

**IMUNOEXPRESSÃO DE WT1, p53,  $\beta$ -CATENINA,  
E-CADERINA E APC EM TUMOR DE WILMS  
ESPORÁDICO**

**CECÍLIA MARIA LIMA DA COSTA**

**Tese de Doutorado apresentada à Fundação  
Antônio Prudente para a obtenção do Grau de  
Doutor em Ciências**

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientadora: Prof. Dra. Beatriz de Camargo**

**São Paulo**

**2008**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Da Costa, Cecília Maria Lima

**Imunoexpressão de WT1, p53,  $\beta$ -catenina, E-caderina e APC em tumor de Wilms esporádico** / Cecília Maria Lima da Costa. – São Paulo, 2008.

108p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Beatriz de Camargo.

Descritores: 1. TUMOR DE WILMS/patologia. 2. CADERINA-E. 3. BETA CATENINA. 4. IMUNOHISTOQUÍMICA. 5. GENES WT1 DO TUMOR DE WILMS. 6. PROTEÍNA SUPRESSORA DE TUMOR p53. 7. GENES APC.

*"Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,  
mas não esqueço que a minha vida é a maior empresa do mundo.*

*E que posso evitar que ela vá à falência.*

*Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver,  
apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.*

*Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas  
e se tornar um autor da própria história.*

*É atravessar desertos fora de si,  
mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.*

*É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.*

*Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.*

*É saber falar de si mesmo.*

*É ter coragem para ouvir um "não".*

*É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.*

*Pedras no caminho?*

*Guardo todas, um dia vou construir um castelo..."*

*Fernando Pessoa.*

## **DEDICATÓRIA**

### **Aos meus pacientes**

Razão maior de toda minha dedicação e investimento  
profissional.

## **DEDICATÓRIA**

### **A minha família**

Meu porto seguro, o refúgio perfeito.

### **Ao Rafael**

Por todas as lições de vida, de força, de amor e de fé que marcaram profundamente a minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

**À Prof. Dra. Beatriz de Camargo**, pela disponibilidade e dedicação durante a orientação deste trabalho. Seu incentivo e confiança foram determinantes para conclusão desta tese.

**Aos meus queridos amigos do Departamento de Pediatria Viviane Sonaglio, Gustavo Ribeiro Neves e Roberta Zeppini**, pelo apoio e espírito de equipe que foram fundamentais na fase final deste trabalho.

**Às minhas amigas Isabel Cristina Rima e Andrea Y. Kurashima** pela amizade, carinho e incentivo.

**Aos meus mestres Prof. Dra. Beatriz de Camargo, Dr. Luis Fernando Lopes, Dra. Célia Antoneli e Dr. Alois Bianchi**, pelos anos de convivência e ensinamentos que foram de extremo valor na minha trajetória profissional.

**Às patologistas Dra. Simone Treiger Sredni e Dra. Isabela Wernek** pela construção do tissue microarray e realização da análise de imunohistoquímica, “pedra fundamental” deste estudo.

**Aos Srs. Ivan Neves e Carlos Ferreira Nascimento** pela paciência e disponibilidade na explicação dos passos da realização das técnicas de imunohistoquímica e tissue microarray respectivamente.

**À Sra. Suely Francisco** pela indispensável ajuda na formatação do texto e pela revisão das referências bibliográficas com extrema dedicação e carinho.

**À Sra. Ana Maria Kuniari** pela revisão ortográfica e gramatical deste estudo e pelo apoio incentivo durante os anos de sua execução.

Aos membros das bancas de qualificação e julgadora, **Dra. Maria Cláudia Zerbini, Dr Wladimir Alfer Junior, Dr Toni Gonzaga, Dra Karina de Cassia Ribeiro, Dra Sima Ferman e Dr Luiz Fernando Lopes**, pelos valiosos comentários e sugestões, meus sinceros agradecimentos.

**Aos funcionários dos Departamentos de Anatomia Patológica, Biblioteca, SAME e da Pós-graduação** que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste estudo.

## RESUMO

Da Costa CML. **Imunoexpressão de WT1,  $\beta$ -cateinina, E-caderina e APC em tumor de Wilms esporádico**. São Paulo; 2008. [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente].

O tumor de Wilms é uma neoplasia embrionária, constituída classicamente por três componentes histológicos: blastema, epitélio e mesênquima (estroma), os quais podem ser encontrados em diferentes proporções em cada tumor. As células do blastema e epitélio apresentam alto grau de proliferação, enquanto que as do estroma são constituídas por componentes heterogêneos como osso, fibras musculares, cartilagem, não apresentando comportamento agressivo. Os estudos de alterações gênicas e cromossômicas tem sido realizados com objetivo de refinar os fatores de prognósticos desses pacientes, assim como entender melhor a tumorigênese do tumor. Este estudo tem como principal objetivo determinar a frequência da expressão das proteínas WT1, p53,  $\beta$ -catenina, E-caderina e APC nos diferentes componentes histológicos do tumor de Wilms, assim como correlacionar estes achados com o prognóstico. Para estudar a expressão dos marcadores, foi utilizado a imunistoquímica, através da construção de *Tissue Macroarray* (TMA), o qual permite a análise de muitas amostras teciduais em uma única lâmina, otimizando custo e tempo. Nos nossos resultados, WT1 e p53 foram mais freqüentemente expressos no componente blastema (WT1: 97% e p53: 63% dos casos) e epitélio (WT1: 87% e p53: 58% dos casos), quando comparados com o estroma (WT1: 13% e p53: 22% dos casos) e com o tecido renal não tumoral (ausência de expressão em todos os casos estudados). Foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a imunoexpressão do WT1 e do p53. Na maioria dos casos estudados houve imunoexpressão da  $\beta$ -catenina em membrana (85%) e citoplasma (94%) e em 24% dos casos foi encontrado acúmulo nuclear dessa proteína. A imunoexpressão nuclear ocorreu

principalmente nos componentes blastematoso e estromal. Houve imunexpressão de E-caderina na membrana em 47% dos casos, em citoplasma em 44% e em núcleo em 12%. O acúmulo em núcleo foi encontrado principalmente nos componentes blastema e mesênquima, 21 e 25% respectivamente. A imunexpressão do APC ocorreu em núcleo em 95% dos tumores avaliados, em citoplasma em 9% e nenhum apresentou expressão em membrana. Nos componentes blastematoso e epitelial houve imunopositividade nuclear em 100% dos casos avaliados. No componente mesenquimal a positividade nuclear ocorreu em 89% dos casos. Os pacientes com estádios precoces tiveram mais freqüentemente positividade do WT1. Não houve associação dos outros fatores clínicos, epidemiológicos e evolução dos pacientes com expressão dos marcadores estudados.

## SUMMARY

Da Costa CML. **[Expression of WT1, p53,  $\beta$ -catenina, E-cadherina and APC in sporadic Wilms tumor]**. São Paulo; 2008. [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente].

Wilms tumor is a triphasic malignant neoplasm compromised of variable proportions of epithelial, blastemal and mesenchymal (stromal) elements. Different components have different clinical behavior. Patients with tumors predominant epithelial and/or stromal has more frequently low stage while predominant blastema has advanced disease. This study was undertaken to evaluate the expression of WT1, beta-catenins, E-cadherin and APC in Wilms tumor and correlate this expression with clinical characteristics, histologic cell type and prognosis. We studied the immunohistochemical expression of WT1, p53, beta-catenins, E-cadherin in different component of Wilms tumor using a *tissue array*. WT1 and p53 were more often expressed on blastema component (WT1: 97% and p53: 63% of cases) and on epithelial (WT1: 87% and p53: 58% of cases), when compare with the stromal component (WT1: 13% and p53: 22% of cases) and the normal renal tissue where it was not expressed. Immunopositivity of WT1 and p53 were significantly correlated. Immunopositivity of  $\beta$ -catenina was seen in 85 % at the membrane (85%), 94% cytoplasm and 24% nuclear. Nuclear immunoexpression was detected specially on blastema and stromal component. Immunohistochemical expression of E-cadherina was detected in 47% at the membrane, 44% cytoplasm and 12% nuclear. Nuclear expression was seen more often at the blastema and stromal component (21%, 25% respectively). Immunopositivity of APC occurs at 95% on nucleus, cytoplasm (9%) and none at membrane. Among the blastema and the epithelial component 100% was positive on nucleus. On the stromal component 89% was positive at the nucleus. Immunoexpression of WT1 was

correlated with local stage. The expression status of WT1, E-cadherin,  $\beta$ -catenina, APC in this cohort was not of prognostic value.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Histologia trifásica do tumor de Wilms típico.	7
<b>Figura 2</b>	Tumor de Wilms com anaplasia.	9
<b>Figura 3</b>	Restos nefrogênicos.	11
<b>Figura 4</b>	Representação da construção do TMA a partir do tecido até confecção da lâmina para análise.	12
<b>Figura 5</b>	Representação do 11p13 e 11p15.	16
<b>Figura 6</b>	Representação da via de sinalização Wnt.	21
<b>Figura 7</b>	Modelo de tumorigênese para tumor de Wilms.	24
<b>Figura 8</b>	Imunoexpressão nuclear do WT1 em componente blastematoso e epitelial.	48
<b>Figura 9</b>	Imunoexpressão nuclear do p53 em componente epitelial.	49
<b>Figura 10</b>	Imunoexpressão em citoplasma da $\beta$ -catenina em componente mesenquimal com diferenciação rabiomioblástica.	49
<b>Figura 11</b>	Imunoexpressão em citoplasma e membrana da E-caderina em componente epitelial.	55
<b>Figura 12</b>	Imunoexpressão nuclear do APC em componente epitelial.	68
<b>Figura 13</b>	Correlação entre as médias da idade em meses dos pacientes com estágio clínico.	69
<b>Figura 14</b>	Sobrevida global sobrevida livre de eventos.	69
<b>Figura 15</b>	Sobrevida livre de eventos de acordo com sexo.	70
<b>Figura 16</b>	Sobrevida livre de eventos de acordo com idade.	71
<b>Figura 17</b>	Sobrevida livre de eventos de acordo estágio.	71
<b>Figura 18</b>	Sobrevida livre de eventos de acordo com a imunoexpressão de WT1.	72
<b>Figura 19</b>	Sobrevida livre de eventos de acordo com a imunoexpressão de p53.	72
<b>Figura 20</b>	Sobrevida livre de eventos de acordo com a imunoexpressão de $\beta$ -catenina em membrana.	73

<b>Figura 21</b>	Sobrevida livre de eventos de acordo com a imunexpressão de $\beta$ -catenina em citoplasma.	73
<b>Figura 22</b>	Sobrevida livre de eventos de acordo com a imunexpressão de $\beta$ -catenina em núcleo.	74
<b>Figura 23</b>	Sobrevida livre de eventos de acordo com a imunexpressão de e-caderina em membrana.	74
<b>Figura 24</b>	Sobrevida livre de eventos de acordo com a imunexpressão de e-caderina em citoplasma.	75
<b>Figura 25</b>	Sobrevida livre de eventos de acordo com a imunexpressão de e-caderina em núcleo	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Característica sócio-demográficas dos 96 pacientes.	39
<b>Tabela 2</b>	Sistribuição da idade dos 96 pacientes.	39
<b>Tabela 3</b>	Sinais e sintomas apresentados pelos pacientes ao diagnóstico do tumor de Wilms.	40
<b>Tabela 4</b>	Estádio dos pacientes ao diagnóstico de Tumor de Wilms.	41
<b>Tabela 5</b>	Sítio de recaída dos 18 pacientes.	42
<b>Tabela 6</b>	Características do grupo de estudo e da totalidade de pacientes admitidos no mesmo período.	44
<b>Tabela 7</b>	Frequência da imunexpressão de wt1 nos diferentes componentes do tumor de Wilms e em rim normal.	45
<b>Tabela 8</b>	Frequência da imunexpressão de p53 nos diferentes componentes do tumor de wilms e em rim normal.	45
<b>Tabela 9</b>	Imunexpressão de $\beta$ -catenina nos diferentes componentes celular.	47
<b>Tabela 10</b>	Imunexpressão de e-caderina nos diferentes componentes celular.	47
<b>Tabela 11</b>	Imunexpressão de apc nos diferentes componentes celular.	48
<b>Tabela 12</b>	Imunexpressão da $\beta$ -catenina nos diferentes componentes da célula, do tumor e em tecido normal.	51
<b>Tabela 13</b>	Imunexpressão da e-caderina nos diferentes componentes da célula, do tumor e em tecido normal.	53
<b>Tabela 14</b>	Imunexpressão de apc nos diferentes componentes da célula, do tumor e em tecido normal.	54
<b>Tabela 15</b>	Associação entre estágio e recaída.	56
<b>Tabela 16</b>	Associação entre a frequência de recaídas e óbitos.	56
<b>Tabela 17</b>	Associação entre tipo histológico e óbitos.	57
<b>Tabela 18</b>	Correlação entre a imunexpressão da proteína p53 e WT1.	58
<b>Tabela 19</b>	Associação entre a imunexpressão de WT1 e p53 e as diferentes variáveis clínicas.	59

