.
Completar volume com água mili-Q.

Soluções 3 e 4 são filtradas em filtro 0,22 μm ou 0,45 μm)
Um dia antes de serem usadas, as soluções são diluídas nas concentrações de uso e mantidas aquecidas a 37°C.

5. Solução de pré-hibridização
1 g de BSA.
60 ml de água mili-Q a 37°C.
Acrescentar:
25 ml de SSC 20x.
10 ml de denhart 50x.
Dissolver com agitação branda. Acrescentar:
1 ml de SDS 20%.
Completar com água mili-Q para 100ml.
Filtrar com seringa e filtro de 0,45 μm .

Anexo 7 - Genes diferencialmente expressos entre os componentes

Tabela 1 - Genes diferencialmente expressos entre os componentes blastematoso e epitelial (diferença maior de 2 vezes e $p \leq 0,01$).

Gene ID	Unigene Cluster	Gene Name	Fold	P	Anotation
M74093	Hs.244723	CCNE1	3,660397	0	Cyclin E1
AW382930	Hs.322430	NDRG4	3,235525	0	NDRG family member 4
BE006198	Hs.344037	PRC1	2,907945	0	Protein regulator of cytokinesis 1
BI044030	Hs.9329	TPX2	2,80889	0	TPX2, microtubule-associated protein homolog (Xenopus laevis)
AW371180	Hs.85137	CCNA2	2,615343	0	Cyclin A2
BF944987	Hs.7973	DKFZP434G156	2,43851	0	Hypothetical protein DKFZp434G156
AF071593	Hs.110457	WHSC1	2,297397	0	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1
BF880478	Hs.238465	DAB2IP	2,188587	0	DAB2 interacting protein
BC020587	Hs.82502	POLD3	2,060936	0	Polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit
BI051188	Hs.458360	UCK2	2,040609	0	Uridine-cytidine kinase 2
AW382377	Hs.308220	PHF11	-2,323017	0	PHD finger protein 11
BI024143	Hs.250894	TCTA	-2,675855	0	T-cell leukemia translocation altered gene
AL049974	Hs.100261		-2,810837	0	CDNA FLJ26539 fis, clone KDN09310
AK024990	Hs.198468	PPARGC1A	-2,891865	0	Peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1, alpha
AW821152	Hs.8910	MAN1C1	-3,050403	0	Mannosidase, alpha, class 1C, member 1
BF094245	Hs.11729	SLC27A2	-3,24901	0	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2
BE767619	Hs.389724	C1orf29	-8,162437	0	Chromosome 1 open reading frame 29
BE934282	Hs.179574	PPP2R2A	2,276788	0,0001	Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), alpha isoform
BE933761	Hs.131315	BAL	-2,033549	0,0001	B aggressive lymphoma gene
AW902143	Hs.129368	EPB41L5	-2,047694	0,0001	Erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5
AW811901	Hs.380144	GNAQ	-2,088692	0,0001	Guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide
BF930333	Hs.167115	KIAA0830	-2,143547	0,0001	KIAA0830 protein
NM_014912	Hs.131945	CPEB3	-2,219139	0,0001	Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3
AW392467	Hs.270	PSCDBP	-2,251521	0,0001	Pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains, binding protein

BE814299	Hs.438386	DDX58	-2,352183	0,0001	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58
BG958887	Hs.48855	CDCA8	2,713209	0,0002	Cell division cycle associated 8
AW934836	Hs.432405	ATP11B	2,270484	0,0002	ATPase, Class VI, type 11B
BF758468	Hs.241517	POLQ	2,158456	0,0002	Polymerase (DNA directed), theta
BF875144	Hs.13313	CREBL2	-2,095072	0,0002	CAMP responsive element binding protein-like 2
AK025221	Hs.408815		-2,09667	0,0002	Hypothetical gene supported by AK128882
BF954040	Hs.389439	C11orf15	-2,531513	0,0002	Chromosome 11 open reading frame 15
BE170720	Hs.104746	EPB41L4A	-2,591882	0,0002	Erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4A
AW842414	Hs.1408	EDN3	2,549651	0,0003	Endothelin 3
AK000318	Hs.18616	MTB	2,503593	0,0003	More than blood homolog
BE711484	Hs.290758	DDB1	2,05908	0,0003	Damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa
BI059123	Hs.387567	ACLY	2,039195	0,0003	ATP citrate lyase
BE926073	Hs.5378	SPON1	-3,540615	0,0003	Spondin 1, extracellular matrix protein
AW384593	Hs.118631	TIMELESS	2,828427	0,0004	Timeless homolog (Drosophila)
BF873089	Hs.155048	LU	-2,200757	0,0004	Lutheran blood group (Auberger b antigen included)
BF882631	Hs.175120	FLJ11286	-2,958775	0,0004	Hypothetical protein FLJ11286
BE070870	Hs.160871	PTPRO	-5,35171	0,0004	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, O
BF831942	Hs.251673	DNMT3B	2,340797	0,0005	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 beta
BF910853	Hs.54483	NMI	-2,071966	0,0005	N-myc (and STAT) interactor
BF809085	Hs.17667	SH3BP4	-2,201825	0,0005	SH3-domain binding protein 4
BQ368868	Hs.166556	TEAD2	2,399943	0,0006	TEA domain family member 2
BQ303994	Hs.460184	MCM4	2,156961	0,0006	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (S. cerevisiae)
U45328	Hs.302903	UBE2I	2,084932	0,0006	Ubiquitin-conjugating enzyme E2I (UBC9 homolog, yeast)
BG982737	Hs.413175	COL18A1	-2,136131	0,0006	Collagen, type XVIII, alpha 1
BF987258	Hs.251664	IGF2	3,784231	0,0007	Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)
BF377462	Hs.177766	PARP1	2,112571	0,0007	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1
BE062864	Hs.25584	ARFGAP1	1,513617	0,0007	ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 1
AW380238	Hs.31386	SFRP2	-3,405815	0,0007	Secreted frizzled-related protein 2
AW851398	Hs.191990	PRKCBP1	-2,167452	0,0008	Protein kinase C binding protein 1
BF925974	Hs.233044	LCHN	-2,922089	0,0008	LCHN protein
BC007042	Hs.75367	SLA	-3,190981	0,0009	Src-like-adaptor
BE184281	Hs.431099	MAP17	-2,479415	0,001	Membrane-associated protein 17
BF841243	Hs.369912	STARD13	-3,084422	0,001	START domain containing 13

BE004304	Hs.154654	CYP1B1	-6,390815	0,001	Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
BF820054	Hs.89649	EPHX1	-2,056228	0,0011	Epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)
BF820249	Hs.1869	PGM1	2,001387	0,0012	Phosphoglucomutase 1
BE841696	Hs.289092	COTL1	2,091155	0,0013	Coactosin-like 1 (Dictyostelium)
BI017547	Hs.22010	ABCC5	2,016705	0,0013	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5
BQ334335	Hs.51120	CAMP	-2,037782	0,0013	Cathelicidin antimicrobial peptide
BF819823	Hs.7764	KIAA0469	-2,137612	0,0014	KIAA0469 gene product
BQ304779	Hs.41270	PLOD2	-5,426417	0,0014	Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (lysine hydroxylase) 2
BF375643	Hs.84072	TM4SF3	-2,549121	0,0015	Transmembrane 4 superfamily member 3
AW604838	Hs.444430	CDS1	-3,470155	0,0016	CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidyltransferase) 1
AW864873	Hs.48778	C1orf24	-2,604488	0,0017	Chromosome 1 open reading frame 24
BG993540	Hs.448588	NGFRAP1	2,228387	0,0018	Nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1
BQ363017	Hs.409065	FEN1	2,184041	0,0018	Flap structure-specific endonuclease 1
BF851114	Hs.180878	LPL	-2,07053	0,0018	Lipoprotein lipase
BQ291667	Hs.153546	KIF20A	2,498392	0,0019	Kinesin family member 20A
AK074285	Hs.124951	NSE2	-4,969153	0,002	Breast cancer membrane protein 101
BQ300376	Hs.57101	MCM2	2,969047	0,0021	MCM2 minichromosome maintenance deficient 2, mitotin (<i>S. cerevisiae</i>)
BF879245	Hs.25524	PTPN23	-2,445281	0,0021	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 23
BF736863	Hs.500741	CRTAC1	-4,585249	0,0021	Cartilage acidic protein 1
BC008719	Hs.173980	PRP19	2,102346	0,0023	PRP19/PSO4 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
BC005078	Hs.98324	FLJ10996	2,101326	0,0024	Hypothetical protein FLJ10996
AW881714	Hs.83919	GCS1	2,340797	0,0025	Glucosidase I
BE184882	Hs.4859	CCNL1	-2,168354	0,0027	Cyclin L1
BE767012	Hs.124611	SPOCK	-2,332699	0,0027	Sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican)
BQ319951	Hs.444840	C7orf24	2,09217	0,0028	Chromosome 7 open reading frame 24
AW364588	Hs.13565	KHDRBS3	2,216065	0,0029	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3
BQ304239	Hs.149653	PHLDB1	-2,300584	0,0029	Pleckstrin homology-like domain, family B, member 1
BF828943	Hs.288969	HSCARG	-3,07375	0,003	HSCARG protein
AW801248	Hs.305953	ZNF83	4,03341	0,0032	Zinc finger protein 83 (HPF1)
BG875582	Hs.221040	HBS1L	2,054803	0,0032	HBS1-like (<i>S. cerevisiae</i>)

AW866272	Hs.526394	ATM	-2,287862	0,0033	Ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)
BE003667	Hs.95549	FLJ20273	-3,14269	0,0033	RNA-binding protein
BQ318642	Hs.405666	PTPN3	-2,008335	0,0034	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3
BF373775	Hs.24950	RGS5	-2,291036	0,0035	Regulator of G-protein signalling 5
BF090114	Hs.218182	RUNDC1	2,329467	0,0037	RUN domain containing 1
BF888717	Hs.445052	MSH6	2,602684	0,0039	MutS homolog 6 (E. coli)
BE000876	Hs.87128	KIAA1815	-2,223758	0,004	KIAA1815
AW604265	Hs.377908	PPP1R12A	-2,907945	0,004	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A
BI061273	Hs.437536	LAMA4	2,099433	0,0041	Laminin, alpha 4
AF107834	Hs.197335	PGCP	-3,090842	0,0041	Plasma glutamate carboxypeptidase
BC017064	Hs.434247	FLJ23186	2,329467	0,0049	Hypothetical protein FLJ23186
BG945862	Hs.298229	PFDN2	-2,105262	0,005	Prefoldin 2
BG951026	Hs.458571	C15orf20	2,479415	0,0052	Chromosome 15 open reading frame 20
BF761482	Hs.320823	C20orf72	2,095072	0,0054	Chromosome 20 open reading frame 72
BF087631	Hs.252938	LRP2	-2,250117	0,0058	Low density lipoprotein-related protein 2
AW904800	Hs.21572	KIAA0644	2,394957	0,0068	KIAA0644 gene product
AW834500	Hs.438720	MCM7	2,34567	0,007	MCM7 minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae)
BF798153	Hs.260855	NSE1	4,330099	0,0074	NSE1
AW377644	Hs.395771	CAT	-2,29899	0,0079	Catalase
BE005493	Hs.7306	SFRP1	-2,118437	0,008	Secreted frizzled-related protein 1
BC022426	Hs.333303	GJB1	-2,34567	0,008	Gap junction protein, beta 1, 32kDa (connexin 32, Charcot-Marie-Tooth neuropathy, X-linked)
AW385724	Hs.44926	DPP4	-2,462289	0,0084	Dipeptidylpeptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2)
NM_024119	Hs.55918	LGP2	-2,253238	0,0086	Likely ortholog of mouse D11Igp2
BE715826	Hs.40968	HS3ST1	-2,617156	0,0086	Heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1
BI059343	Hs.20716	TIMM17A	2,046275	0,009	Translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog A (yeast)
BI056430	Hs.211610	CUGBP2	-3,331103	0,009	CUG triplet repeat, RNA binding protein 2
BF897397	Hs.101150	KIAA1949	2,170459	0,0093	KIAA1949
BE004649	Hs.408754	MAPRE1	2,099346	0,0093	Microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1
BE007343	Hs.389559	EIF3S10	2,047694	0,01	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 theta, 150/170kDa

Tabela 2 - Genes diferencialmente expressos entre os componentes blastematoso e estromal (diferença maior de 2 vezes e $p \leq 0,01$).

Gene ID	Unigene Cluster	Gene Name	Fold	P	Anotation
BF930844	Hs.388208	BAZ2B	7,754319	0	Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B
BE716219	Hs.435468	SQRDL	7,210004	0	Sulfide quinone reductase-like (yeast)
BQ325477	Hs.104925	ENC1	6,10927	0	Ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)
M74093	Hs.244723	CCNE1	5,252485	0	Cyclin E1
BF945038	Hs.442378	CDO1	4,404566	0	Cysteine dioxygenase, type I
BQ363017	Hs.409065	FEN1	4,152557	0	Flap structure-specific endonuclease 1
BF963911	Hs.268016	MRPS6	4,064281	0	Mitochondrial ribosomal protein S6
BG993540	Hs.448588	NGFRAP1	3,917681	0	Nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1
BI044030	Hs.9329	TPX2	3,680751	0	TPX2, microtubule-associated protein homolog (Xenopus laevis)
AW384593	Hs.118631	TIMELESS	3,458149	0	Timeless homolog (Drosophila)
BE938425	Hs.283749	RNASE4	3,382289	0	Angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5
AW875716	Hs.247547	SLC41A3	3,363586	0	Solute carrier family 41, member 3
BC005308	Hs.170009	TGFA	3,308093	0	Transforming growth factor, alpha
BF851636	Hs.3447	DKFZP564K1964	3,2898	0	DKFZP564K1964 protein
BQ291667	Hs.153546	KIF20A	3,255773	0	Kinesin family member 20A
BF096005	Hs.318526	C13orf23	3,157976	0	Chromosome 13 open reading frame 23
BE762418	Hs.469653	RPL5	3,123146	0	Ribosomal protein L5
BE005681	Hs.303720	TMEFF1	3,029333	0	Transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1
BE818371	Hs.397426	CHD7	3,00424	0	Chromodomain helicase DNA binding protein 7
BE843833	Hs.334854	ADIPOR2	2,930202	0	Adiponectin receptor 2
BF090526	Hs.158593	ZNF423	2,928171	0	Zinc finger protein 423

BF350732	Hs.184492	ELAVL1	2,926142	0	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, <i>Drosophila</i>)-like 1 (Hu antigen R)
BF927808	Hs.446140	SEC8L1	2,918041	0	SEC8-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)
AW391543	Hs.156346	TOP2A	2,913998	0	Topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa
BC008719	Hs.173980	PRP19	2,899894	0	PRP19/PSO4 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
BC031828	Hs.519342	KIF2	2,856008	0	Kinesin heavy chain member 2
AW883970	Hs.240395	KCNK6	2,824509	0	Potassium channel, subfamily K, member 6
AW371180	Hs.85137	CCNA2	2,728296	0	Cyclin A2
BF880478	Hs.238465	DAB2IP	2,674001	0	DAB2 interacting protein
BI049042	Hs.19192	CDK2	2,661058	0	Cyclin-dependent kinase 2
BF849154	Hs.155418	TRIB2	2,650014	0	Tribbles homolog 2 (<i>Drosophila</i>)
AW605631	Hs.181112	VDRIP	2,376766	0	Vitamin D receptor interacting protein
BC016847	Hs.1189	E2F3	2,323017	0	E2F transcription factor 3
BE768318	Hs.66170	SMYD2	2,237674	0	SET and MYND domain containing 2
BQ374854	Hs.44155	FTHFSDC1	2,229932	0	Formyltetrahydrofolate synthetase domain containing 1
BE927275	Hs.177534	DUSP10	2,229932	0	Dual specificity phosphatase 10
BE768730	Hs.118962	FUBP1	2,228387	0	Far upstream element (FUSE) binding protein 1
BQ321651	Hs.388613	NEO1	2,198927	0	Neogenin homolog 1 (chicken)
BC020587	Hs.82502	POLD3	2,177994	0	Polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit
AL390182	Hs.513016		2,176938	0	Hypothetical LOC388134
AW939742	Hs.79353	TFDP1	2,169256	0	Transcription factor Dp-1
BF930715	Hs.82916	CCT6A	2,124318	0	Chaperonin containing TCP1, subunit 6A (zeta 1)
BE178648	Hs.132911	PLAGL1	2,115502	0	Pleiomorphic adenoma gene-like 1
AW934836	Hs.432405	ATP11B	2,09072	0	ATPase, Class VI, type 11B
AW819990	Hs.84928	NFYB	2,062937	0	Nuclear transcription factor Y, beta
AW579059	Hs.203605	ARHGAP17	2,057653	0	Rho GTPase activating protein 17

BE929316	Hs.77917	UCHL3	2,053948	0	Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 (ubiquitin thiolesterase)
AF006259	Hs.24596	PIR51	2,044857	0	RAD51-interacting protein
AW602507	Hs.440553	ZNF473	2,003885	0	Zinc finger protein 473
AW880953	Hs.286226	MYO1C	-2,03934	0	Myosin IC
AW843829	Hs.534644	LOC130617	-2,06766	0	Hypothetical protein BC018415
BE720838	Hs.134816	ZNF305	-2,08349	0	Zinc finger protein 305
AK027292	Hs.25527	TJP3	-2,09362	0	Tight junction protein 3 (zona occludens 3)
BI018200	Hs.367994	COH1	-2,11257	0	Cohen syndrome 1
BI053240	Hs.129781	C21orf5	-2,12138	0	Chromosome 21 open reading frame 5
AW752767	Hs.535819	C21orf108	-2,13702	0	Chromosome 21 open reading frame 108
AK025289	Hs.122967	KLHL2	-2,13909	0	Kelch-like 2, Mayven (Drosophila)
BE720823	Hs.75256	RGS1	-2,14355	0	Regulator of G-protein signalling 1
BF955180	Hs.354793	FLJ20366	-2,19466	0	Hypothetical protein FLJ20366
BF959413	Hs.18586	CDC42BPA	-2,22222	0	CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)
AW838683	Hs.2936	MMP13	-2,27363	0	Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)
AW369557	Hs.284394	C3	-2,2974	0	Complement component 3
BF944968	Hs.390874	13CDNA73	-2,30218	0	Hypothetical protein CG003
BI041584	Hs.250387	UBE2G2	-2,30697	0	Ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2 (UBC7 homolog, yeast)
AW891483	Hs.20999	SCRN3	-2,30857	0	Secernin 3
BG987303	Hs.336227	TRIAD3	-2,32141	0	TRIAD3 protein
AW900879	Hs.437808	MATK	-2,3473	0	Megakaryocyte-associated tyrosine kinase
AW867112	Hs.445445	ASH1L	-2,35055	0	Ash1 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila)
BI055245	Hs.357318	FUT8	-2,41831	0	Fucosyltransferase 8 (alpha (1,6) fucosyltransferase)
BF326512	Hs.440961	CAST	-2,43851	0	Calpastatin
BF805970	Hs.16611	TPD52L1	-2,45377	0	Tumor protein D52-like 1