<b>Tabela 20</b>	Associação da positividade da $\beta$ -catenina com idade, estágio, quimioterapia pré-operatória e recaída.	60
<b>Tabela 21</b>	Associação da positividade da E-caderina com idade, estágio, quimioterapia pré-operatória e recaída.	60
<b>Tabela 22</b>	Associação da positividade da APC com idade, estágio, quimioterapia pré-operatória e recaída.	61
<b>Tabela 23</b>	Associação da positividade de WT1 com imunexpressão de $\beta$ -catenina, e-caderina e APC nos diferentes componentes celulares.	62
<b>Tabela 24</b>	Associação da positividade p53 com imunexpressão de $\beta$ -catenina, E-caderina e APC nos diferentes componentes celulares.	63
<b>Tabela 25</b>	Associação da positividade de $\beta$ -catenina em membrana com imunexpressão de E-caderina e APC nos diferentes componentes celulares.	64
<b>Tabela 26</b>	Associação da positividade de $\beta$ -catenina em citoplasma com imunexpressão de e-caderina e APC nos diferentes componentes celulares.	65
<b>Tabela 27</b>	Associação da positividade de $\beta$ -catenina em núcleo com imunexpressão de e-caderina e APC nos diferentes componentes celulares.	66
<b>Tabela 28</b>	Associação da positividade de e-caderina membrana com imunexpressão de APC nos diferentes componentes celulares.	66
<b>Tabela 29</b>	Associação da positividade de e-caderina citoplasma com imunexpressão de APC nos diferentes componentes celulares.	67
<b>Tabela 30</b>	Associação da positividade de E-caderina em núcleo com imunexpressão de APC nos diferentes componentes celulares.	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>APC</b>	<i>adenomatosis poliposys of the colon</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>GBTTW</b>	Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento do Tumor de Wilms
<b>GPOH</b>	German Society of Oncology e Hematology
<b>HE</b>	Hematoxilina e eosina
<b>NWTS</b>	<i>National Wilms Tumor Study</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>SIOP</b>	<i>International Society of Pediatric Oncology</i>
<b>SPSS</b>	<i>Statistical Package for Social Science</i>
<b>TcF</b>	Fator ativador de células T
<b>TMA</b>	<i>Tissue Microarray</i>
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Considerações Gerais	1
1.2	Anatomia patológica	5
1.2.1	Histologia	5
1.2.2	Anaplasia	7
1.2.3	Restos Nefrogênicos	9
1.3	<i>Tissue Microarray</i> (TMA)	11
1.4	Biologia Genética e Molecular	13
1.4.1	WT1	14
1.4.2	p53	16
1.4.3	$\beta$ -catenina	17
1.4.4	E-caderina	18
1.4.5	APC	18
1.4.6	Via Wnt	19
1.5	Correlação biomolecular, clínico-epidemiológica e histológica no tumor de Wilms	22
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
2.1	Objetivos Principais	25
2.2	Objetivos Secundários	26
<b>3</b>	<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
3.1	Casuística	27
3.1.1	Critérios de Elegibilidade	27
3.1.2	Critérios de Exclusão	27
3.2	Métodos	28
3.2.1	Dados Epidemiológicos	28
3.2.2	Dados Clínicos	28
3.2.3	Estadiamento	28

3.2.4	Tratamento	29
3.2.5	Evolução dos Pacientes	30
3.2.6	Análise Histológica	31
3.3	Análise Estatística	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>38</b>
4.1	Resultados Descritivos	38
4.1.1	Características Sociodemográficas	38
4.1.2	Achados Clínicos	39
4.1.3	Tratamento	41
4.1.4	Evolução dos Pacientes	42
4.1.5	Histologia	43
4.1.6	Características do grupo de estudo e da totalidade de pacientes admitidos no mesmo período	43
4.1.7	Imunoexpressão de WT1 e p53 nos diferentes componentes do tumor de Wilms	44
4.1.8	Imunoexpressão de $\beta$ -Catenina, E-Caderina e APC	46
4.1.9	Imunoexpressão de $\beta$ -Catenina nos diferentes Componentes do Tumor de Wilms e no Rim Normal	59
4.1.10	Imunoexpressão de E-Caderina nos diferentes Componentes do Tumor de Wilms e no Rim Normal	52
4.1.11	Imunoexpressão de APC nos diferentes Componentes do Tumor de Wilms e no Rim Normal	53
4.2	Associação entre as Variáveis	55
4.2.1	Associação entre Idade e Estádio	55
4.2.2	Associação entre Estádio e Recaída	56
4.2.3	Associação entre Recaída e Óbito	56
4.2.4	Associação do Tipo Histológico e realização de Quimioterapia Pré-Operatória	57
4.2.5	Associação entre a Imunoexpressão de WT1 e p53	57
4.2.6	Associação entre a Imunoexpressão de WT1 e p53 com as variáveis Clínicas	58

4.2.7	Associação da Positividade da $\beta$ -Catenina, E-Caderina e APC com Idade, Estádio, Quimioterapia Pré-Operatória e Recaída	59
4.2.8	Associação da Positividade de WT1 e p53 com Imunoexpressão de $\beta$ -Catenina, e-Caderina e APC	61
4.2.9	Associação da Positividade de Imunoexpressão de $\beta$ -Catenina, E-Caderina e APC nos diferentes Componentes Celulares	63
4.3	Sobrevida	68
4.3.1	Sobrevida Global e Livre de Eventos	68
4.3.2	Sobrevida Livre de Eventos de acordo com Sexo, Idade e Estádio	68
4.3.3	Sobrevida Livre de Eventos de acordo com Expressão de WT1, p53, $\beta$ -Catenina, E-Caderina e APC	70
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>96</b>
6.1	Principais	96
6.2	Secundárias	97
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>98</b>

## **ANEXOS**

**Anexo 1** Ficha para levantamento dos dados clinico-epidemiológicos

**Anexo 2** Planilha do TMA

**Anexo 3** Expressão de  $\beta$ -Catenina E-Caderina e APC dos 96 pacientes

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O nefroblastoma ou tumor de Wilms é o tumor renal maligno mais freqüente da infância. De cada 100.000 vivos até 15 anos de idade, oito são acometidos pelo nefroblastoma (BRESLOW e BECKWITH 1982).

A manifestação clínica mais comum é a presença de massa abdominal assintomática, que muitas vezes é percebida acidentalmente por um familiar ou em consulta de rotina no momento do exame físico feito pelo pediatra. Quando ocorrem outros sinais e sintomas, os mais freqüentes são dor abdominal, hematúria macro ou microscópica e hipertensão arterial, que ocorre em 25% dos casos e é atribuída ao aumento da atividade de renina (DOME et al. 2006).

A grande maioria dos pacientes com tumor de Wilms apresenta comprometimento de um rim. Os casos de tumor de Wilms bilaterais são bem menos freqüentes, representam 5 a 10% dos casos e podem ser sincrônicos, com incidência em torno de 4 a 7 %, ou metacrônicos, com incidência de 1 a 2% (DOME et al. 2006).

É bem estabelecida a relação entre tumor de Wilms e alterações congênitas. Cerca de 10% dos pacientes com tumor de Wilms apresenta malformações congênitas. Tem sido descrito que pacientes com determinadas malformações ou síndromes congênitas apresentam maior

risco de apresentar nefroblastoma. As alterações congênitas estão intimamente relacionadas ao estágio da doença, aos achados histológicos e a idade do paciente ao diagnóstico (BRESLOW e BECKWITH 1982; FRANCO et al. 1991; DOME et al. 2006).

O estadiamento do tumor de Wilms está basicamente relacionado aos achados clínicos, cirúrgicos e anátomo patológicos. O estágio que a doença apresenta no momento do diagnóstico é o mais importante fator clínico capaz de influenciar o prognóstico desses pacientes.

Os achados histopatológicos encontrados no tumor de Wilms refletem a embriogênese do rim normal. Esta neoplasia é constituída primordialmente por túbulos e glomérulos associados ao mesênquima. O nefroblastoma pode apresentar-se sob diferentes aspectos histológicos. Muitos estudos têm demonstrado que as características histológicas do tumor de Wilms estão intimamente relacionadas com a idade de aparecimento da doença, estadiamento, resposta ao tratamento quimioterápico e ao prognóstico desses pacientes (BECKWITH 1983, 1996).

O tumor de Wilms tem representado um importante modelo para o estudo dos mecanismos de carcinogênese. Evidências têm demonstrado que determinados casos de tumor de Wilms são secundários à perda da função de genes supressores de tumor (KNUDSON e STRONG 1972, DOME et al. 2006).

Seguindo o mesmo modelo proposto para o retinoblastoma, KNUDSON e STRONG (1972) descreveram que o tumor de Wilms se desenvolveria como consequência de dois eventos mutacionais. O primeiro

evento poderia ser pré-zigótico (constitucional, germinal) ou pós-zigótico. Nos casos de doença hereditária o primeiro evento seria sempre pré-zigótico, e os indivíduos afetados apresentariam risco de desenvolver múltiplos tumores, pois todas as células seriam afetadas pelo primeiro evento e conseqüentemente apenas um novo evento seria necessário para o desenvolvimento do tumor. Por outro lado, nos casos de tumores esporádicos ou não-hereditários, seriam necessárias duas mutações somáticas independentes em uma mesma célula.

Atualmente sabe-se que o mecanismo genético de desenvolvimento do tumor de Wilms não é tão claro quanto o do retinoblastoma, no qual um único gene (gene *RB*), quando tem suas duas cópias inativadas é responsável pelo desenvolvimento do tumor. No tumor de Wilms muitas regiões cromossômicas e genes têm sido relacionados com a carcinogênese, e nenhuma dessas alterações genéticas, até então descritas, é capaz de explicar todos os casos de tumor de Wilms.

Evidências sugerem que os fatores genéticos, clinico-epidemiológicos e histológicos estão intimamente relacionados entre si. O melhor conhecimento desta relação pode ser um fator capaz de um melhor entendimento sobre o desenvolvimento dessa doença (FRANCO et al. 1991; BONAITI-PELLIE et al. 1992).

O pico de incidência do tumor de Wilms ocorre no segundo e terceiro anos de vida, sendo que 75% dos pacientes têm menos que 5 anos de idade no momento do diagnóstico e 90% têm menos que 7 anos. Esse tumor é raro em recém-nascidos e adultos (BIRCH e BRESLOW 1995).

O tumor de Wilms é ligeiramente mais freqüente entre pacientes do sexo feminino que do masculino. Os pacientes do sexo masculino costumam apresentar a doença mais precocemente. A média de idade entre os meninos é de 41,5 meses enquanto que para as meninas é de 46,9 meses. Resultados do primeiro estudo do Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento do Tumor de Wilms (GBTTW), mostraram que a idade média para os meninos foi 37 meses e das meninas 46 meses (PASTORE et al. 1988; FRANCO et al. 1991, DE CAMARGO 1996; DOME et al. 2006).

Pacientes com tumor bilateral tendem a ser mais novos que aqueles com tumor unilateral. Para os que apresentam tumor bilateral a média de idade é 29,5 meses para os meninos e 32,6 para as meninas (BRESLOW e BECKWITH 1982; PASTORE et al. 1988).

É descrito que o nefroblastoma é mais freqüente em negros que em brancos, sendo raro entre os asiáticos. Acredita-se que essa diferença na incidência entre as raças esteja relacionada principalmente à forma hereditária. As crianças negras com tumor de Wilms costumam ter mais anomalias congênitas que as brancas, entretanto a freqüência de tumor bilateral não apresenta diferença significativa entre as raças (KRAMER et al. 1984; PASTORE et al. 1988; BRESLOW et al. 1996).

A grande maioria dos casos da doença corresponde à forma esporádica. A forma familiar do tumor de Wilms ocorre em 1 a 2% dos casos e está relacionada à herança autossômica dominante, com variável penetrância e expressividade (KNUDSON 1993).

Alguns casos de tumor de Wilms estão associados à anomalias congênitas como aniridia, hemihipertrofia e mal-formações gênito-urinárias, ou associados à síndromes, como síndrome de Beckwith-Wiedeman (hemihipertrofia, macroglossia, onfalocele, visceromegalia), Denys-Drash (tumor de Wilms, pseudohemafroditismo e/ou doenças renais) e WAGR (tumor de Wilms, aniridia, anomalias genitais e retardo mental) (BRESLOW e BECKWITH 1982; BIRCH e BRESLOW 1995; DOME et al. 2006).

De acordo com KNUDSON e STRONG (1972), crianças com aniridia e hipospádia, teriam adquirido a primeira mutação em fase pré-zigótica, enquanto que nos pacientes com hemihipertrofia a primeira mutação teria sido pós-zigótica. A segunda mutação ocorreria em todos os casos após a concepção, ou seja, seria pós-zigótica. As síndromes congênitas são mais freqüentemente encontradas em pacientes com tumor de Wilms bilateral e nesses casos o diagnóstico costuma ser mais precoce (PASTORE et al. 1988).

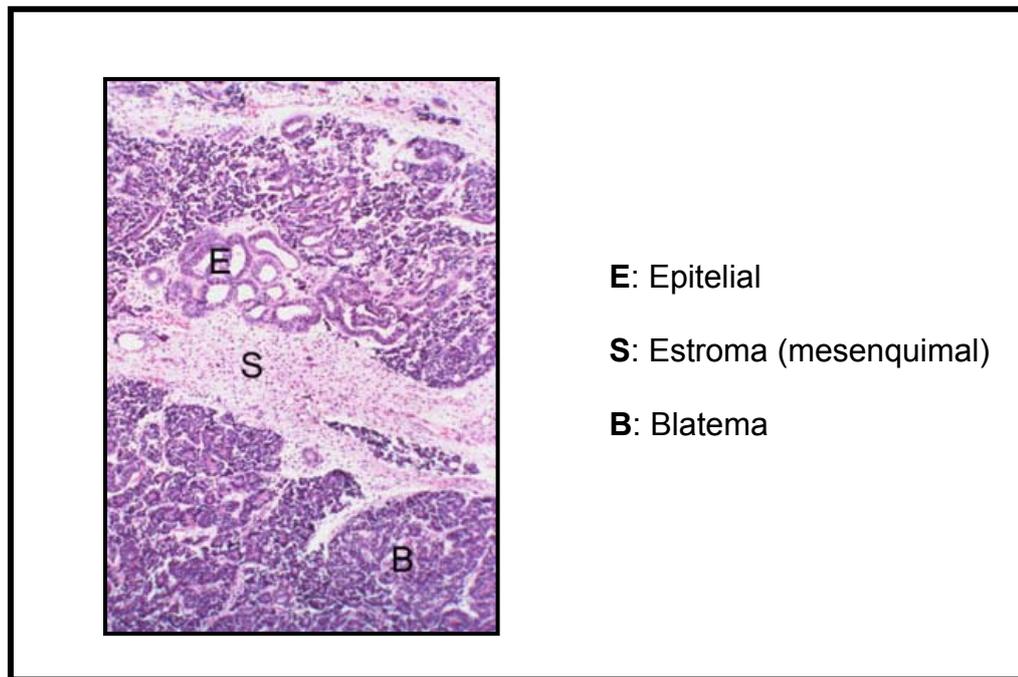
## **1.2 ANATOMIA PATOLÓGICA**

### **1.2.1 Histologia**

Histologicamente o tumor de Wilms é constituído por três componentes celulares em proporções variáveis: componente blastematoso, componente estromal ou mesenquimal e componente epitelial (Figura 1). O componente blastematoso é constituído por pequenas células redondas indiferenciadas análogas às células primitivas do blastema metanéfrico dos

embriões. Os elementos epiteliais se apresentam principalmente sob a forma de túbulos, estruturas glomerulares embrionárias, estruturas papilares e rosetas. Os elementos estromais geralmente consistem de tecido fibro-conjuntivo frouxo ou mixóide. Derivados mesodérmicos como músculo liso, músculo estriado, tecido adiposo, cartilagem ou osso podem estar presentes (BECKWITH 1983, 1993).

Acredita-se que o desenvolvimento dos três componentes celulares se correlacione aos diferentes estágios de desenvolvimento embrionário normal dos rins. Comumente um desses elementos é predominante, o que pode apresentar influência sobre o prognóstico. No *National Wilms Tumor Study* (NWTs) foi descrito que tumores com predomínio do componente epitelial estavam associados com estádios mais precoces, com menor idade ao diagnóstico e com pobre resposta à quimioterapia. Os tumores com predomínio blastematoso associaram-se mais freqüentemente com doença avançada e em pacientes mais velhos, porém com melhor resposta à quimioterapia (BECKWITH et al. 1996).



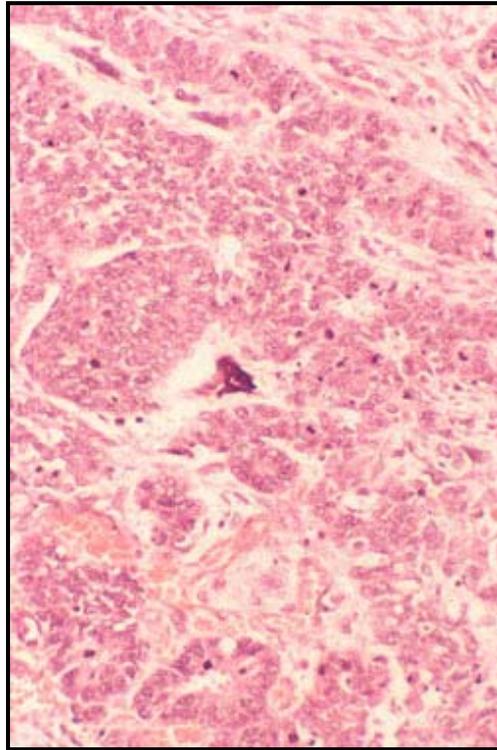
**Figura 1** - Histologia trifásica do tumor de Wilms típico.

### 1.2.2 Anaplasia

Os tumores que apresentam anaplasia são considerados de histologia desfavorável. Os critérios para diagnóstico de anaplasia são: (1) núcleo celular com diâmetro pelo menos 3 vezes maior que o diâmetro dos núcleos das células adjacentes, (2) hiper cromasia determinada pelo aumento do conteúdo de cromatina, (3) figuras de mitose atípica. Todos esses fatores devem ser caracterizados para se fazer a identificação de anaplasia (Figura 2). A frequência de anaplasia é aproximadamente 5% e está correlacionada com a idade do paciente ao diagnóstico. A anaplasia raramente é encontrada em tumores de pacientes com menos de 2 anos de idade, mas em pacientes com mais 5 anos de idade essa frequência chega a 13% (BECKWITH e PALMER 1978).

A anaplasia é classificada com focal ou difusa. Inicialmente essa denominação baseava-se na presença de um ou mais focos de anaplasia independente do local onde era encontrada. Atualmente essa classificação apresenta valor prognóstico, com base no fato de que a presença de anaplasia está relacionada a resistência à quimioterapia e não à agressividade ou capacidade de disseminação do tumor. Assim quando a anaplasia é encontrada em tecido extra-renal o prognóstico é pior, pois não é passível de ressecção (FARIA et al. 1996).

A atual definição de anaplasia difusa inclui um dos seguintes critérios: (1) presença de anaplasia em qualquer sítio extrarenal, incluindo vasos do seio renal, infiltração extracapsular, linfonodos comprometidos ou em metástase; (2) presença de anaplasia em biópsia randômica; (3) anaplasia encontrada em uma região do tumor que apresenta extremo pleomorfismo nuclear (“nuclear unrest”); (4) presença de anaplasia em mais de um foco do tumor. Em síntese, sempre que existem evidências de anaplasia em sítio extra-renal ela é considerada difusa, enquanto que quando todas evidências demonstram apenas anaplasia confinada ao rim ela é denominada de anaplasia focal (FARIA et al. 1996; BECKWITH 1997).



**Figura 2** - Tumor de Wilms com anaplasia.

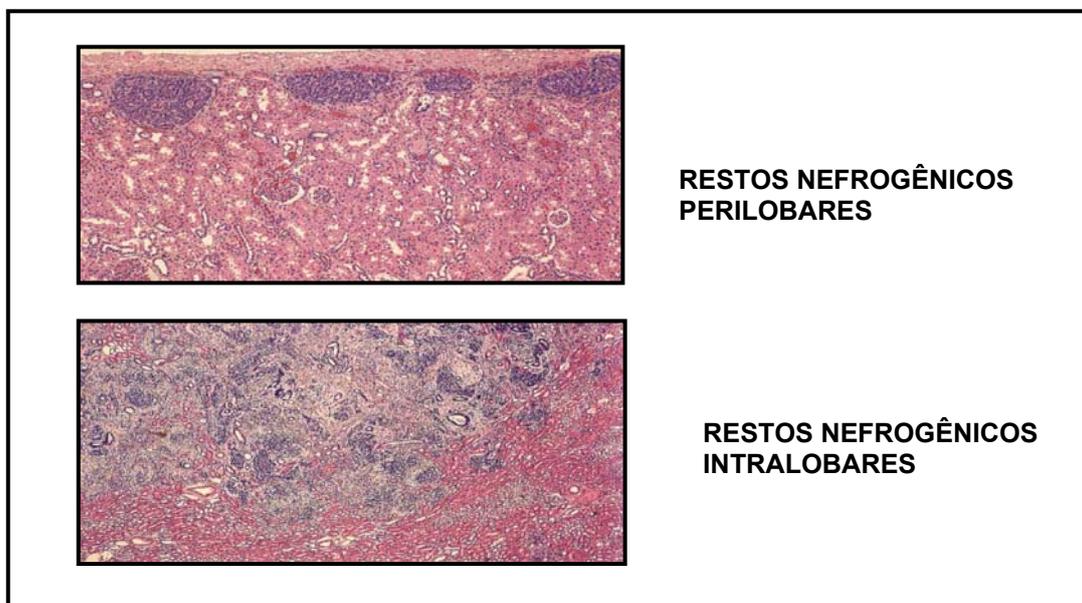
### **1.2.3 Restos nefrogênicos**

Restos nefrogênicos são grupos de células embrionárias que persistem no parênquima renal, durante o desenvolvimento embrionário (Figura 3) (BECKWITH 1998).

Restos nefrogênicos são reconhecidos como lesões precursoras do tumor de Wilms. São encontrados em cerca de 25% dos tumores unilaterais e em 100% dos bilaterais. De acordo com sua localização no rim, os restos nefrogênicos são denominados de perilobares ou intralobares (Figura 3). Os restos nefrogênicos perilobares estão localizados na periferia do lobo renal, principalmente na região subcortical. São compostos de células

blastematosas ou epiteliais embrionárias, formando lesões que comumente apresentam limites bem definidos. Os restos nefrogênicos intralobares podem ser encontrados em qualquer localização dentro do lobo renal, sendo frequentemente constituídos por células estromais localizadas em meio aos nefrons normais, apresentando limites mal definidos. Os restos nefrogênicos intralobares costumam formar lesão única e ocorrem precocemente no desenvolvimento renal, enquanto os perilobares tendem a ser múltiplos e desenvolvem-se tardiamente durante a nefrogênese. Pacientes com restos nefrogênicos intralobares apresentam em média 23 meses de idade no momento do diagnóstico e os que têm restos nefrogênicos perilobares em torno de 36 meses (BECKWITH 1993, 1998).

Pacientes com mutação dos genes *WT1* ou *WT2* têm maior incidência de restos nefrogênicos, o que sugere que essas mutações estão relacionadas com a persistência anormal de células embrionárias. Os restos nefrogênicos perilobares estão associados à hemihipertrofia e síndrome de Beckwith-Wiedemann. Os restos nefrogênicos intralobares estão associados às síndromes WAGR e Denys-Drash (BECKWITH 1998; CHARLES et al. 1998).



**Figura 3** - Restos nefrogênicos

### 1.3 **TISSUE MICROARRAY (TMA)**

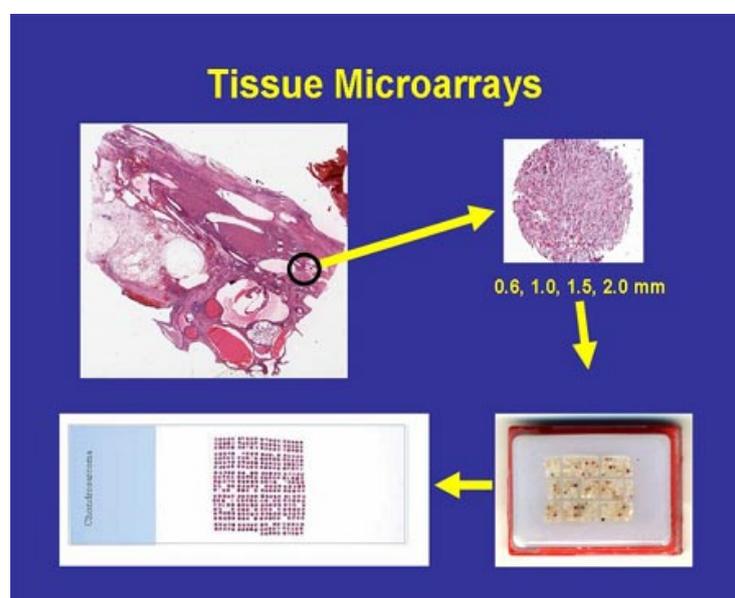
A imunohistoquímica é uma técnica muito utilizada para estudar a expressão de proteínas, principalmente nas pesquisas em tecido tumoral, entretanto este é um método trabalhoso e relativamente caro, especialmente pela necessidade de ser realizado em grande número de casos na maioria dos estudos. Realização de imunohistoquímica utilizando a técnica de TMA permite a análise de muitas amostras teciduais em uma única lâmina, otimizando custo e tempo.

A descrição da técnica de TMA foi feita por KONONEN et al. (1998) e consiste na construção de bloco de parafina a partir de vários blocos de parafina originários. Utilizando agulha cujo diâmetro pode variar de 0,6 a 2 milímetros, são coletados fragmentos cilíndricos de tecidos contidos no bloco

de parafina original e inseridos em um bloco receptor seguindo uma ordem pré-determinada. Deste novo bloco construído, com até 500 amostras, são obtidas as lâminas para estudo (Figura 4) (MOCH et al. 2001; BUBENDORF et al. 2001; ANDRADE et al. 2007).

O bloco de TMA construído permite a realização de vários estudos diferentes, uma vez que é possível realizar de 100 a 400 cortes neste bloco. Vários tipos de análises, tais como DNA, RNA e expressão de proteínas, podem ser realizadas a partir do tecido contido no bloco receptor (BUBENDORF et al. 2001; SIMON e SAUTER 2002).

Considera-se que as amostras contidas no TMA são altamente representativas dos seus tecidos doadores, apesar do pequeno diâmetro do espécime obtido (BUBENDORF et al. 2001; HENDRIKS et al. 2003).



**Figura 4** - Representação da construção do TMA a partir do tecido até confecção da lâmina para análise.

## 1.4 BIOLOGIA GENÉTICA E MOLECULAR

A primeira evidência que uma alteração cromossômica específica estaria associada ao tumor de Wilms, foi a demonstração que pacientes com aniridia e tumor de Wilms frequentemente têm deleção do 11p13, que contem o gene *WT1*. Em um grupo de tumor de Wilms foi observada perda da heterozigose do cromossomo 11p15, sugerindo que nesse *locus* pudesse haver um segundo gene relacionado ao desenvolvimento do tumor de Wilms. Este segundo gene ainda não foi isolado, mas já é denominado *WT2*. O 11p15 está associado à síndrome de Beckwith-Wiedemann (Figura 5) (KOUFOS et al. 1989; PING et al. 1989).

Pacientes com mutação germinal em *WT1* ou *WT2* apresentam alta incidência de restos nefrogênicos, sugerindo que essas mutações predispõem a persistência anormal de células embrionárias. Esse fato sugere que essas mutações ocorrem precocemente no desenvolvimento do tumor de Wilms (CHARLES et al. 1998).

Alterações nos cromossomos 1p, 7p, 16q, 17q e 19p também têm sido associadas à tumorigênese e prognóstico do nefroblastoma (COPPES e PRITCHARD-JONES 2000; DOME e COPPES 2002).

Recentemente o gene *WTX*, mapeado no cromossomo Xq11.1, foi descrito como multado ou inativado em aproximadamente um terço de pacientes com tumor de Wilms. Tumores com mutações em *WTX* não apresentaram mutações em *WT1*, sugerindo que as alterações destes dois

genes juntas possam explicar quase a metade dos casos de tumor de Wilms (RIVERA et al. 2007).

#### 1.4.1 WT1

Em 1978, demonstrou-se que crianças com síndrome WAGR apresentavam uma deleção constitucional no 11p13, conferindo às mesmas um fenótipo hereditário, secundário a esta alteração em todas as células incluindo as células germinais. Esta foi a primeira pista para a descoberta de um gene relacionado ao desenvolvimento do tumor de Wilms (RICCARDI et al. 1978; BONETTA et al. 1990).

Posteriormente foi descoberto que o desenvolvimento da síndrome WAGR envolve alterações em genes, como o *PAX6* (envolvido no desenvolvimento da aniridia) e o gene *WT1* (Figura 5) (BONETTA et al. 1990).

O *WT1* é um gene composto por 10 éxons. Pode codificar 4 diferentes isoformas da proteína WT1. A proteína WT1 tem um tamanho de 45 a 49 Kd e contém domínios funcionais, indicando que ela é um fator de transcrição, ou seja, uma proteína que regula a expressão de outros genes (GREEN et al. 1996; COPPES e PRITCHARD-JONES 2000).

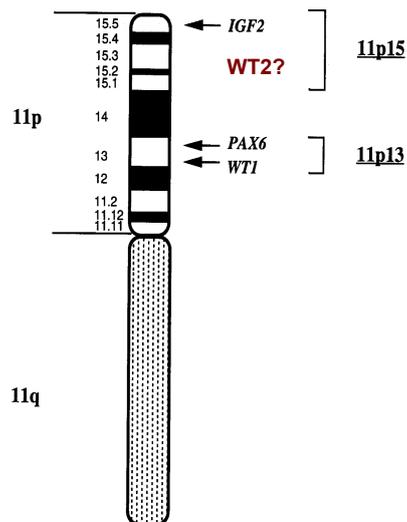
O *WT1* codifica um membro da família “zinc-finger” (dedos de zinco) de fatores de transcrição, e é responsável pelo controle da expressão e proliferação de vários genes alvos, tais como *E-caderina*, fator II de crescimento insulina-like, receptor do fator I de crescimento insulina-like, fator de crescimento derivado de plaqueta, syndecan 1, pax-2, Dax-1 e

amphiregulin (COPPES e PRITCHARD-JONES 2000; PRITCHARD-JONES 2002).