Fundação Antonio Prudente

Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

BE161577	Hs.10119	FLJ14957	-2,4932	0	Paracingulin
NM_002287	Hs.407964	LAIR1	-2,53678	0	Leukocyte-associated Ig-like receptor 1
BQ353600	Hs.390838	FKBP14	-2,5403	0	FK506 binding protein 14, 22 kDa
BE768359	Hs.509521	LY6G5B	-2,55797	0	Lymphocyte antigen 6 complex, locus G5B
AW363590	Hs.65551	C20orf114	-2,58292	0	Chromosome 20 open reading frame 114
BE144472	Hs.181161	KIAA1972	-2,60449	0	KIAA1972 protein
BF155810	Hs.21126	DOCK10	-2,65369	0	Dedicator of cytokinesis 10
BI013524	Hs.185055	BENE	-2,66106	0	BENE protein
BG977668	Hs.178292	POFUT1	-2,72263	0	Protein O-fucosyltransferase 1
BE938008	Hs.92991	KIAA1414	-2,72641	0	KIAA1414 protein
BF356756	Hs.48793	SIAT6	-2,77214	0	Sialyltransferase 6 (N-acetylglucosaminide alpha 2,3-sialyltransferase)
AW748743	Hs.15154	SRPX	-2,77406	0	Sushi-repeat-containing protein, X-linked
AF093744	Hs.119889	RAP2C	-2,78562	0	RAP2C, member of RAS oncogene family
BF822415	Hs.14611	DUSP11	-2,78755	0	Dual specificity phosphatase 11 (RNA/RNP complex 1-interacting)
BI042019	Hs.168669	OGDH	-2,88986	0	Oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)
BE002990	Hs.69280	MGC20533	-2,88986	0	Similar to RIKEN cDNA 2410004L22 gene (M. musculus)
BC011672	Hs.523375	KIAA0514	-2,89588	0	KIAA0514
AF183421	Hs.223025	RAB31	-2,91198	0	RAB31, member RAS oncogene family
BE826691	Hs.7720	DNCH1	-2,94241	0	Dynein, cytoplasmic, heavy polypeptide 1
D10653	Hs.439586	TM4SF2	-2,98349	0	Transmembrane 4 superfamily member 2
BF881941	Hs.40098	GREM1	-2,9897	0	Gremlin 1 homolog, cysteine knot superfamily (Xenopus laevis)
BE069340	Hs.211973	EXOSC2	-3,03143	0	Exosome component 2
AW851289	Hs.291851	CENTB2	-3,04618	0	Centaurin, beta 2

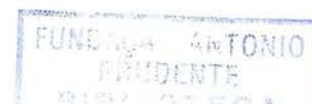
AW361928	Hs.369452	SLC37A1	-3,0504	0	Solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 1
AF126401	Hs.218366	KLK4	-3,06737	0	Kallikrein 4 (prostase, enamel matrix, prostate)
BE927039	Hs.372031	PMP22	-3,09449	0	Peripheral myelin protein 22
BE768547	Hs.132355	RABL3	-3,11666	0	RAB, member of RAS oncogene family-like 3
BF921132	Hs.406485	FLJ11088	-3,12965	0	GGA binding partner
BG004211	Hs.14623	IFI30	-3,14051	0	Interferon, gamma-inducible protein 30
BF820054	Hs.89649	EPHX1	-3,2065	0	Epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)
AW892707	Hs.23103	BET1	-3,21763	0	BET1 homolog (S. cerevisiae)
BE184882	Hs.4859	CCNL1	-3,27615	0	Cyclin L1
BG945862	Hs.298229	PFDN2	-3,38463	0	Prefoldin 2
BI014579	Hs.460317	KIAA0625	-3,39168	0	Senataxin
BE071837	Hs.489237	LOC55971	-3,50642	0	Insulin receptor tyrosine kinase substrate
BI004032	Hs.185140	PIP3-E	-3,55291	0	Phosphoinositide-binding protein PIP3-E
BE002904	Hs.380978	SLC9A8	-3,72438	0	Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 8
AW380238	Hs.31386	SFRP2	-3,9834	0	Secreted frizzled-related protein 2
AW884182	Hs.37003	HRAS	-4,23687	0	V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
BE000998	Hs.284205	SLC39A8	-4,29007	0	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8
BE843446	Hs.166684	STK3	-4,43828	0	Serine/threonine kinase 3 (STE20 homolog, yeast)
AW385664	Hs.28792	INHBA	-6,02099	0	Inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)
AW374526	Hs.24879	PPAP2C	-6,37754	0	Phosphatidic acid phosphatase type 2C
BC017064	Hs.434247	FLJ23186	3,896017	0,0001	Hypothetical protein FLJ23186
BE006198	Hs.344037	PRC1	3,386981	0,0001	Protein regulator of cytokinesis 1
U50939	Hs.418162	APPBP1	2,884857	0,0001	Amyloid beta precursor protein binding protein 1, 59kDa
BF800354	Hs.282386	TSGA14	2,724516	0,0001	Testis specific, 14
NM_006301	Hs.211601	MAP3K12	2,408275	0,0001	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12



BQ364019	Hs.61638	MYO10	2,381714	0,0001	Myosin X
BC005078	Hs.98324	FLJ10996	2,34242	0,0001	Hypothetical protein FLJ10996
BE818297	Hs.412587	RAD51C	2,272059	0,0001	RAD51 homolog C (<i>S. cerevisiae</i>)
BE142955	Hs.96247	TSNAX	-2,04344	0,0001	Translin-associated factor X
BF358570	Hs.372616	ARL1	-2,22376	0,0001	ADP-ribosylation factor-like 1
BG997805	Hs.287830	PLEKHA1	-2,32463	0,0001	Pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 1
BI045295	Hs.83190	FASN	-2,35545	0,0001	Fatty acid synthase
BE929401	Hs.86998	NFAT5	-2,36526	0,0001	Nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive
BQ339434	Hs.153692	MASS1	-2,37841	0,0001	Monogenic, audiogenic seizure susceptibility 1 homolog (mouse)
NM_014912	Hs.131945	CPEB3	-2,44867	0,0001	Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3
BE144373	Hs.113426	KIAA1529	-2,50359	0,0001	KIAA1529
BE171117	Hs.86958	IFNAR2	-2,54736	0,0001	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 2
BC005807	Hs.119597	SCD	-2,67957	0,0001	Stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)
AW175983	Hs.82508	THAP11	-2,70008	0,0001	THAP domain containing 11
BF945721	Hs.404081	FGFR2	-2,85403	0,0001	Fibroblast growth factor receptor 2 (bacteria-expressed kinase, keratinocyte growth factor receptor, craniofacial dysostosis 1, Crouzon syndrome, Pfeiffer syndrome, Jackson-Weiss syndrome)
AW862286	Hs.12457	NUP133	-2,93223	0,0001	Nucleoporin 133kDa
AW842540	Hs.231444	E2F2	-3,23777	0,0001	E2F transcription factor 2
AW838362	Hs.133089	DFFB	-3,43903	0,0001	DNA fragmentation factor, 40kDa, beta polypeptide (caspase-activated DNase)
BE818267	Hs.187199	MALAT1	-4,59479	0,0001	Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)
AW821029	Hs.301685	PLXND1	-6,58873	0,0001	Plexin D1
BE710880	Hs.82128	TPBG	-8,69388	0,0001	Trophoblast glycoprotein

AW364588	Hs.13565	KHDRBS3	4,843332	0,0002	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3
BF852901	Hs.114360	TGFB1I4	3,587553	0,0002	Transforming growth factor beta 1 induced transcript 4
BE066709	Hs.78944	RGS2	3,110184	0,0002	Regulator of G-protein signalling 2, 24kDa
AK000318	Hs.18616	MTB	3,04829	0,0002	More than blood homolog
BF090168	Hs.5333	KIAA0711	3,035639	0,0002	KIAA0711 gene product
BF769251	Hs.23047	CDA08	2,943005	0,0002	T-cell immunomodulatory protein
BQ359710	Hs.17377	CORO1C	2,331082	0,0002	Coronin, actin binding protein, 1C
AJ010842	Hs.18259	XAB1	2,209929	0,0002	XPA binding protein 1
AF131831	Hs.5985		2,061937	0,0002	Full length insert cDNA YU10E03
AW380283	Hs.6441	TIMP2	-2,02511	0,0002	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2
BF809085	Hs.17667	SH3BP4	-2,14741	0,0002	SH3-domain binding protein 4
BE767441	Hs.201978	PTGS1	-2,25636	0,0002	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
AW602478	Hs.334534	GNS	-2,54736	0,0002	Glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase (Sanfilippo disease IIID)
BI030911	Hs.444105	ENTPD1	-2,56863	0,0002	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1
BC000181	Hs.231320	GPR160	-2,80694	0,0002	G protein-coupled receptor 160
AW797454	Hs.172685	XPO7	-3,14487	0,0002	Exportin 7
BG959649	Hs.136965	MDM4	-3,34267	0,0002	Mdm4, transformed 3T3 cell double minute 4, p53 binding protein (mouse)
AW604042	Hs.301350	FXD3	-7,90629	0,0002	FXD domain containing ion transport regulator 3
AW604183	Hs.2554	SIAT1	8,950697	0,0003	Sialyltransferase 1 (beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase)
BC000914	Hs.405144	SFRS3	2,524504	0,0003	Splicing factor, arginine/serine-rich 3
BE826039	Hs.25035	CLIC4	2,482855	0,0003	Chloride intracellular channel 4
BF377931	Hs.220704	DHX15	2,286277	0,0003	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15
BE144052	Hs.447988	MGC22014	2,037782	0,0003	Hypothetical protein MGC22014
BF904449	Hs.54472	FMR2	-2,02651	0,0003	Fragile X mental retardation 2

AF194973	Hs.135756	POLK	-2,38502	0,0003	Polymerase (DNA directed) kappa
AW377121	Hs.367854	SKB1	-2,43851	0,0003	SKB1 homolog (S. pombe)
BE762906	Hs.380350	LOC152195	-2,68701	0,0003	Hypothetical protein LOC152195
BF930333	Hs.167115	KIAA0830	-3,18435	0,0003	KIAA0830 protein
AW392924	Hs.153687	INPP4B	-3,22433	0,0003	Inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, 105kDa
AW880361	Hs.37636	C10orf24	2,854029	0,0004	Chromosome 10 open reading frame 24
BE091211	Hs.24125	JMJD1B	2,181015	0,0004	Jumonji domain containing 1B
BF154504	Hs.76691	SNN	2,093621	0,0004	Stannin
BE708546	Hs.80305	ARHGAP19	2,016705	0,0004	Rho GTPase activating protein 19
BF963798	Hs.513063	DOCK9	2,005553	0,0004	Dedicator of cytokinesis 9
NM_020397	Hs.130065	CAMK1D	-2,07772	0,0004	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID
AW383663	Hs.154510	CBR3	-2,37019	0,0004	Carbonyl reductase 3
BF945386	Hs.289107	BIRC2	-2,48802	0,0004	Baculoviral IAP repeat-containing 2
BF951903	Hs.382311	CCBL1	-2,6629	0,0004	Cysteine conjugate-beta lyase; cytoplasmic (glutamine transaminase K, kynurenine aminotransferase)
BF084832	Hs.276905	MASTL	-2,67957	0,0004	Microtubule associated serine/threonine kinase-like
BF084811	Hs.70704	C20orf129	-2,9897	0,0004	Chromosome 20 open reading frame 129
AF107834	Hs.197335	PGCP	-3,06099	0,0004	Plasma glutamate carboxypeptidase
BF932715	Hs.446350	TGFBRAP1	-3,09942	0,0004	Transforming growth factor, beta receptor associated protein 1
BI042336	Hs.413636	NUP205	3,928558	0,0005	Nucleoporin 205kDa
BF336739	Hs.153834	PUM1	2,728296	0,0005	PRO0611 protein
BF758468	Hs.241517	POLQ	2,329467	0,0005	Polymerase (DNA directed), theta
BI032676	Hs.182874	GNA12	2,262629	0,0005	Guanine nucleotide binding protein (G protein) alpha 12
AW579108	Hs.437385	FLJ10420	2,188587	0,0005	Hypothetical protein FLJ10420
BG000772	Hs.519624	CD14	2,026514	0,0005	CD14 antigen



BE710887	Hs.410578	P4HB	-2,05125	0,0005	Procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide (protein disulfide isomerase; thyroid hormone binding protein p55)
BF819171	Hs.77876	ARMC6	-2,17347	0,0005	Armadillo repeat containing 6
AW604317	Hs.386939	USP7	-2,18253	0,0005	Ubiquitin specific protease 7 (herpes virus-associated)
BQ355403	Hs.83734	STX4A	-3,3311	0,0005	Syntaxin 4A (placental)
NM_024119	Hs.55918	LGP2	-4,37718	0,0005	Likely ortholog of mouse D11lgp2
BQ300376	Hs.57101	MCM2	6,489017	0,0006	MCM2 minichromosome maintenance deficient 2, mitotin (<i>S. cerevisiae</i>)
AW801248	Hs.305953	ZNF83	4,688089	0,0006	Zinc finger protein 83 (HPF1)
BG958887	Hs.48855	CDCA8	3,530812	0,0006	Cell division cycle associated 8
AW949028	Hs.418692	P8	-3,24901	0,0006	P8 protein (candidate of metastasis 1)
AW370761	Hs.50868	SLC22A18	-4,56622	0,0006	Solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 18
BE826174	Hs.434858	ALCAM	-4,70763	0,0006	Activated leukocyte cell adhesion molecule
AW382930	Hs.322430	NDRG4	4,013887	0,0007	NDRG family member 4
BE844046	Hs.389104	RABL5	2,04344	0,0007	RAB, member RAS oncogene family-like 5
BE144059	Hs.81907	FLJ30596	-2,02651	0,0007	Hypothetical protein FLJ30596
BF749393	Hs.162211	SLC6A14	-2,23767	0,0007	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 14
BE702729	Hs.528354	DKFZP564M182	-2,62442	0,0007	DKFZP564M182 protein
BE168274	Hs.436977	SYTL3	-2,91198	0,0007	Synaptotagmin-like 3
BE767619	Hs.389724	C1orf29	-5,70015	0,0007	Chromosome 1 open reading frame 29
BI061273	Hs.437536	LAMA4	4,169863	0,0008	Laminin, alpha 4
BF923360	Hs.183858	TIF1	2,223758	0,0008	Transcriptional intermediary factor 1
AW799651	Hs.512706	TCF19	1,534746	0,0008	Transcription factor 19 (SC1)
BQ368868	Hs.166556	TEAD2	4,284123	0,0009	TEA domain family member 2
BF800755	Hs.279818	GTL3	2,75681	0,0009	Likely ortholog of mouse gene trap locus 3

BE696388	Hs.484782	DFFA	2,131693	0,0009	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide
BF736063	Hs.113052	RCL1	2,05908	0,0009	RNA terminal phosphate cyclase-like 1
AW865602	Hs.396766	DDX50	2,022304	0,0009	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 50
NM_002767	Hs.462418	PRPSAP2	2,018103	0,0009	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 2
BE835958	Hs.75608	TJP2	-2,71321	0,0009	Tight junction protein 2 (zona occludens 2)
U09304	Hs.144700	EFNB1	2,650014	0,001	Ephrin-B1
AW889353	Hs.350229	LOC339287	2,16295	0,001	Hypothetical protein LOC339287
BQ360668	Hs.4112	ACAT2	2,07484	0,001	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase)
AW369078	Hs.7278	CRY2	-2,04061	0,001	Cryptochrome 2 (photolyase-like)
BF897809	Hs.5509	EVI2B	-2,37841	0,0011	Ecotropic viral integration site 2B
BI005334	Hs.36529	MGC11242	-2,74157	0,0011	Hypothetical protein MGC11242
AF450266	Hs.128686	NUCB2	-3,39333	0,0011	Nucleobindin 2
AW864873	Hs.48778	C1orf24	-5,1337	0,0011	Chromosome 1 open reading frame 24
AW606682	Hs.379414	MFHAS1	4,833271	0,0012	Malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1
AW380346	Hs.501266	TACC2	2,503419	0,0012	Transforming, acidic coiled-coil containing protein 2
BQ363373	Hs.7744	NDUFV1	-2,03778	0,0012	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1, 51kDa
BG984349	Hs.7734	C6orf85	-2,14652	0,0012	Chromosome 6 open reading frame 85
BF831942	Hs.251673	DNMT3B	2,804999	0,0013	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta
AW375340	Hs.110746	C6orf18	2,190105	0,0013	Chromosome 6 open reading frame 18
AW864744	Hs.117060	ECM2	-2,04344	0,0013	Extracellular matrix protein 2, female organ and adipocyte specific
BF825239	Hs.30246	SLC19A2	-2,53327	0,0013	Solute carrier family 19 (thiamine transporter), member 2
BI024143	Hs.250894	TCTA	-2,8481	0,0013	T-cell leukemia translocation altered gene
BF943213	Hs.347310	FLJ14627	2,329467	0,0014	Hypothetical protein FLJ14627

BF833242	Hs.82237	TRIM29	-2,25324	0,0014	Tripartite motif-containing 29
BG990573	Hs.120870	MGAT1	-4,50023	0,0014	Mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase
BI014388	Hs.289242	EFHD1	-4,92458	0,0014	EF hand domain containing 1
BQ345409	Hs.436193	SPOCK2	3,105876	0,0015	Sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 2
BE844109	Hs.272027	FBXO5	2,989698	0,0015	F-box protein 5
BF735483	Hs.127958	AGPAT4	2,690734	0,0015	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4 (lysophosphatidic acid acyltransferase, delta)
BG991235	Hs.458359	UBE2N	2,332699	0,0015	Ubiquitin-conjugating enzyme E2N (UBC13 homolog, yeast)
AW392467	Hs.270	PSCDBP	-2,14206	0,0015	Pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains, binding protein
BG986387	Hs.181444	TMEM9	-2,60268	0,0015	Transmembrane protein 9
AF112202	Hs.11417	RABAC1	-3,76252	0,0015	Rab acceptor 1 (prenylated)
BG989933	Hs.300772	TPM2	-6,06287	0,0015	Tropomyosin 2 (beta)
BF888717	Hs.445052	MSH6	3,228804	0,0016	MutS homolog 6 (E. coli)
AW884081	Hs.88778	CBR1	2,751084	0,0016	Carbonyl reductase 1
AW881364	Hs.371698	RAE1	2,676352	0,0016	RAE1 RNA export 1 homolog (S. pombe)
AW370668	Hs.77873	B7H3	-2,78949	0,0016	B7 homolog 3
BE832719	Hs.81665	KIT	2,295805	0,0017	V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
BE716234	Hs.7946	MTUS1	-3,61351	0,0018	Mitochondrial tumor suppressor 1
BF905575	Hs.380627	CKLFSF6	3,538162	0,0019	Chemokine-like factor super family 6
BG990217	Hs.374334	CCT4	2,174223	0,0019	Chaperonin containing TCP1, subunit 4 (delta)
BE091492	Hs.287921	CREB3	-2,04486	0,0019	CAMP responsive element binding protein 3
BF748528	Hs.7636	FES	2,372158	0,0021	Feline sarcoma oncogene
AW884049	Hs.356061	MAP1LC3B	2,143547	0,0021	Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta
AW374811	Hs.411515	CTCF	2,099433	0,0021	CCCTC-binding factor (zinc finger protein)