A mutação de um dos alelos do *WT1* pode estar associada a alterações genitourinárias, síndrome de Denys-Drash, aniridia ou síndrome WAGR. A mutação do *WT1* tem sido relacionada com a apresentação histológica do tumor de Wilms. SCHUMACHER et al. (1997) descreveram associação entre mutação germinal do *WT1* com predomínio do componente estromal, sugerindo que em pacientes com mutação germinal do *WT1* haveria predisposição ao desenvolvimento de tumor com predomínio deste componente.

A forma recombinante do *WT1*, produzida pelo gene mutado pode ser detectada por reações de imunistoquímica.

Os numerosos estudos e melhor conhecimento do *WT1* têm permitido compreender o mecanismo de desenvolvimento do rim normal e a tumorigênese do tumor de Wilms. Apesar disso, em pacientes com tumor de Wilms encontra-se apenas 5% de mutações constitucionais e 10% de mutações somáticas. A baixa frequência de mutações do *WT1* sugere que outros genes estejam envolvidos na gênese do tumor de Wilms (DOME e COPPES 2002).



**Figura 5** - Representação do 11p13 E 11p15

#### 1.4.2 p53

O *p53* é um gene supressor de tumores localizado no braço curto do cromossomo 17, e sua mutação é a mais freqüente nos cânceres humanos. Entretanto no tumor de Wilms a freqüência dessa mutação é baixa, ocorrendo em menos de 10% dos casos (TAKEUCHI et al. 1995).

O *p53* regula a trombopoetina-1 supressora da angiogênese endógena (TSP-1) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Atua como um regulador negativo da proliferação celular e como um regulador positivo de apoptose de células que sofrem danos no DNA durante a fase G1/S do ciclo celular (HOLLSTEIN et al. 1991).

Atuais estudos têm demonstrado que a mutação do *p53* está relacionada com histologia e prognóstico desfavoráveis. Esta mutação é incomum em tumor de Wilms com histologia favorável, mas cerca de 75% dos tumores com anaplasia apresentam a mutação do *p53*. A

imunoexpressão da proteína p53 por técnicas de imunistoquímica tem sido associada ao prognóstico desfavorável, mas pode ocorrer na ausência da mutação do gene *p53*, indicando que o acúmulo anormal da proteína p53 não ocorre exclusivamente por mutação deste gene, mas pode ser secundária à alterações na estabilização da proteína p53, causada por outras proteínas (CHEAH et al 1996, LAHOTI et al. 1996; SREDNI et al. 2001; BENIERS et al. 2001).

### 1.4.3 $\beta$ -catenina

$\beta$ -catenina é uma proteína de adesão celular, que age como fator ativador de células T (TcF) e regula a transcrição de genes como *c-myc*, *c-jun*, *fra-1* e *cyclin D1*, os quais podem estar associados com a tumorigênese em humanos. Esta proteína é um efetor central no sinal de transdução e a sua não regulação está associada ao desenvolvimento de uma série de doenças malignas (BARKER e KLEVERS 2000).

Mutação da  $\beta$ -catenina está presente em cerca de 15% dos casos de tumor de Wilms. Nesses casos a mutação envolve sítios de fosforilação que são determinantes críticos para estabilidade da  $\beta$ -catenina (KOESTERS et al. 1999; BARKER e KLEVERS 2000; KOESTERS et al. 2003).

Alguns estudos têm sugerido que a mutação da  $\beta$ -catenina está associada ao desenvolvimento renal e com tumorigênese do nefroblastoma. Existe uma relação altamente significativa entre mutação da  $\beta$ -catenina e mutação do *WT1*. Este fato sugere que esses dois genes possam agir em

caminhos distintos, atuando na gênese de alguns casos de tumor de Wilms (MAITI et al. 2000).

#### **1.4.4 E-Caderina**

As caderinas são glicoproteínas de membrana dependentes de cálcio. A E-caderina (caderina epitelial) tem a maior parte da sua cadeia polipeptídica localizada na região extracelular onde interage com as caderinas das células vizinhas garantindo a adesão célula-célula e conseqüentemente a morfologia do epitélio. No componente intracelular as caderinas, mediada pelas cateninas, ligam-se a filamentos de actina ou ao citoesqueleto. Alterações nos complexos intra ou extracelular da E-caderina acarretam perda da capacidade de adesão intercelular, levando a formação e/ou disseminação tumoral (HAJRA e FEARON 2002; KREMER et al. 2003).

A quebra ou inativação do complexo formado pela E-caderina, pode ocorrer por diferentes mecanismos. Alguns estudos têm tentado relacionar baixos níveis de expressão de E-caderina em membrana, com comportamento mais agressivo no tumor de Wilms, baseando-se no fato que alterações na adesão E-caderina-catenina possam contribuir para um fenótipo de tumor pobremente diferenciado e aumento da capacidade invasiva da célula tumoral (ALAMI et al. 2003; SAFFORD et al. 2005).

#### **1.4.5 APC**

O gene *adenomatosis poliposys of the colon* (APC) está localizado no cromossomo 5q21-q22 e em condições normais tem a função de inibir a

atividade da proteína  $\beta$ -catenina, promovendo sua fosforilação pela glicogênio sintetasequinase culminando com sua degradação pelo sistema de proteasoma. Quando há mutação do gene *APC* ele perde a capacidade de levar a degradação da  $\beta$ -catenina, que passa a se acumular no citoplasma e no núcleo da célula, onde passa a atuar como um fator de transcrição de alguns genes promotores do ciclo celular. A proteína APC atua como um supressor de tumor, agindo na sinalização intracelular, interação com o citoesqueleto e controle da proliferação celular (HOULSTON 2001).

A mutação do gene do gene *APC* e anormalidades da expressão da proteína APC em câncer de cólon é bem descrita na literatura, entretanto existem poucos estudos que investiguem o papel de alterações do *APC* em tumor de Wilms.

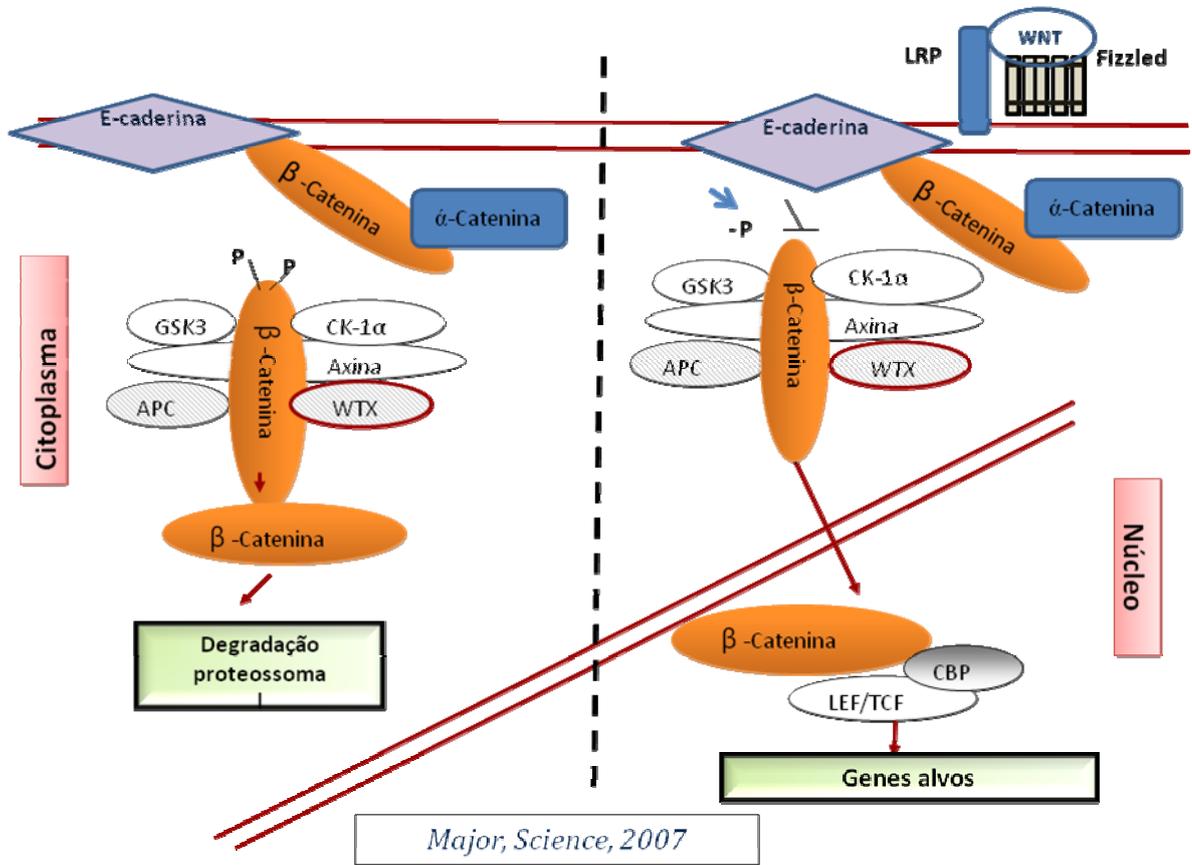
#### **1.4.6 Via Wnt**

A via Wnt (*wingless*) é constituída por um grupo de genes que codificam um grupo de glicoproteínas de sinalização, que atuam por meio de diferentes atividades e vias. Entre essas vias a mais importante relacionada com neoplasias, é a via que envolve a  $\beta$ -catenina e o APC. O APC atua controlando os níveis citoplasmáticos de  $\beta$ -catenina, por meio do complexo GSK-3/APC/axina. Quando ocorre a dissociação desse complexo por ativação da via Wnt, secundária a ligação dos Wnts aos receptores *frizzled* da membrana celular, a degradação da  $\beta$ -catenina é inibida, resultado em seu acúmulo no citoplasma e núcleo. Quando se acumula no núcleo, a  $\beta$ -

catenina associa-se a membros da família de fatores de transcrição que agem sobre os genes alvos da via Wnt, como *c- Myc*, *ciclina D1*, *MMP-7*, *IFT-2*, *COX2* (Figura 6) (HAJRA e FEARON 2002; LOGAN e NUSSE 2004).

Muitos estudos têm demonstrado a participação da via Wnt na tumorigênese de vários tipos de neoplasias, que em muitos casos levam ao acúmulo da  $\beta$ -catenina no núcleo, seja pela mutação do gene *APC*,  $\beta$ -*catenina* ou de outros membros dessa via de sinalização.

A recente publicação de RUTESHOUSER et al. (2008), descreveu o envolvimento do gene *WTX* com a via Wnt, sendo que 20% dos tumores que apresentavam mutação de *WT1* ou de *CTNNB1*, ou de ambos, tinham mutação do *WTX*.



**Figura 6** - Representação da via de sinalização WNT

## **1.5 CORRELAÇÃO BIOMOLECULAR, CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICA E HISTOLÓGICA NO TUMOR DE WILMS**

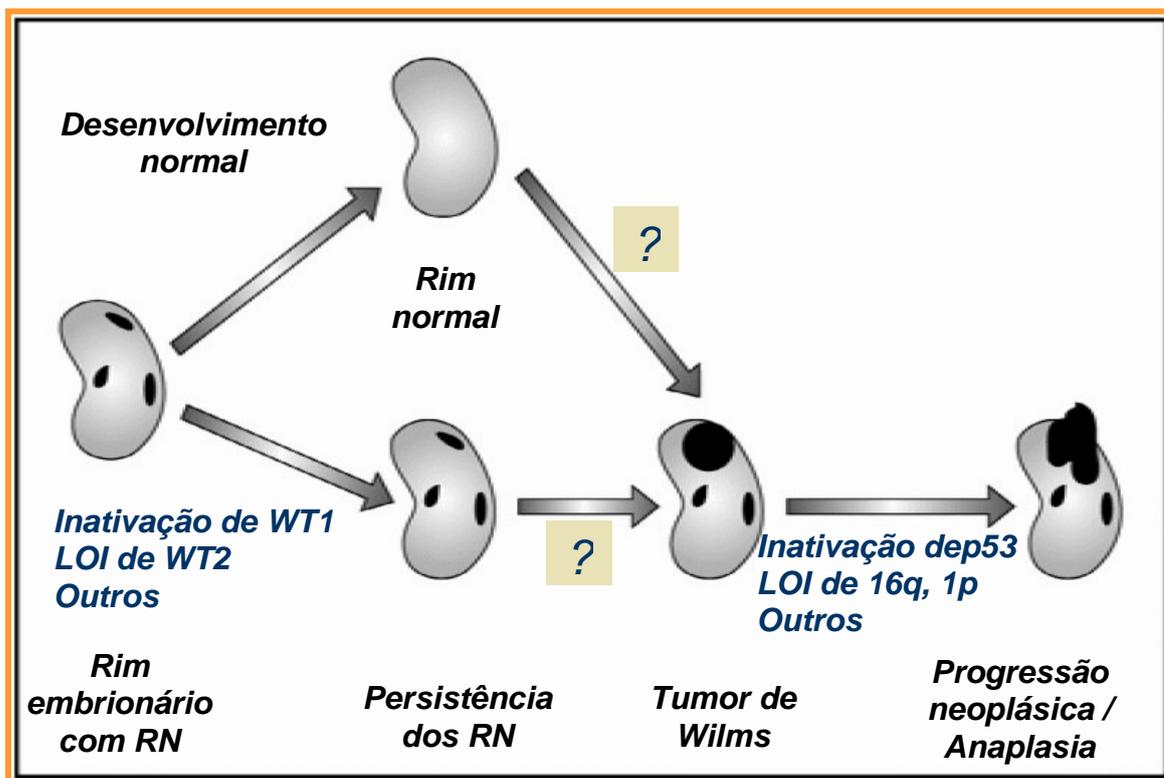
No tumor de Wilms certos aspectos clínicos, histológicos e biológicos estão bem definidos como fatores de prognóstico. Além disso, o tratamento dos pacientes com este tumor é considerado como um grande sucesso da oncologia pediátrica, visto que atualmente a sobrevida livre de doença das crianças portadoras de tumor de Wilms em 5 anos está em torno de 80 a 90% (DE CAMARGO et al. 1987; DE CAMARGO e FRANCO 1991; GREEN et al. 1998).