BF806721	Hs.439590	SLC37A3	-2,0806	0,0021	Solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 3
AW368192	Hs.62180	ANLN	2,095072	0,0022	Anillin, actin binding protein (scraps homolog, Drosophila)
BF229555	Hs.75268	SIAT4C	-2,14206	0,0022	Sialyltransferase 4C (beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase)
BE840322	Hs.24192	SYNPO2	-2,30058	0,0022	Synaptopodin 2
AW367017	Hs.73965	SFRS2	3,029333	0,0023	Splicing factor, arginine/serine-rich 2
BF813947	Hs.414648	TEKT3	1,474269	0,0023	Tektin 3
AW390991	Hs.162051	ZFYVE9	-2,02511	0,0023	Zinc finger, FYVE domain containing 9
BE171594	Hs.534580	SYNCOILIN	-2,62079	0,0023	Intermediate filament protein syncoilin
BG960551	Hs.416324	NOSTRIN	-5,39641	0,0023	Nitric oxide synthase trafficking
AW804915	Hs.55565	RIPK4	4,438278	0,0024	Receptor-interacting serine-threonine kinase 4
BF845093	Hs.75445	SPARCL1	-5,16583	0,0024	SPARC-like 1 (mast9, hevin)
BF093541	Hs.84318	RPA1	2,015308	0,0025	Replication protein A1, 70kDa
AW834500	Hs.438720	MCM7	2,89387	0,0026	MCM7 minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae)
BE002856	Hs.27263	KIAA1458	-2,08349	0,0026	KIAA1458 protein
AW175991	Hs.85482	USP13	-2,67233	0,0026	Ubiquitin specific protease 13 (isopeptidase T-3)
BF987258	Hs.251664	IGF2	5,241574	0,0027	Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)
BF090114	Hs.218182	RUNDC1	2,850075	0,0027	RUN domain containing 1
BI048034	Hs.458375	RIC3	2,334316	0,0027	RIC3 protein
BQ303994	Hs.460184	MCM4	2,16595	0,0027	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (S. cerevisiae)
BF871225	Hs.272814	C20orf67	2,231479	0,0028	Chromosome 20 open reading frame 67
AB028019	Hs.78960	LATS2	-2,05196	0,0028	LATS, large tumor suppressor, homolog 2 (Drosophila)
AW606000	Hs.288998	S100A14	-3,54062	0,0028	S100 calcium binding protein A14
BF996555	Hs.71968	IL6ST	-2,19619	0,0029	Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)
BI028823	Hs.109590	GENX-3414	-2,51926	0,0029	Genethonin 1

BQ332393	Hs.8361	E2IG4	-2,03496	0,0031	Hypothetical protein, estradiol-induced
BF087631	Hs.252938	LRP2	-4,42292	0,0031	Low density lipoprotein-related protein 2
BE702066	Hs.61490	SCHIP1	2,491475	0,0032	Schwannomin interacting protein 1
U45328	Hs.302903	UBE2I	2,049114	0,0032	Ubiquitin-conjugating enzyme E2I (UBC9 homolog, yeast)
BI059343	Hs.20716	TIMM17A	2,508804	0,0033	Translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog A (yeast)
AW379286	Hs.355589	ATE1	-2,0734	0,0033	Arginyltransferase 1
NM_144686	Hs.355126	TMC4	-3,23104	0,0033	Transmembrane channel-like 4
AW995829	Hs.25363	PSEN2	-4,46605	0,0033	Presenilin 2 (Alzheimer disease 4)
BF761482	Hs.320823	C20orf72	2,701948	0,0034	Chromosome 20 open reading frame 72
BF813609	Hs.368002	ATP9A	2,641541	0,0034	ATPase, Class II, type 9A
BE926760	Hs.179852	DC-UbP	2,45207	0,0034	Dendritic cell-derived ubiquitin-like protein
BF851976	Hs.111632	LSM3	2,015308	0,0034	LSM3 homolog, U6 small nuclear RNA associated (<i>S. cerevisiae</i>)
BF763891	Hs.291981	ARPC1A	2,376766	0,0035	Actin related protein 2/3 complex, subunit 1A, 41kDa
BF943501	Hs.446492	COPS5	2,194664	0,0035	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 5 (<i>Arabidopsis</i>)
AW577482	Hs.374524	DHX9	2,145033	0,0035	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9
BQ304017	Hs.27693	PPIL1	2,051956	0,0035	Peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 1
BI005735	Hs.372597	HSPA12A	-2,77022	0,0035	Heat shock 70kDa protein 12A
BI006508	Hs.389777	PDE9A	2,332699	0,0036	Phosphodiesterase 9A
AW604265	Hs.377908	PPP1R12A	-2,67586	0,0037	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A
BE180450	Hs.103808	C20orf11	2,472551	0,0038	Chromosome 20 open reading frame 11
BC001663	Hs.375921	RPL31	2,124318	0,0038	Ribosomal protein L31
AW375799	Hs.267194	MIS12	1,813781	0,0038	MIS12 homolog (yeast)
BF954040	Hs.389439	C11orf15	-2,26891	0,0038	Chromosome 11 open reading frame 15



AW904800	Hs.21572	KIAA0644	3,20428	0,0039	KIAA0644 gene product
BE004649	Hs.408754	MAPRE1	2,785623	0,0039	Microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1
BF806039	Hs.528305	KDEL3	-3,21987	0,0039	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3
BQ375381	Hs.77770	AP3M2	-2,41228	0,004	Adaptor-related protein complex 3, mu 2 subunit
AW392633	Hs.29279	EYA2	-3,77375	0,004	Eyes absent homolog 2 (Drosophila)
BF735828	Hs.177635	PDZRN3	-4,40762	0,004	PDZ domain containing RING finger 3
BF829157	Hs.405932	FBXL10	2,694467	0,0041	F-box and leucine-rich repeat protein 10
BI056430	Hs.211610	CUGBP2	-2,17498	0,0041	CUG triplet repeat, RNA binding protein 2
AW939135	Hs.301302	SCAM-1	2,411616	0,0043	Vinexin beta (SH3-containing adaptor molecule-1)
BE697395	Hs.181418	KIAA0152	-2	0,0043	KIAA0152 gene product
BE702119	Hs.158195	HSF2	2,071966	0,0044	Heat shock transcription factor 2
BE171753	Hs.241336	ATPIF1	2,278367	0,0045	ATPase inhibitory factor 1
AW373992	Hs.415877	PTS	-2,39164	0,0045	6-pyruvoyltetrahydropterin synthase
AW392965	Hs.172801	IARS	3,046177	0,0047	Isoleucine-tRNA synthetase
AW997085	Hs.306278	CD44	-6,10081	0,0047	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)
U29343	Hs.72550	HMMR	2,015308	0,0048	Hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)
BI044561	Hs.443057	CD53	-2,3933	0,0049	CD53 antigen
BE835884	Hs.413771	NAG	2,538542	0,0051	Neuroblastoma-amplified protein
BF955158	Hs.288912	BLP2	2,008753	0,0051	BBP-like protein 2
BG989444	Hs.129982	SMYD1	-4,46915	0,0051	SET and MYND domain containing 1
AW389222	Hs.370052	PROM1	3,506423	0,0052	Prominin 1
BF925558	Hs.21963	PSD2	2,416636	0,0053	Pleckstrin and Sec7 domain containing 2
BE003298	Hs.460584	CASK	-2,59548	0,0053	Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (MAGUK family)
BF799590	Hs.248746	HNRPAB	-2,74347	0,0053	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B
L38707	Hs.17946	DGKQ	-10,3388	0,0054	Diacylglycerol kinase, theta 110kDa