Um dos desafios atuais no estudo desta doença tem sido entender a sua tumorigênese. A tumorigênese do tumor de Wilms tem se mostrado muito complexa. Alguns eventos histológicos e biológicos têm sido sugeridos como capazes de desencadear ou manter a tumorigênese, entretanto várias etapas desse mecanismo de tumorigênese ainda são desconhecidas. Para um melhor entendimento da patogênese do tumor de Wilms são necessários estudos que correlacionem os achados clínico-epidemiológicos, com seus aspectos histológicos e moleculares, visto que alguns estudos têm demonstrado que essas variáveis podem estar intimamente relacionadas entre si (DOME e COPPES 2002).

BRESLOW et al. (2006) descreveram que os pacientes com tumor de Wilms diagnosticados com menor idade, são os que apresentam doença familiar (mediana = 27 meses de idade), com tumor bilateral (mediana=27 meses de idade) ou com unilateral multicêntrico (mediana= 32 meses de

idade) e aqueles que apresentam restos nefrogênicos intralobares (mediana= 20 meses de idade). Pacientes com doença unicêntrica ou com restos nefrogênicos perilobares, são diagnosticados com idade mais avançada (mediana=40 e 46 meses de idade respectivamente). É observada uma variação da idade de diagnóstico dos pacientes com tumor de Wilms bilateral, de acordo com os restos nefrogênicos encontrados; aqueles com restos intralobares são diagnosticados em idade mais precoce que aqueles com restos nefrogênicos perilobares (mediana=14 e 40 meses respectivamente).

Inativação do gene *WT1* ou perda de imprinte do *locus* do *WT2* predispõe a persistência anormal de restos nefrogênicos. Os restos nefrogênicos podem sofrer ação de outros eventos genéticos, evoluindo para sua degeneração ou formação do tumor. Após formado o tumor de Wilms pode sofrer ação subsequente à eventos genéticos, tais quais mutação do *p53* ou perda da heterozigose dos cromossomos 16q ou 1p, os quais podem afetar o comportamento do tumor influenciando em sua agressividade (Figura 7). Como não é comprovado que todos os tumores de Wilms originam-se de restos nefrogênicos, este modelo não é capaz de explicar a tumorigênese de todos os casos de tumor de Wilms (DOME e COPPES 2002).



Fonte: DOME e COPPES (2002)

Figura 7 - Modelo de tumorigênese para tumor de Wilms

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVOS PRINCIPAIS**

- 1 Avaliar pela técnica de imunohistoquímica a expressão de WT1, p53,  $\beta$ -catenina, E-caderina e APC nos diferentes componentes histológicos do tumor de Wilms e de tecido renal normal peritumoral, utilizando o método de TMA;
- 2 Avaliar a imunoexpressão de  $\beta$ -catenina, E-caderina e APC nos componentes celulares (membrana, citoplasma e núcleo) do tecido tumoral;
- 3 Correlacionar os achados de expressão das proteínas estudadas com as características clínicas, epidemiológicas, tratamento e evolução do pacientes e determinar essa expressão pode alterar a sobrevida dos pacientes.

## **2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

- 1 Descrever as características clínicas, epidemiológicas, tratamento e evolução dos pacientes.
- 2 Estimar a probabilidade de sobrevida global e livre de eventos no grupo de pacientes estudados.

### **3 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **3.1 CASUÍSTICA**

Estudo retrospectivo, constando de pacientes portadores de tumor de Wilms admitidos no Departamento de Pediatria do Hospital A.C. Camargo no período de 1978 a 1999.

##### **3.1.1 Critérios de Elegibilidade**

Foram elegíveis para o estudo os pacientes com tumor de Wilms unilateral admitidos, tratados e com seguimento clínico no Departamento de Pediatria do Hospital A.C. Camargo que tivessem material em bloco de parafina suficiente para construção de TMA e adequado para realização de estudo imunoistoquímico.

##### **3.1.2 Critérios de Exclusão**

Foram excluídos da análise 143 pacientes: vinte que tinham tumor bilateral, 28 que não fizeram tratamento completo ou seguimento no Hospital A.C. Camargo e 95 que não apresentaram material disponível ou em condições para realização do estudo de imunoistoquímica.

## **3.2 MÉTODOS**

Após devida aprovação do comitê de ética médica da instituição, as características clínicas, epidemiológicas, de tratamento e evolução dos pacientes foram obtidas a partir das informações contidas nos prontuários dos pacientes, por meio de preenchimento de uma ficha padronizada (Anexo 1)

### **3.2.1 Dados Epidemiológicos**

A idade do paciente no momento do diagnóstico foi calculada pela diferença entre a data da admissão a data de nascimento do paciente.

Quanto a raça os pacientes foram classificados em brancos e não brancos.

### **3.2.2 Dados Clínicos**

Entre os dados clínicos foram obtidas informações sobre os sinais e sintomas ao diagnóstico, como dor abdominal, hematuria, hipertensão arterial, tumoração palpável. A presença de anomalias congênitas também foi documentada.

### **3.2.3 Estadiamento**

Quanto ao estadiamento, os pacientes foram divididos em estádios I, II, III e IV de acordo com os critérios de estadiamento do NWTS para

tumores renais visto no Quadro 1. Nos pacientes com metástases ao diagnóstico foi descrito o sítio de metástases (pulmão, fígado, outros).

**Quadro 1** - Sistema de estadiamento do National Wilms Tumor Study Group para tumores renais.

<b>Estádio I</b>	Tumor confinado no rim e completamente ressecado. Ausência de invasão da cápsula renal ou envolvimento dos vasos do seio renal.
<b>Estádio II</b>	Tumor com extensão além da cápsula renal (margens cirúrgicas negativas) ou invasão dos vasos do seio renal ou biópsia do tumor.
<b>Estádio III</b>	Tumor inoperável ou margens cirúrgicas comprometidas ou ruptura tumoral ou linfonodos regionais infiltrados por tumor ou trombo tumoral aderido na parede do vaso
<b>Estádio IV</b>	Metástases hematogênicas (pulmões, fígado, osso, cérebro) ou metástases para linfonodos fora do abdômen.
<b>Estádio V</b>	Tumor renal bilateral.

### 3.2.4 Tratamento

Os dados sobre o tratamento realizado incluíram administração de quimioterapia pré-operatória, drogas quimioterápicas utilizadas, realização de cirurgia e radioterapia.

No período de estudo a instituição seguia o protocolo do NWTSG e do GCBTTW, os quais indicavam cirurgia por meio de nefrectomia total como primeira abordagem terapêutica. Os pacientes sem metástases que tinham tumores volumosos, nos quais a ressecção não era indicada, foram tratados como estágio III e recebiam quimioterapia pré-operatória com 2 drogas (actinomicina D e vincristina), mesmo que não apresentassem achados clínicos ou cirúrgicos necessários para serem classificados como estágio III.

De acordo com o estágio clínico, cirúrgico e histológico, os pacientes recebiam quimioterapia pós-operatória com 2 ou 3 drogas quimioterápicas (Quadro 2). Antes de 1986 a actinomicina D era administrada fracionada em 5 dias. De 1986 a 1988, o protocolo I do GCBTTW realizou um estudo randomizado, no qual os pacientes eram sorteados para receber actinomicina em dose única ou fracionada. A partir de 1989 a actinomicina passou a ser realizada em dose única. A duração do tratamento foi de 7 meses para os pacientes com estádios I e II e 15 meses para os estádios III e IV, com exceção do período de 1989 a 1992, quando durante o estudo II do GCBTTW, os pacientes com estágio I receberam quimioterapia pós-operatória por um período de 4 meses.

A radioterapia foi realizada nos pacientes com estádios III e IV.

#### **Quadro 2 - Tratamento dos pacientes.**

<b>Estádio I</b>	CIRURGIA + ACT +VCR
<b>Estádio II</b>	CIRURGIA + ACT +VCR
<b>Estádio III</b>	CIRURGIA + ACT +VCR +ADR+ RXT
<b>Estádio IV</b>	CIRURGIA + ACT +VCR +ADR+ RXT

#### **3.2.5 Evolução dos pacientes**

Em relação a evolução, os pacientes foram divididos entre os que apresentaram recaída e aqueles sem recaída da doença. Foi também considerado o período da recaída, sendo denominado de recaída precoce aquela que ocorresse até 2 anos do diagnóstico e recaída tardia após este período.

O status do paciente foi definido como vivo ou óbito no momento da análise, levando em consideração a última data de acompanhamento descrita no prontuário. A última observação em prontuários para caracterizar o status do paciente foi feita em maio de 2007.

### **3.2.6 Análise Histológica**

Não foi realizada revisão de lâminas para determinar o predomínio dos componentes do tumor de Wilms ou a presença de anaplasia, esses dados foram obtidos retrospectivamente através das informações dos laudos contidos nos prontuários dos pacientes.

A expressão de WT1, p53,  $\beta$ -catenina, E-caderina e APC, foi avaliada por meio de estudo imunohistoquímico dos espécimes tumorais, utilizando TMA

#### **A Construção de TMA**

A construção de TMA foi realizada pelas patologistas (STS e IWC) no Departamento de Patologia do Hospital A.C. Camargo. Os blocos de parafina e correspondentes lâminas com cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina (HE), referentes aos pacientes participantes do estudo foram identificados e casos de tumor de Wilms foram separados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer. As lâminas foram examinadas pela patologista e os diferentes componentes histológicos do tumor (epitelial, blastematoso e/ou mesenquimal) quando presentes foram identificados e demarcados. Baseando-se na marcação mencionada,

o TMA foi construído utilizando-se o dispositivo técnico “tissue microarrayer” (*Beecher Instruments, silver springs, EUA*). Para a construção do bloco de TMA a área correspondente à área demarcada na lâmina para cada componente foi puncionada com agulha de 1mm do bloco doador de tecido e os cilindros obtidos transferidos para o bloco de parafina receptor. Um mapa com identificação detalhada de cada cilindro foi construído em planilha de Excel® (Anexo 2), permitindo a localização de cada caso no bloco de TMA. Um caso foi definido como adequado quando o corte resultante ocupou pelo menos 24% da área total do cilindro. Foram realizados cortes seqüenciais de 4 µm de espessura, que foram colhidos em lâminas adesivas (*Instrumedics - Hackensack NJ, EUA*). Para maximizar o uso do TMA, todos os cortes foram colhidos em uma única sessão e armazenados para uso posterior. O controle do número de casos avaliáveis foi realizado pela coloração de 1 lâmina a cada 25 cortes e pela contagem dos cilindros quando presentes. O TMA foi considerado esgotado quando mais do que 25% das amostras não se encontravam mais presentes nas lâminas.

## **B Protocolo para Reações Imunoistoquímicas**

As reações de imunoistoquímica foram realizadas nas lâminas de TMA. Para cada anticorpo foram utilizadas 4 lâminas de TMA com intervalo de 25 cortes entre elas de modo que cada caso fosse avaliado 4 vezes em áreas distintas.

Um caso foi considerado positivo para p53 e WT1 quando mais de 10% de pelo menos um spot apresentava reação positiva nuclear. Para as

reações de  $\beta$ -catenina, E-caderina e APC foram avaliados os padrões de marcação a nível nuclear, citoplasmático e membrana de cada componente tumoral (blastematoso, estromal e glandular) e no rim normal. Um caso foi considerado positivo para o marcador quando pelo menos 10% das células apresentavam positividade.

Para o estudo imunohistoquímico foi realizado o seguinte protocolo técnico:

- 1 Desparafinização dos cortes das lâminas adesivas de TMA (*Instrumedics - Hackensack NJ, EUA*) e hidratação dos cortes histológicos: 3 banhos em Xilol, 4 banhos de álcool, água corrente;
- 2 Recuperação antigênica por calor, em câmara de pressão controlada por microprocessador (PASCAL) ou banho-maria, com protocolo pré-definido para cada marcador (Quadro 3);
- 3 Lavagem em água corrente por 5 minutos; água destilada;
- 4 Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) 3% , com 3 trocas de 5 minutos cada;
- 5 Lavagem em água corrente por 5 minutos; água destilada;
- 6 Bloqueio de proteínas: 20 minutos com Bloqueador de Proteínas (DAKO) em câmara úmida à temperatura ambiente;
- 7 Retirar excesso do bloqueador;
- 8 Incubação do anticorpo primário em câmara úmida por 2 horas à temperatura ambiente com diluições pré estabelecidas para cada anticorpo (Quadro 3);
- 9 Lavagem em PBS: 3 trocas de 5 minutos cada;

- 10 Incubação anticorpo secundário biotilado (LSAB, DAKO) por 20 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente;
- 11 Lavagem em PBS: 3 trocas de 5 minutos cada;
- 12 Incubação com complexo streptoavidina - peroxidase( LSAB, DAKO) por 20 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente;
- 13 Lavagem em PBS: 3 trocas de 5 minutos cada;
- 14 Revelação da reação com cromógeno diaminobenzidine (DAB): 5 minutos: Kit Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (DakoCytomation, Carpinteria, Califórnia);
- 15 Lavagem em água corrente por 5 minutos;
- 16 Contracoloração com Hematoxilina de Harris por 2 minutos;
- 17 Lavagem em água corrente por 5 minutos;
- 18 Desidratação em álcool, Xilol, montagem das lâminas com entellan (Merck 7961);
- 19 Leitura em microscópio óptico comum.

**Quadro 3** - Características técnicas da reação de imunoistoquímica.

ANTICORPO	DILUIÇÃO	MARCA	CLONE	RECUPERAÇÃO ANTIGÊNCIA	AMPLIFICAÇÃO
WT-1	1./50	DAKO	6F-H2	Pascal Citrato pH6,0	LSAB- HRP
P53	1/1500	DAKO	D0-7	Pascal Citrato pH6,0	LSAB- HRP
B-Catenina	1/1000	BD	14	Pascal Citrato pH6,0	LSAB -HRP
E-Caderina	1/100	DAKO	NCH-38	Banho-Maria EDTA/TRIS pH9,0	LSAB- HRP
APC	1/50	NeoMarkers	Policlonal	Pascal Citrato pH 6,0	LSAB- HRP

**C Amostras**

✓ **Para o estudo do WT1 foram analisados os seguintes componentes:**

1. Blastema: 80 amostras
2. Epitélio: 32 amostras
3. Mesênquima: 30 amostras
4. Parênquima normal: 45

✓ **Para o estudo do p53 foram analisados os seguintes componentes:**

1. Blastema: 75 amostras
2. Epitélio: 57 amostras
3. Mesênquima: 50 amostras
4. Parênquima normal: 45

✓ **Para o estudo da  $\beta$ -catenina foram analisados os seguintes componentes:**

1. Blastema: 83 amostras
2. Epitélio: 55 amostras
3. Mesênquima: 37 amostras
4. Parênquima normal: 30

✓ **Para o estudo da E-caderina foram analisados os seguintes componentes:**

5. Blastema: 70 amostras
6. Epitélio: 59 amostras
7. Mesênquima: 56 amostras
8. Parênquima normal: 30

✓ **Para o estudo do APC foram analisados os seguintes componentes:**

1. Blastema: 79 amostras
2. Epitélio: 54 amostras
3. Mesênquima: 58 amostras
4. Parênquima normal: 45

### **3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Após a coleta dos dados, os mesmos foram registrados em um banco de dados, utilizando-se o “software Windows *Statistical Package for Social Science*” (SPSS) versão 10.0. As variáveis foram distribuídas em categorias.

A associação entre as variáveis foi realizada usando o teste de qui-quadrado bicaudal e quando, dentro de uma Tabela 2x2, teve frequência esperada com valor inferior a 5, foi usado o teste de Fisher.

O cálculo de sobrevida foi realizado usando o método de Kaplan-Meier (KAPLAN E MEIR 1958) e a comparação entre os grupos estudados foi feita através do teste de log-rank.

Para análise da sobrevida global foi considerado como evento o óbito. Para análise da sobrevida livre de eventos foram considerados como eventos o óbito, a recaída e progressão de doença. O tempo até o evento foi o tempo entre a data do diagnóstico até a data do óbito, da recaída ou da progressão de doença.

O intervalo de confiança de 95% e o valor do  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 RESULTADOS DESCRITIVOS**

#### **4.1.1 Características Sociodemográficas**

Foram analisados 96 pacientes com tumor de Wilms. As características sócio-demográficas estão descritas na Tabela 1.

Observa-se discreto predomínio do sexo feminino (59% dos casos) em relação ao sexo masculino (41%).

Setenta e nove pacientes foram considerados brancos, sete negros, um era asiático e 9 classificados como pardos.

A idade dos pacientes ao diagnóstico variou de 1 mês a 26 anos, com média de 41 meses, desvio padrão 47 meses e mediana de 39 meses. Entre os pacientes do sexo masculino a mediana da idade foi 34 meses e no sexo feminino 48 meses. Os pacientes com estágio I ou II tiveram mediana de idade 26 meses e com estágio III ou IV foi 57 meses.

Cinquenta e cinco por cento dos pacientes tinham até 4 anos de idade e 76% tinham até 6 anos no momento do diagnóstico (Tabela 2).

**Tabela 1** - Característica sócio-demográficas dos 96 pacientes.

VARIÁVEIS	CATEGORIAS	N	%
SEXO	MASCULINO	39	41%
	FEMININO	57	59%
RAÇA	BRANCOS	79	82%
	NÃO BRANCOS	17	18%
IDADE	MÉDIA	4 ANOS	
	MEDIANA	3 ANOS	

**Tabela 2** - Distribuição da idade dos 96 pacientes.

IDADE	N	%
< 2 anos	27	28
2 – 4 anos	26	27
>4 anos – 6 anos	21	22
> 6 anos	22	23
Total	96	100

#### 4.1.2 Achados Clínicos

##### A Sinais e Sintomas

Dos 96 pacientes estudados 81 (84%) apresentavam tumoração como queixa no momento do diagnóstico. Quarenta e sete pacientes apresentavam tumoração como o único sinal clínico Ao diagnóstico e os outros 33 tinham tumoração associada a outros sinais e sintomas. Trinta e um pacientes (32%) apresentavam dor ao diagnóstico. Quinze pacientes (16%) apresentavam hematúria. Febre foi detectada em 14 pacientes e apenas em 2 pacientes foi diagnosticada hipertensão arterial (Tabela 3).

**Tabela 3** - Sinais e sintomas apresentados pelos pacientes ao diagnóstico do tumor de Wilms.

<b>SINTOMAS</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Tumor	47	49
Dor	06	06
Hematúria	02	02
Tumor + dor	14	15
Tumor + hematuria	08	08
Dor + hematuria	02	02
Tumor + hematúria + febre + HAS	02	02
Dor+ febre	03	03
Tumor + febre	06	06
Tumor + dor + hematúria + febre	01	01
Dor + vômitos	02	02
Tumor+ dor + vômitos	01	01
Tumor + dor + febre	02	02
<b>Total</b>	<b>96</b>	<b>100</b>

## **B Anomalias Congênitas**

Dos 96 pacientes 2 apresentavam hemihipertrofia.

## **C Estadiamento**

A distribuição dos pacientes por estágio é vista na Tabela 4.

Dos vinte e sete pacientes com estágio III, dez foram considerados como estágio III, por terem recebido quimioterapia pré-operatória.

Dos 12 pacientes metastáticos, oito (67%) apresentavam metástases para os pulmões, um tinha metástases em fígado e três tinham metástases combinadas em pulmão e fígado.

**Tabela 4** - Estádio dos pacientes ao diagnóstico de Tumor de Wilms.

ESTADIO	N	%
I	32	33
II	25	26
III*	27	28
IV	12	13
<b>Total</b>	<b>96</b>	<b>100</b>

\*Incluindo 10 que receberam quimioterapia pré-operatória.

#### 4.1.3 Tratamento

Vinte e um pacientes (22%) foram submetidos a quimioterapia pré-operatória, enquanto que 75 (78%) foram submetidos à cirurgia como primeira abordagem terapêutica. Dos pacientes que receberam quimioterapia como primeiro tratamento 10 tinham tumores volumosos e não apresentavam metástases, por este motivo foram tratados como estágio III. Os 12 pacientes com metástases também receberam quimioterapia pré-operatória.

A maioria dos pacientes (60/63%) recebeu tratamento quimioterápico com 2 drogas (actinomicida e vincristina), trinta e dois por cento (32 pacientes) recebeu três drogas (actinomicina, vincristina e adriamicina) e 5% (5 pacientes) recebeu 4 ou mais drogas quimioterápicas, as quais incluíam carboplatina, ifosfamida e/ou etoposide. O espécime tumoral deste paciente foi aobitdo através de biopsia, pois tratava-se de um paciente fora da faixa etária.

Dos 96 pacientes 41 (42%) foram submetidos ao tratamento radioterápico.

A cirurgia não foi realizada apenas em 1 paciente, que não apresentava metástases ao diagnóstico. Este paciente recebeu quimioterapia como primeira abordagem terapêutica, devido ao grande volume tumoral e evoluiu com progressão de doença, desenvolvendo metástases a distancia e óbito.

#### 4.1.4 Evolução dos Pacientes

Dezenove (20%) dos 96 pacientes estudados apresentaram recidiva.

A recaída foi precoce em 16 casos.

Seis pacientes (32%) recaíram nos pulmões, 9 (47%) recaíram em abdome (1 em loja renal, 3 em fígado e 5 em retroperitônio). Quatro (21%) apresentaram recaída combinada (pulmão + abdome) (Tabela 5).

Quatorze pacientes morreram após recaída. Um paciente teve progressão de doença durante o tratamento e evoluiu para óbito, um paciente teve progressão de doença seguido do óbito após abandono do tratamento, três pacientes morreram durante o tratamento quimioterápico devido quadro séptico em vigência de neutropenia.

**Tabela 5** - Sítio de recaída dos 18 pacientes.

SÍTIO DE RECAÍDA	N	%
<b>Pulmão</b>	06	32
<b>Abdome</b> Loja renal	01	5
Retroperitônio	05	26
Fígado	03	16
<b>Combinada</b> Retroperit. + pulmão	03	16
Fígado+ pulmão	01	5
<b>Total</b>	19	100

#### **4.1.5 Histologia**

Dos 96 casos estudados, cinquenta e um (53%) tinham predomínio do componente blastematoso, quatorze (15%) eram trifásicos sem significativo predomínio de um dos componentes, oito (8%) tinham predomínio do componente epitelial, quatro (4%) do mesenquimal e 19 (20%) eram bifásicos (blastema e epitélio: 8, blastema e mesênquima: 8 e epitélio e mesênquima: 3).

Cinco tumores tinham anaplasia, sendo que 4 tinham anaplasia focal e um difusa.

#### **4.1.6 Características do grupo de estudo e da totalidade de pacientes admitidos no mesmo período**

Por meio da Tabela 6 é possível comparar as características quanto ao sexo, idade, quimioterapia pré-operatória, estágio, recaída e óbito dos 96 pacientes avaliados neste estudo e do total de pacientes, admitidos neste período no Hospital A.C. Camargo.

**Tabela 6** - Características do grupo de estudo e da totalidade de pacientes admitidos no mesmo período.

VARIÁVEIS	CETEGOTIAS	AMOSTRA ESTUDADA	TOTAL
		(96 pacientes)	(239 pacientes)
SEXO	Masculino	39 (41%)	113 (47%)
	Feminino	57 (59%)	126 (53%)
IDADE	Média	4 anos	4 anos
	Mediana	3 anos	3 anos
QT- préop.	Sim	21 (22%)	70 (29%)
	Não	75 (78%)	169 (71%)
ESTÁDIO	I/II	57 (59%)	115 (60%)
	III/IV	39 (41%)	75 (40%)
RECAÍDA	Sim	19 (20%)	50 (20%)
	Não	77 (80%)	188 (80%)
ÓBITO	Sim	19 (20%)	56 (23%)
	Não	77 (80%)	183 (77%)

#### 4.1.7 Imunoexpressão de WT1 e p53 nos diferentes componentes do tumor de Wilms

A proteína WT1 apresentou imunopositividade em 89% dos casos avaliados. Essa imunoexpressão foi mais freqüente nos componentes blastematoso (97% dos casos) e epitelial (87% dos casos); enquanto que no componente mesenquimal avaliado a imunoexpressão ocorreu em apenas 13% dos casos (Tabela 7).

A proteína p53 foi imunoexpressa em 60% dos casos avaliados, e assim como o WT1, foi mais freqüentemente expressa no componente blastematoso (63% dos casos) e epitelial (58% dos casos). No componente

mesenquimal a imunopositividade do p53 ocorreu em 22% dos casos (Tabelas 7 e 8).

Em todas as amostras de rim normal avaliadas não houve imunoeexpressão do WT1 e p53.

**Tabela 7** - Frequência da imunoeexpressão de WT1 nos diferentes componentes do tumor de Wilms e em rim normal.

VARÁVEIS	CATEGORIAS	N	%
BLASTEMA	POSITIVO	78	97
	NEGATIVO	2	3
EPITÉLIO	POSITIVO	28	87
	NEGATIVO	4	13
MESÊNQUIMA	POSITIVO	4	13
	NEGATIVO	26	87
RIM NORMAL	POSITIVO	0	0
	NEGATIVO	45	100

**Tabela 8** - Frequência da imunoeexpressão de p53 nos diferentes componentes do tumor de Wilms e em rim normal.

VARÁVEIS	CATEGORIAS	N	%
BLASTEMA	POSITIVO	47	63
	NEGATIVO	28	37
EPITÉLIO	POSITIVO	33	58
	NEGATIVO	24	42
MESÊNQUIMA	POSITIVO	11	22
	NEGATIVO	39	88
RIM NORMAL	POSITIVO	0	0
	NEGATIVO	45	100

#### 4.1.8 Imunoexpressão de $\beta$ -Catenina, E-Caderina e APC

A imunoexpressão da  $\beta$ -catenina ocorreu na membrana em 85% dos casos, no citoplasma em 95% e no núcleo em 24%. Na Tabela 9 observa-se que na maioria dos casos a  $\beta$ -catenina apresentou imunopositividade simultânea em membrana e citoplasma. Nos casos em que houve positividade nuclear ocorreu também positividade citoplasmática concomitante. Em 3 casos não houve imunoexpressão da  $\beta$ -catenina em nenhum dos componentes celulares (Tabela 9) (Figura 8).

Na membrana a E-caderina foi imunoexpressa em 52% dos casos, em citoplasma em 48% e em núcleo 14%. A maioria dos pacientes apresentou positividade concomitante em membrana e citoplasma. Em 8 casos não houve imunoexpressão da E-caderina em nenhum dos componentes celulares (Tabela 10) (Figura 9).

Á nível de membrana citoplasmática o APC não foi imunoexpresso em nenhum caso. Em citoplasma a frequência de imunoexpressão foi em 10% dos casos e em núcleo houve imunoexpressão em quase todos os casos (95%). Em 90% destes pacientes a imunopositividade ocorreu exclusivamente em núcleo e em 10% núcleo e citoplasma (Tabela 11) (Figura 10).