AW382377	Hs.308220	PHF11	-2,27206	0,0056	PHD finger protein 11
BE145691	Hs.291385	ATP8A1	-8,39773	0,0056	ATPase, aminophospholipid transporter (APLT), Class I, type 8A, member 1
AW374054	Hs.404336	LOC92906	2,413288	0,0057	Hypothetical protein BC008217
AW754219	Hs.91612	MGC23937	-3,10588	0,0057	Hypothetical protein MGC23937 similar to CG4798
AW834812	Hs.288156	MIR	-3,27161	0,0058	C-mir, cellular modulator of immune recognition
BF897397	Hs.101150	KIAA1949	2,522755	0,0059	KIAA1949
AW383352	Hs.13340	HAT1	2,060508	0,0061	Histone acetyltransferase 1
AJ245504	Hs.68061	SPHK1	-3,00008	0,0062	Sphingosine kinase 1
BF851114	Hs.180878	LPL	-2,07053	0,0063	Lipoprotein lipase
BC009895	Hs.282417	PYGL	-5,35171	0,0063	Phosphorylase, glycogen; liver (Hers disease, glycogen storage disease type VI)
BI003038	Hs.436200	LAPTM5	-2,13022	0,0064	Lysosomal-associated multispanning membrane protein-5
BE819475	Hs.5719	CNAP1	2,191624	0,0066	Chromosome condensation-related SMC-associated protein 1
BF837767	Hs.388547	SERPINA3	-10,7779	0,0069	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3
AW604682	Hs.3727	STRAP	2,477697	0,007	Serine/threonine kinase receptor associated protein
BE813763	Hs.24309	THEDC1	2,43851	0,007	Thioesterase domain containing 1
BF944980	Hs.323583	DKFZp434L142	-2,87986	0,0071	Hypothetical protein DKFZp434L142
BF900381	Hs.250696	DDX17	-2,38667	0,0073	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17
BI042137	Hs.12068	CRAT	-2,34567	0,0076	Carnitine acetyltransferase
BG953911	Hs.79058	SUPT4H1	2,383365	0,0078	Suppressor of Ty 4 homolog 1 (<i>S. cerevisiae</i>)
AW793024	Hs.279819	MAGEH1	-11,4716	0,0081	Melanoma antigen, family H, 1
BE148625	Hs.1600	CCT5	2,419988	0,0082	Chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)
AW804857	Hs.77171	MCM5	2,376766	0,0082	MCM5 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (<i>S. cerevisiae</i>)
AW894747	Hs.12727	C18orf11	3,607502	0,0083	Chromosome 18 open reading frame 11

AL110236	Hs.321022		2,056228	0,0084	MRNA; cDNA DKFZp566P1124 (from clone DKFZp566P1124)
BG000669	Hs.444252	CRIM1	-2,11257	0,0087	Cysteine-rich motor neuron 1
AW946376	Hs.90061	PGRMC1	2,039195	0,0089	Progesterone receptor membrane component 1
BF155333	Hs.82327	GSS	-2,03073	0,0092	Glutathione synthetase
BF798153	Hs.260855	NSE1	6,588728	0,0094	NSE1
BC019089	Hs.656	CDC25C	2,077718	0,0094	Cell division cycle 25C
BE170436	Hs.40403	CITED1	2,615343	0,0095	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 1
BE066857	Hs.169266	NPY1R	-3,4438	0,0096	Neuropeptide Y receptor Y1
BG951026	Hs.458571	C15orf20	3,088701	0,0097	Chromosome 15 open reading frame 20
BI003883	Hs.355724	CFLAR	-2,05765	0,0097	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
BF828943	Hs.288969	HSCARG	-4,08122	0,0097	HSCARG protein
BG954375	Hs.79358	TESK1	-3,05252	0,0098	Testis-specific kinase 1

Tabela 3 - Genes diferencialmente expressos entre os componentes estromal e epitelial (diferença maior de 2 vezes e $p \leq 0,01$).

Gene ID	Unigene Cluster	Gene Name	Fold	P	Annotation
AW385664	Hs.28792	INHBA	5,856343	0	Inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)
BE826174	Hs.434858	ALCAM	4,254531	0	Activated leukocyte cell adhesion molecule
AW392924	Hs.153687	INPP4B	3,642679	0	Inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, 105kDa
X69490	Hs.434384	TTN	3,41054	0	Titin
BE000998	Hs.284205	SLC39A8	3,153601	0	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8
BF986322	Hs.386224	PALM2-AKAP2	2,842184	0	PALM2-AKAP2 protein
BF326512	Hs.440961	CAST	2,540302	0	Calpastatin
BE170214	Hs.153640	PLK3	2,108183	0	Polo-like kinase 3 (Drosophila)
BI004164	Hs.54697	ARHGEF9	2,093621	0	Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 9
AW604820	Hs.77810	NFATC4	2,042024	0	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4
AW880361	Hs.37636	C10orf24	-2,409945	0	Chromosome 10 open reading frame 24
AF131831	Hs.5985		-2,849088	0	Full length insert cDNA YU10E03
AW902143	Hs.129368	EPB41L5	-3,698653	0	Erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5
BE719708	Hs.420036	GAD1	2,153973	0,0001	Glutamate decarboxylase 1 (brain, 67kDa)
BQ325477	Hs.104925	ENC1	-3,078014	0,0001	Ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)
AW385724	Hs.44926	DPP4	-3,605002	0,0001	Dipeptidylpeptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2)
BF922506	Hs.243678	SOX8	2,270484	0,0003	SRY (sex determining region Y)-box 8
BF879245	Hs.25524	PTPN23	-3,837056	0,0004	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 23
BF766837	Hs.351863	TST	-2,32624	0,0007	Thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese)
BE170436	Hs.40403	CITED1	-3,253517	0,001	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 1
AW368271	Hs.80358	JARID1D	-6,498019	0,0011	Jumonji, AT rich interactive domain 1D (RBP2-like)
AW884182	Hs.37003	HRAS	3,460547	0,0012	V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
BF985269	Hs.388589	NEDD9	-2,083487	0,0013	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9
BG994962	Hs.458573	PDGFRL	2,674001	0,0014	Platelet-derived growth factor receptor-like
BF820483	Hs.156727	ANKH	-2,002775	0,0014	Ankylosis, progressive homolog (mouse)

AW364677	Hs.389734	MGC45400	-2,136131	0,0015	Hypothetical protein MGC45400
BF800354	Hs.282386	TSGA14	-2,208398	0,0016	Testis specific, 14
AK024990	Hs.198468	PPARGC1A	-2,642677	0,0017	Peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1, alpha
NM_021641	Hs.8850	ADAM12	2,311773	0,002	A disintegrin and metalloproteinase domain 12 (meltrin alpha)
AF450266	Hs.128686	NUCB2	2,827447	0,0023	Nucleobindin 2
BF096005	Hs.318526	C13orf23	-2,050819	0,0023	Chromosome 13 open reading frame 23
BF735483	Hs.127958	AGPAT4	-2,724516	0,0023	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4 (lysophosphatidic acid acyltransferase, delta)
BF928886	Hs.22209	SMOC2	2,775985	0,0024	SPARC related modular calcium binding 2
AW364588	Hs.13565	KHDRBS3	-2,155466	0,0025	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3
BF820249	Hs.1869	PGM1	3,067791	0,0026	Phosphoglucomutase 1
AW604042	Hs.301350	FXVD3	3,810552	0,0027	FXVD domain containing ion transport regulator 3
BC026329	Hs.74471	GJA1	3,530812	0,0027	Gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)
BE768318	Hs.66170	SMYD2	-2,20381	0,0028	SET and MYND domain containing 2
NG_001313			5,388934	0,0029	
AW373992	Hs.415877	PTS	2,264198	0,0032	6-pyruvoyltetrahydropterin synthase
BE827269	Hs.75232	SEC14L1	-2,105262	0,0032	SEC14-like 1 (S. cerevisiae)
BF090168	Hs.5333	KIAA0711	-2,881859	0,0032	KIAA0711 gene product
AF052139	Hs.445255	KIAA0368	9,835511	0,0033	KIAA0368
AW754219	Hs.91612	MGC23937	5,37774	0,0034	Hypothetical protein MGC23937 similar to CG4798
AJ245504	Hs.68061	SPHK1	2,327853	0,0034	Sphingosine kinase 1
AW604183	Hs.2554	SIAT1	-4,993322	0,0036	Sialyltransferase 1 (beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase)
AW834812	Hs.288156	MIR	4,328899	0,0039	C-mir, cellular modulator of immune recognition
NM_001185	Hs.531989	AZGP1	2,386837	0,004	Alpha-2-glycoprotein 1, zinc
BF736063	Hs.113052	RCL1	-2,005553	0,0042	RNA terminal phosphate cyclase-like 1
BE156247	Hs.170318	ESRRBL1	2,550889	0,0046	Estrogen-related receptor beta like 1
BF735828	Hs.177635	PDZRN3	5,374014	0,0048	PDZ domain containing RING finger 3
AW935911	Hs.22151	NLN	2,139539	0,0048	Neurolysin (metallopeptidase M3 family)
BI044831	Hs.334639	PACSIN3	2,34372	0,0049	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 3
BG954375	Hs.79358	TESK1	2,200757	0,005	Testis-specific kinase 1
BQ334593	Hs.107526	B4GALT5	-2,216679	0,005	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 5
AF112202	Hs.11417	RABAC1	2,924115	0,0053	Rab acceptor 1 (prenylated)

BE769158	Hs.82071	CITED2	-2,071966	0,0053	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2
AF062739	Hs.140720	FRAT2	-2,115502	0,0053	Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 2
BF851636	Hs.3447	DKFZP564K1964	-2,618971	0,0054	DKFZP564K1964 protein
BI003055	Hs.72157	DKFZp564I1922	2,17347	0,0056	Adlican
BE156625	Hs.136348	POSTN	7,135428	0,006	Periostin, osteoblast specific factor
BE184857	Hs.442844	FMOD	2,04344	0,0061	Fibromodulin
BQ355403	Hs.83734	STX4A	2,254801	0,0066	Syntaxin 4A (placental)
BC028178	Hs.443625	COL3A1	4,642816	0,0076	Collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)
AW804915	Hs.55565	RIPK4	-5,176583	0,0081	Receptor-interacting serine-threonine kinase 4
AW392965	Hs.172801	IARS	-2,300584	0,0085	Isoleucine-tRNA synthetase
AW367991	Hs.101660	MGC5391	-2,070817	0,0088	Hypothetical protein MGC5391
AW805726	Hs.442630	SUV420H1	-2,184041	0,0089	Suppressor of variegation 4-20 homolog 1 (Drosophila)
BF900381	Hs.250696	DDX17	2,582915	0,0091	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17
BF373775	Hs.24950	RGS5	-2,060508	0,0092	Regulator of G-protein signalling 5
BF925974	Hs.233044	LCHN	-2,979355	0,0094	LCHN protein
AW894747	Hs.12727	C18orf11	-6,64376	0,0095	Chromosome 18 open reading frame 11

Anexo 8 - Gene Ontology

Tabela 1 - Distribuição dos processos biológicos nas diferentes comparações.