**Tabela 9** - Imunoexpressão de  $\beta$ -Catenina nos diferentes componentes celular.

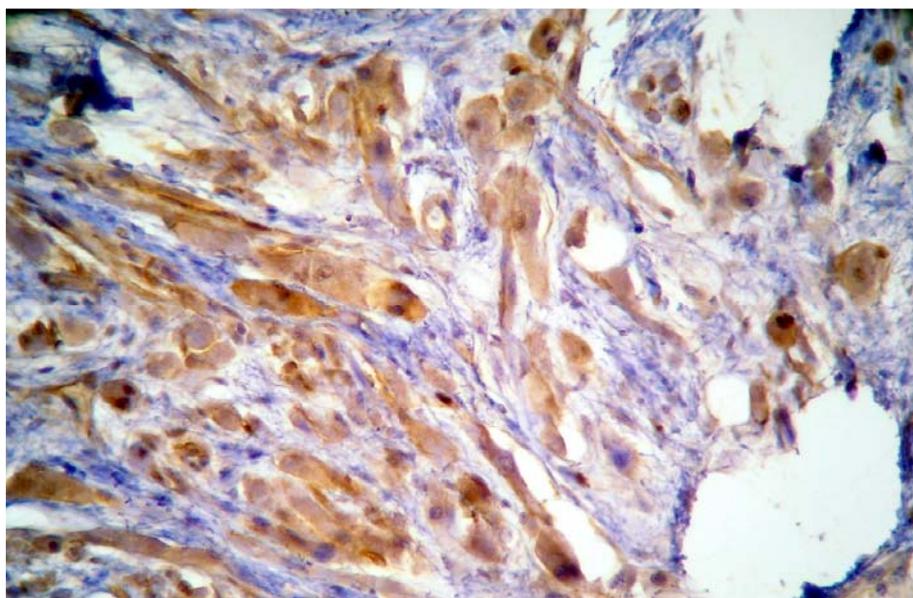
VARIÁVEIS	CATEGORIAS	N	%
MEMBRANA	POSITIVO	2	2
	NEGATIVO	90	98
CITOPLASMA	POSITIVO	7	8
	NEGATIVO	85	92
NÚCLEO	POSITIVO	0	0
	NEGATIVO	92	100
MEMBRANA+CITOPLASMA	POSITIVO	60	65
	NEGATIVO	32	35
MEMBRANA+NÚCLEO	POSITIVO	0	0
	NEGATIVO	92	100
CITOPLASMA+NÚCLEO	POSITIVO	4	4
	NEGATIVO	88	96
MEMBRANA+CITOPLASMA+NÚCLEO	POSITIVO	19	21
	NEGATIVO	73	79

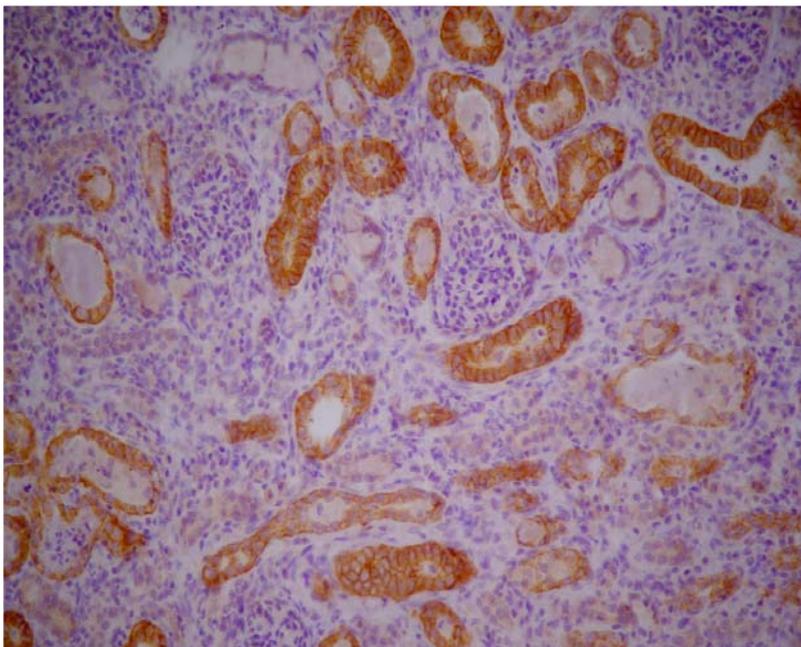
**Tabela 10** - Imunoexpressão de e-caderina nos diferentes componentes celular.

VARIÁVEIS	CATEGORIAS	N	%
MEMBRANA	POSITIVO	15	24
	NEGATIVO	47	76
CITOPLASMA	POSITIVO	12	19
	NEGATIVO	50	81
NÚCLEO	POSITIVO	4	6
	NEGATIVO	58	94
MEMBRANA+CITOPLASMA	POSITIVO	23	37
	NEGATIVO	39	63
MEMBRANA+NÚCLEO	POSITIVO	1	2
	NEGATIVO	61	98
CITOPLASMA+NÚCLEO	POSITIVO	1	2
	NEGATIVO	61	98
MEMBRANA+CITOPLASMA+NÚCLEO	POSITIVO	6	10
	NEGATIVO	56	90

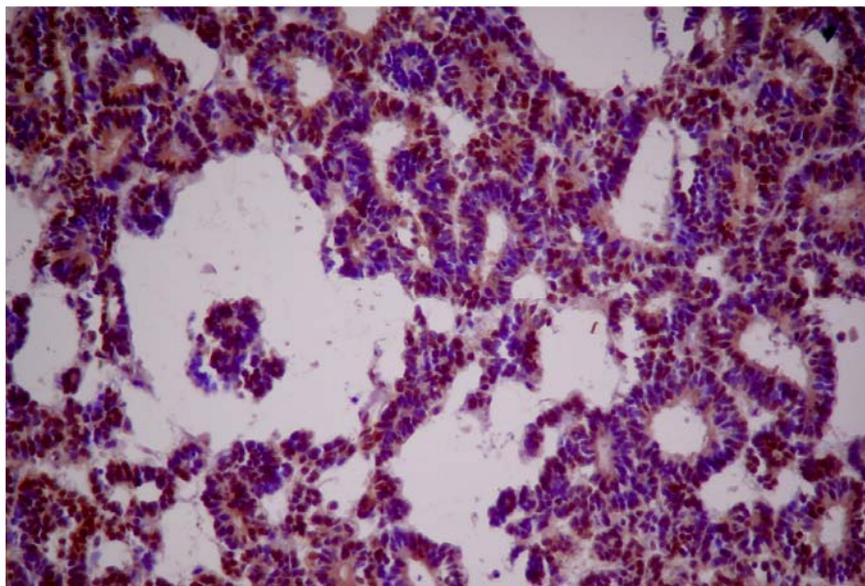
**Tabela 11** - Imunoexpressão de APC nos diferentes componentes celular.

VARIÁVEIS	CATEGORIAS	N	%
MEMBRANA	POSITIVO	0	0
	NEGATIVO	90	100
CITOPLASMA	POSITIVO	0	0
	NEGATIVO	90	100
NÚCLEO	POSITIVO	81	90
	NEGATIVO	9	10
MEMBRANA+CITOPLASMA	POSITIVO	0	0
	NEGATIVO	90	100
MEMBRANA+NÚCLEO	POSITIVO	0	0
	NEGATIVO	90	100
CITOPLASMA+NÚCLEO	POSITIVO	9	10
	NEGATIVO	81	90
MEMBRANA+CITOPLASMA+NÚCLEO	POSITIVO	0	0
	NEGATIVO	90	100

**Figura 8** - Imunoexpressão em citoplasma da  $\beta$ -catenina em componente mesenquimal com diferenciação rabdomioblástica



**Figura 9** - Imunoexpressão em citoplasma e membrana da E-caderina em componente epitelial.



**Figura 10** - Imunoexpressão nuclear do APC em componente epitelial.

#### **4.1.9 Imunoexpressão de $\beta$ -Catenina nos diferentes Componentes do Tumor de Wilms e no Rim Normal**

No componente blastematoso a imunoexpressão da  $\beta$ -catenina ocorreu na membrana em 79% dos casos, no citoplasma em 90% e no núcleo em 19%. A Tabela 12 mostra que em apenas 8 casos não houve imunopositividade de  $\beta$ -catenina em citoplasma no componente blastematoso. Dois desses tiveram imunoexpressão exclusiva em membrana e 6 não apresentaram imunoexpressão em nenhum componente celular. Sessenta e cinco por cento dos casos apresentavam imunoexpressão em citoplasma e membrana. Dos que apresentavam  $\beta$ -catenina imunoexpressa em núcleo, todos tinham imunoexpressão simultânea em citoplasma.

No componente epitelial a imunoexpressão da  $\beta$ -catenina no núcleo da célula foi menos freqüente que no componente blastematoso, apenas 3 casos (5%). Desses 3 casos, dois apresentaram imunoexpressão nuclear da  $\beta$ -catenina também no componente blastematoso. Oitenta por cento dos componentes epiteliais estudados apresentavam imunoexpressão da  $\beta$ -catenina concomitante em citoplasma e núcleo (Tabela 12).

No componente mesênquimal apenas 19% dos tumores estudados tinham imunoexpressão da  $\beta$ -catenina em membrana citoplasmática. Sessenta e sete por cento dos casos apresentaram imunoexpressão no citoplasma e 27% a nível nuclear. Nove casos não tinham imunoexpressão da  $\beta$ -catenina em membrana, citoplasma ou núcleo; dos casos restantes 50% apresentou imunoexpressão exclusiva em citoplasma. Dos que tinham imunoexpressão em núcleo, três apresentavam positividade apenas no

núcleo, quatro em núcleo e citoplasma e 3 em núcleo, citoplasma e membrana (Tabela 12).

Em parênquima renal normal todos os casos avaliados apresentaram imunoposição da  $\beta$ -catenina em citoplasma, quarenta destes concomitante citoplasma e núcleo. Apenas dois não apresentavam a imunoposição em membrana e nenhum tinha em núcleo (Tabela 12).

**Tabela 12** - Imunoposição da  $\beta$ -catenina nos diferentes componentes da célula, do tumor e em tecido normal.

VARIÁVEIS	BLASTEMA	EPITÉLIO	MESENQUIMA	NORMAL
MEMBRANA	2	6	0	0
CITOPLASMA	5	2	14	2
NÚCLEO	0	1	3	0
MEMBRANA+CITOPLASMA	54	44	4	40
MEMBRANA+NÚCLEO	0	0	0	0
CITOPLASMA+NÚCLEO	6	2	4	0
MEMBRANA+CITOPLASMA+NÚCLEO	10	0	3	0
TOTAL	77	55	28	42

#### **4.1.10 Imunoexpressão de E-Caderina nos diferentes Componentes do Tumor de Wilms e no Rim Normal**

No blastema a imunoexpressão da E-caderina ocorreu na membrana em apenas 13% dos casos estudados. No citoplasma essa frequência foi 39% e no núcleo 11% dos casos. Quarenta e nove por cento dos casos não apresentaram imunoexpressão da E-caderina no componente blastematoso em nenhum dos componentes celulares. Entre os casos que apresentaram imunopositividade, cinquenta e três por cento tinham imunoexpressão exclusiva no citoplasma da célula (Tabela 13)

No componente epitelial a E-caderina foi imunoexpressa na membrana em 69% dos casos avaliados, no citoplasma em 42% e no núcleo em 5%. Dez casos (17%) não apresentaram imunopositividade da E-caderina na membrana, citoplasma ou núcleo. Nos demais tumores, a imunopositividade da E-caderina no epitélio foi mais frequentemente encontrada em citoplasma, seguida por citoplasma e membrana simultaneamente (Tabela 13).

Dos 56 casos avaliados no componente mesenquimal, quarenta e oito (86%) não apresentaram imunopositividade para e-caderina em nenhum dos componentes celulares. Apenas em 8 casos tinham imunoexpressão desse marcador, seis deles exclusivamente em citoplasma e 2 em citoplasma e núcleo.

No parênquima renal normal a E-caderina apresentou imunoexpressão simultânea em membrana citoplasma em 97% dos casos e nenhum deles teve imunoexpressão em núcleo.

**Tabela 13** - Imunoexpressão da e-caderina nos diferentes componentes da célula, do tumor e em tecido normal.

VARIÁVEIS	BLASTEMA	EPITÁLIO	MESENQUIMA	NORMAL
MEMBRANA	4	23	0	0
CITOPLASMA	19	6	6	0
NÚCLEO	5	1	0	1
MEMBRANA+CITOPLASMA	5	17	0	29
MEMBRANA+NÚCLEO	0	0	0	0
CITOPLASMA+NÚCLEO	3	1	2	0
MEMBRANA+CITOPLASMA+NÚCLEO	0	1	0	0
TOTAL	36	49	8	30

#### 4.1.11 Imunoexpressão de APC nos diferentes Componentes do Tumor de Wilms e no Rim Normal

O APC no blastema apresentou imunopositividade nuclear em 86% dos casos, citoplasmática em apenas 4% e nenhum tumor apresentou imunopositividade do APC em membrana neste componente tumoral. A grande maioria (96%) dos tumores avaliados apresentava exclusivamente nuclear (Tabela 14).

No componente epitelial também não foi detectado imunopositividade do APC a nível de membrana citoplasmática. No citoplasma apenas 4 casos (7%) apresentavam imunopositividade do APC, enquanto que no núcleo 90% dos casos teve imunoexpressão deste marcador. Seis casos não tiveram imunoexpressão do APC no epitélio em nenhum dos componentes celulares.

Assim como no blastema e no epitélio, também não houve expressão de APC na membrana no componente mesenquimal. No citoplasma a frequência de imunexpressão do APC foi 7% e no núcleo 62%.

No parênquima normal analisado houve imunexpressão do APC em citoplasma em todos os casos. Em membrana todos foram negativos e no núcleo 4 casos foram imunexpressos.

**Tabela 14** - Imunexpressão de APC nos diferentes componentes da célula, do tumor e em tecido normal.

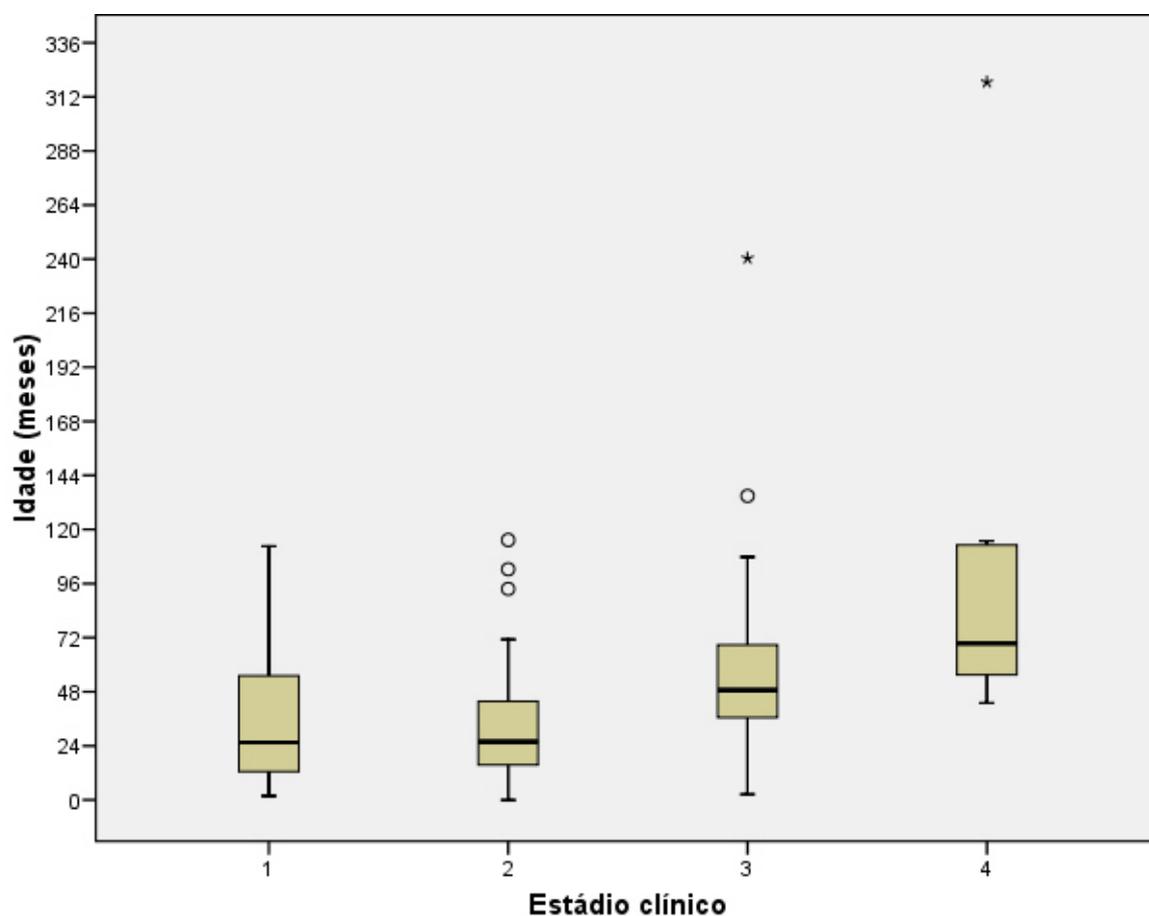
VARIÁVEIS	BLASTEMA	EPITÉLIO	MESENQUIMA	NORMAL
MEMBRANA	0	0	0	0
CITOPLASMA	0	0	1	41
NÚCLEO	65	50	33	0
MEMBRANA+CITOPLASMA	0	0	0	0
MEMBRANA+NÚCLEO	0	0	0	0
CITOPLASMA+NÚCLEO	3	4	3	4
MEMBRANA+CITOPLASMA+NÚCLEO	0	0	0	0
TOTAL	68	54	37	45

A imunexpressão dos marcadores estudados em cada componente celular de todos os paciente pode ser visto no Anexo 3.