Componente Blastematoso X Componente Epitelial		Componente Blastematoso X Componente Estromal		Componente Estromal X Componente Epitelial	
Function Name	Corrected P-Value	Function Name	Corrected P-Value	Function Name	Corrected P-Value
androgen receptor signaling pathway	0,0251755 06	adenylate cyclase activation	0,1082542	ATP catabolism	1,62E-04
apoptosis	0,0513230 51	anterograde axon cargo transport	0,0529571	circadian rhythm	0,00302456
B-cell activation	6,62E-04 0,0260303	arginyl-tRNA aminoacylation	0,0510658	citrate metabolism coenzyme A metabolism	1,80E-04 1,24E-04
cell cycle arrest	89 0,0482798	biotin metabolism branched chain family amino acid biosynthesis	0,0199179 0,0519943	cytokinesis	0,09239666
cell death	24	cell adhesion	0,0018151	defense response to bacteria	0,0021902
cell growth and/or maintenance	0,0746782 22	cell-cell signaling	0,0038328	detection of abiotic stimulus	1,35E-04
cell motility	0,0478763 41	chemotaxis	0,099332	DNA methylation	0,06297189
cell-cell signaling	0,0027318 25	choline transport	0,0091053	DNA repair	0,03239708
circadian rhythm complement activation, alternative pathway	51 0,0017225 52	collagen fibril organization	0,0177048	DNA replication	3,73E-06
detection of abiotic stimulus	2,65E-04	cyanate catabolism	0,0093731	DNA replication initiation	6,83E-07
detection of sound	3,31E-04 0,0096863	cysteiny-tRNA aminoacylation	0,0127474	DNA restriction double-strand break repair	2,31E-04 0,05903615
development	79 0,0026248	defense response	0,0428284	eye morphogenesis (sensu Mammalia)	0,00226842
DNA packaging	42	DNA packaging	0,0571937	fatty acid oxidation	0,00276156
DNA topological change	0,0025055 31	DNA replication	0,097933	G1/S transition of mitotic cell cycle	0,03026197
double-strand break repair	0,0474020 09	embryonic development	0,1183579	gluconeogenesis	1,70E-08
embryonic development	0,0099884 4	erythrocyte differentiation	0,0635485	JAK-STAT cascade	0,09071672
erythrocyte differentiation	0,0042401 29	fatty acid metabolism	0,1099127	lipid biosynthesis	0,00254063
fatty acid oxidation	0,0029011 41	fatty acid oxidation	0,0583609	mismatch repair	1,84E-04
fucose metabolism	0,0055121 67	fructose 2,6- bisphosphate	0,0461239		

		metabolism			
G1/S transition of mitotic cell cycle	0,023664976	gluconeogenesis	1,11E-04	mitochondrion organization and biogenesis	2,02E-04
G2/M transition of mitotic cell cycle	0,002120064	glutamate decarboxylation to succinate	0,0102802	mitotic G2 checkpoint	1,01E-04
glycolysis	0,008594705	glycogen catabolism	0,0122572	mitotic spindle elongation	9,51E-05
G-protein coupled receptor protein signaling pathway	0,054373196	glycogen metabolism	0,0144857	morphogenesis	0,01089588
G-protein signaling, adenylate cyclase inhibiting pathway	0,003062315	glycosaminoglycan metabolism	0,0595767	negative regulation of protein biosynthesis	0,01117893
growth	0,024147935	growth	3,89E-05	neuromuscular junction development	0,01216531
hemoglobin biosynthesis	0,001837389	heart development	0,0018847	N-linked glycosylation	0,0019318
hormone mediated signaling	0,005011061	hemoglobin biosynthesis	0,0484692	nucleotide-excision repair	0,09413999
mechanosensory behavior	4,41E-04	immune response	0,0480759	oligosaccharide metabolism	0,0020489
mesoderm development	0,001521319	internal protein amino acid acetylation	0,0151755	pathogenesis	0,01181773
metal ion transport	0,010559208	intracellular protein transport	0,1187374	peptide metabolism	0,00198487
mismatch repair	0,049190764	isoleucyl-tRNA aminoacylation	0,0132786	positive regulation of fatty acid oxidation	8,98E-05
mitosis	0,024939172	keratinocyte differentiation	0,0539563	positive regulation of gluconeogenesis	2,69E-04
mitotic G2 checkpoint	1,89E-04	learning and/or memory	0,1123651	protein amino acid ADP-ribosylation	0,0021172
mitotic spindle assembly	0,003445105	leucine catabolism	0,0086131	protein amino acid dephosphorylation	0,0323908
mRNA cleavage	0,002296736	locomotory behavior	0,0212457	protein amino acid glycosylation	0,06002664
negative regulation of B-cell differentiation	0,003937262	metal ion transport	0,1216006	protein metabolism	0,01148946
negative regulation of follicle-stimulating hormone secretion	0,009725587	mitochondrion organization and biogenesis	0,016773	protein-mitochondrial targeting	0,06029224
negative regulation of interferon-gamma biosynthesis	0,001900747	morphogenesis	0,0476779	receptor mediated endocytosis	0,06160294
negative regulation of	0,001778119	muscle contraction	0,1237508	regulation of blood pressure	0,09595038

macrophage differentiation						
negative regulation of phosphorylation	0,0036747	78	muscle development	0,0050796	regulation of cell adhesion	0,05783133
Notch signaling pathway	0,0027560	84	negative regulation of B-cell differentiation	0,062167	regulation of cell migration	0,03173817
O-glycan processing	0,0013233	24	negative regulation of endocytosis	0,0159343	regulation of embryonic development	0,00235244
ovarian follicle development	0,0102658	97	negative regulation of follicle-stimulating hormone secretion	0,0023558	regulation of heart rate	0,03098249
oxygen transport	0,0020415	43	negative regulation of hepatocyte growth factor biosynthesis	0,0118032	regulation of muscle contraction	0,00288708
peripheral nervous system development	0,0090139	58	negative regulation of interferon-gamma biosynthesis	0,0501699	regulation of vasoconstriction	1,08E-04
positive regulation of apoptosis	0,0045934	73	negative regulation of macrophage differentiation	0,0468801	response to cold	0,00244292
positive regulation of follicle-stimulating hormone secretion	0,0087993	4	negative regulation of phosphorylation	0,0608443	response to toxin	0,00264649
protein folding	0,0533402	38	nerve-nerve synaptic transmission	0,0096572	signal transduction	0,0685285
regulation of cell cycle	0,0022395	65	neuromuscular synaptic transmission	1,21E-05	thermoregulation	3,39E-08
regulation of DNA replication	0,0022048	67	neurotransmitter biosynthesis	0,0099589	tricarboxylic acid cycle	0,08753368
regulation of transcription	0,0246510	17	neurotransmitter transport	0,1109606	UV protection	1,15E-04
regulation of transcription from Pol II promoter	0,0866633	93	nucleotide biosynthesis	0,0476614	very-long-chain fatty acid metabolism	1,47E-04
response to external stimulus	0,0092393	07	oligosaccharide metabolism	0,0453918	vesicle-mediated transport	0,08909678
response to toxin	0,0023965	95	ovarian follicle development	0,0026924	visual perception	0,00240424
RNA catabolism	0,0016703	54	parturition	0,0113816	xenobiotic metabolism	2,28E-04
small GTPase mediated signal transduction	0,0585725	36	pathogenesis	0,1138057		
transcription initiation from Pol II promoter	0,0095201	69	perception of sound	0,0215225		
traversing start control point of mitotic cell cycle	0,0019686	31	phosphate transport	3,97E-04		
two-component signal transduction system	0,0094762	13	positive regulation of fatty acid oxidation	0,0081714		



(phosphorelay)

UV protection	2,21E-04	positive regulation of follicle-stimulating hormone secretion	0,0017133
vesicle docking during exocytosis	0,0232009	positive regulation of gluconeogenesis	0,0187462
vesicle-mediated transport	0,0734779	protein biosynthesis	0,0746482
xenobiotic metabolism	0,0746630	protein	0,0493049
	42	deglycosylation	0,0493049
		proteolysis and peptidolysis	0,0473593
		regulation of actin polymerization and/or depolymerization	0,1152837
		regulation of bone mineralization	0,0083865
		regulation of embryonic development	0,0549939
		regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway	0,125224
		regulation of GTPase activity	0,0109892
		regulation of vasoconstriction	0,0088524
		response to cold	0,0560722
		response to external stimulus	0,0020941
		RNA splicing	0,049197
		sequestering of actin monomers	0,0138559
		signal transduction	0,0519652
		skeletal development	0,0981964
		spermatogenesis	0,0967733
		striated muscle contraction	2,42E-05
		sulfate transport	0,1095907
		thermoregulation	1,39E-04
		transcription initiation	0,1199574
		transforming growth factor beta receptor complex assembly	0,0446826
		transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	0,1168006
		UV protection	0,0106229

Tabela 2 - Distribuição da função molecular nas diferentes comparações.

Componente Blastematoso X Componente Epitelial		Componente Blastematoso X Componente Estromal		Componente Estromal X Componente Epitelial	
Function Name	Corrected P-Value	Function Name	Corrected P-Value	Function Name	Corrected P- Value
aminopeptidase activity	0,0028871	3'-5'- exoribonuclease activity	0,0111992	A2B adenosine receptor activity, G-protein coupled	0,0151755
ATP citrate synthase activity	2,02E-04	5S rRNA binding	1,47E-04	aminopeptidase activity	0,0468801
atalase activity	0,0030246	7S RNA binding	0,0136879	apyrase activity	0,0083865
itrate (Si)-synthase activity	1,62E-04	activin inhibitor activity	0,0032425	arginine-tRNA ligase activity	0,0446826
ytoskeletal protein binding	3,10E-04	calpain inhibitor activity	2,65E-04	beta-galactoside alpha-2,6- sialyltransferase activity	0,0096572
amaged DNA binding	5,96E-06	cation transporter activity	0,0105592	biotin binding branched-chain- amino-acid transaminase activity	7,66E-04
elta DNA polymerase activity	0,0035287	collagenase activity	0,0023966	calcium/calmoduli n-dependent protein kinase activity	0,0453918
diacylglycerol holinephosphotransf rase activity	0,0037362	cysteine dioxygenase activity	1,20E-04	calmodulin- dependent protein kinase I activity	0,0254452
ipeptidyl-peptidase activity	1,80E-04	delta DNA polymerase activity	0,0034451		0,0093731
NA (cytosine-5-)- methyltransferase activity	2,31E-04	DNA topoisomerase (ATP- hydrolyzing) activity	4,41E-04	calpain inhibitor activity	0,0177048
NA binding	0,0244278	double-stranded DNA specific exodeoxyribonuc lease activity	6,62E-04	carboxypeptidase D activity	0,0102802
NA-dependent ATPase activity	1,03E-06	endonuclease activity	2,73E-04	choline transporter activity	0,0118032
NA-directed DNA polymerase activity	0,0147722	endopeptidase inhibitor activity	0,0102659	cysteine-tRNA ligase activity	0,0086131
ouble-stranded NA specific xodeoxyribonucleas activity	3,23E-04	epoxide hydrolase activity	0,0022967	cytoskeletal protein binding dipeptidyl- peptidase IV activity	0,019471
opoxide hydrolase activity	0,0024429	exonuclease activity	8,69E-04		0,0122572

hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	0,0232343	glycoprotein 6-alpha-L-fucosyltransferase activity	1,10E-04	double-stranded DNA specific exodeoxyribonuclease activity estradiol 17-beta-dehydrogenase activity	0,0318686
ion transporter activity ligand-dependent nuclear receptor transcription coactivator activity	0,0382725	growth factor activity	0,025433	extracellular matrix structural constituent	0,0132786
long-chain-fatty-acid-coA ligase activity mannosyl-ligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase activity	0,0361462	hormone binding	0,0115491	fatty acid binding	0,0459885
	0,0142628	hydrolase activity	0,0032418		0,016773
	0,0351693	inward rectifier potassium channel activity	0,0036748	GTPase activator activity hematopoietin/interferon-class (D200-domain) cytokine receptor binding	0,0200408
mannosyl-ligosaccharide glucosidase activity	2,69E-04	ion transporter activity ligand-dependent nuclear receptor transcription coactivator activity	0,0295812		0,0455266
metallocarboxypeptidase activity	3,39E-08	MAP kinase phosphatase activity	0,0281726	hormone activity	0,0481381
multidrug transporter activity	0,0026465		0,0123191	host cell surface receptor binding inorganic diphosphate transporter activity	0,0113816
NAD+ ADP-bosyltransferase activity	0,0137873	metal ion transporter activity methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase activity	0,0108698	inorganic phosphate transporter activity	0,0127474
nucleotide binding organic anion transporter activity oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation of molecular oxygen, incorporation of two atoms of oxygen	0,0024636		0,0025055	interleukin-6 receptor activity	0,0461239
	0,0033429	motor activity	0,0138367		0,0106229
	0,0342438	mRNA 3'-UTR binding N-acetyllactosaminide alpha-2,3-sialyltransferase activity	1,65E-04	isoleucine-tRNA ligase activity	0,0227633
phosphatidate cytidyltransferase activity	0,0039697	oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, disulfide	2,21E-04	kinesin binding ligand-dependent nuclear receptor transcription coactivator activity	0,0289715
phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor	0,0133426		0,0013233		0,0203561

as acceptor

procollagen-lysine 5-hydroxylase activity	0,0031758	oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring) activity	1,89E-04	metalloendopeptidase activity	0,0474087
prolyl oligopeptidase activity	1,24E-04	oxygen transporter activity	0,0029011	methylcrotonoyl-CoA carboxylase activity	0,0075878
protein phosphatase 2A activity	0,0025406	pancreatic ribonuclease activity	0,0027561	mRNA binding	0,0099589
protein tyrosine phosphatase activity	0,0115875	peptide-O-fucosyltransferase activity	0,0030623	myosin binding	0,0265572
receptor binding	0,0376623	phosphatidate phosphatase activity	3,31E-04	N-acetyltransferase activity	0,0493049
RNA N-glycosylase activity	4,04E-04	potassium channel activity	0,0288597	neuropeptide hormone activity	0,0199179
site-specific DNA-methyltransferase (cytosine-specific) activity	1,35E-04	protein dimerization activity	0,0026248	oncostatin-M receptor activity	0,0079672
transcription factor binding	0,037179	RNA polymerase II transcription mediator activity	0,026892	outward rectifier potassium channel activity	0,0354096
type III site-specific deoxyribonuclease activity	1,47E-04	rRNA binding	1,32E-04	phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate 4-phosphatase activity	0,0212457
uridine kinase activity	0,0027616	serine-type peptidase activity	0,0127439	phosphorylase kinase activity	0,0245143
		signal transducer activity	0,0411438	procollagen-proline 4-dioxygenase activity	0,0159343
		sugar porter activity	0,0119217	prolyl oligopeptidase activity	0,0077728
		transforming growth factor beta receptor binding	0,0303397	protein binding	6,72E-04
		vitamin D receptor binding	0,0275174	protein carrier activity	0,0476614
		voltage-gated ion channel activity	0,013199	protein disulfide isomerase activity	0,0398358
		zinc ion binding	0,0132525	RAB GDP-dissociation inhibitor activity	0,0138559

receptor binding ribonuclease activity	0,04501 0,0484692
RNA-3'- phosphate cyclase activity	0,0187462
RNA-dependent ATPase activity	0,0088524
SNAP receptor activity	0,0081714
sodium- dependent multivitamin transporter activity	0,0091053
sterol transporter activity	0,0109892
structural constituent of muscle	0,0190383
thiosulfate sulfurtransferase activity	0,0144857
transferase activity	0,0490876
type II transforming growth factor beta receptor activity	0,0074113

Tabela 3 – Distribuição dos componentes celulares nas diferentes comparações.

Componente Blastematoso X Componente Epitelial		Componente Blastematoso X Componente Estromal		Componente Estromal X Componente Epitelial	
Function Name	Corrected P-Value	Function Name	Corrected P-Value	Function Name	Corrected P-Value
chromatin	0,016823	cytoplasmic dynein complex	0,0091869	cytoplasmic vesicle membrane	0,028971
citrate lyase complex	2,69E-04	delta DNA polymerase complex	2,33E-08	laminin-5	0,031869
delta DNA polymerase complex	3,39E-08	exocyst	0,0410636	sarcomere	0,039836
eukaryotic translation initiation factor 3 complex	0,0079395	exosome (RNase complex)	0,0369572	Z disc	0,03541
Golgi lumen	4,04E-04	nuclear inner membrane	6,62E-04		

laminin-1 nuclear inner membrane	0,0070573	oxoglutarate dehydrogenase complex (sensu Eukarya)	4,41E-04
peroxisomal matrix	8,08E-04	prefoldin complex small ribosomal subunit	0,0335975
prefoldin complex	3,23E-04	tight junction	0,0110243
spindle microtubule	0,0344684	transcription factor complex	0,0325499
synaptonemal complex	5,39E-04	unconventional myosin	0,0208587
	2,31E-04		3,31E-04

Tabela 4 – Cromossomos envolvidos nas diferentes comparações.

Componente Blastematoso X Componente Epitelial		Componente Blastematoso X Componente Estromal		Componente Estromal X Componente Epitelial	
Cromossomo	P valor corrigido	Cromossomo	P valor corrigido	Cromossomo	P valor corrigido
				Y	6,96E-05
X	8,98E-13	X	2,60E-11	X	0
				22	0
21	0,498680984	21	0,002528487	21	1
20	0	20	0	20	0
19	8,57E-05	19	0,040825736	19	7,61E-08
		18	0,646447697	18	1
17	0	17	0	17	0
16	0	16	0	16	0
15	4,59E-05	15	0,002698727	15	4,56E-09
		14	0,185382258	14	1
13	4,59E-05	13	0,00141298	13	9,96E-08
12	0	12	0	12	0
11	0	11	0	11	0
10	0	10	0	10	0
9	0	9	0	9	0
8	0	8	0	8	0
7	2,75E-04	7	0,002464631	7	1,81E-06
6	0	6	0	6	0
5	0	5	0	5	0
4	0	4	0	4	0
3	0	3	0	3	0
2	0	2	0	2	0
1	0	1	0	1	0

Fundação Antonio Prudente

Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

Anexo 9: Dendrograma