## 4.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS

### 4.2.1 Associação entre Idade e Estádio

Foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a idade dos pacientes e o estágio clínico, sendo que pacientes com menor média de idade apresentaram estágios precoces (Figura 11).



**Figura 11** - Correlação entre as médias da idade em meses dos pacientes com estágio clínico.

#### 4.2.2 Associação entre Estádio e Recaída

Dos 32 pacientes com estágio I, dois (6%) apresentaram recaída, dos 25 com estágio II quatro (12%) recaíram, dos vinte e sete com estágio III sete (28%) recaíram, dos 12 com estágio IV, seis (38%) recaíram (Tabela 15).

**Tabela 15** - Associação entre estágio e recaída.

ESTADIO	RECAÍDA		Total
	NÃO	SIM	
I/II	51	6	57
I II/IV	26	13	39
<b>Total</b>	<b>77</b>	<b>19</b>	<b>96</b>

p<0,001

#### 4.2.3 Associação entre Recaída e Óbito

Dos 19 pacientes que recaíram 14 (72%) morreram e cinco (38%) estão vivos (Tabela 16).

**Tabela 16** - Associação entre a frequência de recaídas e óbitos.

RECAÍDA	ÓBITO		Total
	NÃO	SIM	
<b>NÃO</b>	72	05	77
<b>SIM</b>	05	14	19
<b>Total</b>	<b>77</b>	<b>19</b>	<b>96</b>

p<0,001

#### 4.2.4 Associação do Tipo Histológico e realização de Quimioterapia Pré-Operatória

Dos cinquenta e um tumores onde foi encontrado predomínio do componente blastematoso, quarenta e quatro (86%), não foram submetidos à quimioterapia pré-operatória. A Tabela 17 mostra que os pacientes submetidos à quimioterapia pré-operatória tiveram significativamente menos predomínio do componente blastematoso que aqueles que não foram submetidos à quimioterapia pré-operatória.

**Tabela 17** - Associação entre tipo histológico e realização de quimioterapia pré-operatória..

HISTOLOGIA	QTPRÉ-OPERATÓRIA		TOTAL
	NÃO	SIM	
Predomínio blastematoso	44	7	51
Outros tipos	31	14	45
Total	75	21	96

p=0,040

#### 4.2.5 Associação entre a Imunoexpressão de WT1 e p53

Houve correlação estatisticamente significativa entre a imunoexpressão de WT1 e p53. Sessenta e sete por cento dos tumores que apresentavam positividade para a proteína do WT1 tinham expressão de p53. Entre os que não apresentavam imunoexpressão do WT1, apenas 12% teve expressão da proteína p53 (Tabela 18).

**Tabela 18** - Correlação entre a imunoposição da proteína p53 e WT1.

P53	WT1		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	55	1	56
Negativo	28	7	35
Total	83	8	91

p=0,003

Dos 72 casos em que foram avaliados o p53 e WT1 no componente blastematoso, em apenas 2 não havia imunoposição do WT1 e esses 2 também não apresentavam imunoposição do p53.

Na análise da correlação entre a expressão do p53 e WT1 no componente epitelial, apenas 3 casos tinham o WT1 negativo e esses 3 também não apresentavam imunopositividade para proteína p53.

No componente mesenquimal, dos 3 pacientes que tinham positividade para o p53, dois tinham ausência de expressão do WT1.

#### **4.2.6 Associação entre a Imunoposição de WT1 e p53 com as variáveis Clínicas**

Quando foi feita a associação entre a imunoposição do WT1 e do p53 com idade, estágio ao diagnóstico, utilização de quimioterapia pré-operatória e recaída, a única variável associada com a imunopositividade do WT1 foi estágio. Os pacientes com estágio precoce tiveram significativamente maior frequência de imunoposição de WT1. Não houve

associação entre as variáveis estudadas e imunopositividade da proteína p53 (Tabela 19).

**Tabela 19** - Associação entre a imunopressão de WT1 e p53 e as diferentes variáveis clínicas.

VARIÁVEIS	Categorias	WT1		p	P53		P
		Positivo	Negativo		Positivo	Negativo	
Idade	≤3 anos	48	5	0,667	29	22	0,334
	> 3 anos	36	5		28	14	
Estádio	I/II	54	3	<b>0,036</b>	38	18	0,110
	III/IV	30	7		19	18	
QT-PRÉ	Não	68	6	0,126	47	27	0,385
	Sim	16	4		10	9	
Recaída	Não	71	7	0,248	47	28	0,578
	Sim	13	3		10	8	

#### 4.2.7 Associação da Positividade da $\beta$ -Catenina, E-Caderina e APC com Idade, Estádio, Quimioterapia Pré-Operatória e Recaída

As Tabelas 20, 21 e 22 mostram que não houve associação entre a imunopressão de  $\beta$ -catenina, E-caderina e APC, respectivamente, com as variáveis clínicas estudadas, assim como a realização ou não de quimioterapia pré-operatória.

**Tabela 20** - Associação da positividade da  $\beta$ -catenina com idade, estádio, quimioterapia pré-operatória e recaída.

VARÁVEIS	Categorias	Nº	$\beta$ -catenina membrana	p	$\beta$ -catenina citoplasma	p	$\beta$ -catenina núcleo	P
Idade	≤ 3 anos	53	47	0,291	49	0,263	14	0,573
	> 3 anos	42	34		41		09	
Estádio	I /II	57	51	0,156	54	0,686	14	0,922
	III/IV	38	30		36		09	
Qt-pré	sim	21	19	0,445	21	0,278	05	0,961
	Não	74	62		69		18	
Recaída	sim	17	14	0,709	15	0,217	03	0,755
	Não	78	67		75		20	

**Tabela 21** - Associação da positividade da e-caderina com idade, estádio, quimioterapia pré-operatória e recaída.

VARÁVEIS	Categorias	Nº	E-caderina membrana	p	E-caderina citoplasma	p	E-caderina núcleo	p
Idade	≤ 3 anos	46	22	0,441	20	0,343	06	0,830
	> 3 anos	41	23		21		06	
Estádio	I /II	51	26	0,860	23	0,480	07	0,983
	III/IV	36	19		19		05	
Qt-pré	sim	18	09	0,869	10	0,488	03	0,472
	Não	69	36		32		09	
Recaída	sim	15	06	0,318	07	0,891	01	0,342
	Não	72	39		35		11	

**Tabela 22** - Associação da positividade da APC com idade, estágio, quimioterapia pré-operatória e recaída.

<b>VARÁVEIS</b>	<b>Categorias</b>	<b>Nº</b>	<b>APC citoplasma</b>	<b>p</b>	<b>APC Núcleo</b>	<b>p</b>
<b>Idade</b>	<b>≤ 3 anos</b>	52	05	0,620	02	0,410
	<b>&gt; 3 anos</b>	43	04		03	
<b>Estádio</b>	<b>I /II</b>	56	05	0,548	55	0,089
	<b>III/IV</b>	39	04		35	
<b>Qt-pré</b>	<b>sim</b>	21	03	0,315	21	0,278
	<b>Não</b>	74	06		69	
<b>Recaída</b>	<b>sim</b>	18	01	0,460	16	0,239
	<b>Não</b>	77	08		74	

Teste de associação pelo quiquadrado e fisher

#### **4.2.8 Associação da Positividade de WT1 e p53 com Imunoexpressão de $\beta$ -Catenina, e-Caderina e APC**

Houve associação estatisticamente significativa entre a imunoexpressão do APC em citoplasma e núcleo com a imunoexpressão do WT1(Tabela 23). A imunopositividade da proteína p53 foi significativamente associada com a imunoexpressão nuclear da  $\beta$ -catenina, E-caderina e APC (Tabela 24).

**Tabela 23** - Associação da positividade de WT1 com imunexpressão de  $\beta$ -catenina, e-caderina e APC nos diferentes componentes celulares.

VARIÁVEIS	CATEGORIAS	N	Wt1+	%	p
<b><math>\beta</math>-catenina membrana</b>	POSITIVO	80	72	90	0,561
	NEGATIVO	13	11	85	
<b><math>\beta</math>-catenina citoplasma</b>	POSITIVO	89	79	89	0,478
	NEGATIVO	4	4	100	
<b><math>\beta</math>-catenina núcleo</b>	POSITIVO	22	20	91	0,564
	NEGATIVO	71	63	89	
<b>E-caderina membrana</b>	POSITIVO	45	39	87	0,291
	NEGATIVO	41	38	93	
<b>E-caderina citoplasma</b>	POSITIVO	42	38	90	0,530
	NEGATIVO	44	39	89	
<b>E-caderina núcleo</b>	POSITIVO	12	11	92	0,634
	NEGATIVO	74	66	89	
<b>APC citoplasma</b>	POSITIVO	9	6	67	<b>0,040</b>
	NEGATIVO	84	78	93	
<b>APC núcleo</b>	POSITIVO	89	82	92	<b>0,045</b>
	NEGATIVO	4	02	50	

Teste de associação pelo quiquadrado e fisher

**Tabela 24** - Associação da positividade p53 com imunoposição de  $\beta$ -catenina, e-caderina e APC nos diferentes componentes celulares.

VARIÁVEIS	CATEGORIAS	N	p531+	%	p
$\beta$ -catenina membrana	POSITIVO	78	49	63	0,687
	NEGATIVO	14	8	57	
$\beta$ -catenina citoplasma	POSITIVO	87	54	62	0,634
	NEGATIVO	5	3	60	
$\beta$ -catenina núcleo	POSITIVO	21	18	86	<b>0,009</b>
	NEGATIVO	71	39	55	
E-caderina membrana	POSITIVO	44	27	61	0,971
	NEGATIVO	41	25	61	
E-caderina citoplasma	POSITIVO	41	25	61	0,971
	NEGATIVO	44	27	61	
E-caderina núcleo	POSITIVO	12	11	92	<b>0,017</b>
	NEGATIVO	73	41	56	
APC citoplasma	POSITIVO	9	4	44	0,230
	NEGATIVO	84	53	63	
APC núcleo	POSITIVO	88	57	65	<b>0,007</b>
	NEGATIVO	5	5	100	

Teste de associação pelo quiquadrado e fisher

#### 4.2.9 Associação da Positividade de Imunoposição de $\beta$ -Catenina, E-Caderina e APC nos diferentes Componentes Celulares

A imunoposição da  $\beta$ -catenina em membrana celular apresentou associação estatisticamente significativa com a imunoposição da E-caderina em membrana e citoplasma e APC no núcleo (Tabela 25).  $\beta$ -catenina em citoplasma teve associação estatisticamente significativa apenas com a imunoposição de APC nuclear (Tabela 26). Enquanto que  $\beta$ -catenina no núcleo não apresentou associação estatisticamente

significativa com a E-caderina e APC em nenhum componente celular (Tabela 27).

Com relação a associação entre a imunexpressão de E-caderina e APC, observou-se que esta associação apresentou  $p < 0,05$  apenas entre a imunexpressão do APC em citoplasma com a E-caderina em núcleo (Tabelas 28, 29 e 30).

**Tabela 25** - Associação da positividade de  $\beta$ -catenina em membrana com imunexpressão de e-caderina e APC nos diferentes componentes celulares.

VARIÁVEIS	CATEGORIAS	Nº	$\beta$ -CATENINA		P
			MEMBRANA	%	
<b>E-caderina membrana</b>	POSITIVO	44	43	97	<b>0,001</b>
	NEGATIVO	42	30	71	
<b>E-caderina citoplasma</b>	POSITIVO	42	41	98	<b>0,002</b>
	NEGATIVO	44	32	73	
<b>E-caderina núcleo</b>	POSITIVO	12	9	75	0,260
	NEGATIVO	74	64	87	
<b>APC citoplasma</b>	POSITIVO	9	7	78	0,618
	NEGATIVO	85	73	86	
<b>APC núcleo</b>	POSITIVO	89	78	88	<b>0,004</b>
	NEGATIVO	5	2	40	

Teste de associação pelo quiquadrado e fisher

**Tabela 26** - Associação da positividade de  $\beta$ -catenina em citoplasma com imunexpressão de e-caderina e APC nos diferentes componentes celulares.

VARIÁVEIS	CATEGORIAS	Nº	$\beta$ -CATENINA		p
			CITOPLASMA	%	
<b>E-caderina membrana</b>	POSITIVO	44	43	98	0,291
	NEGATIVO	42	39	93	
<b>E-caderina citoplasma</b>	POSITIVO	42	42	100	0,064
	NEGATIVO	44	40	91	
<b>E-caderina núcleo</b>	POSITIVO	12	12	100	0,542
	NEGATIVO	74	70	95	
<b>APC citoplasma</b>	POSITIVO	9	9	100	0,598
	NEGATIVO	85	80	94	
<b>APC núcleo</b>	POSITIVO	89	86	97	<b>0,021</b>
	NEGATIVO	5	3	60	

Teste de associação pelo quiquadrado e fisher

**Tabela 27** - Associação da positividade de  $\beta$ -catenina em núcleo com imunoposição de e-caderina e APC nos diferentes componentes celulares.

VARIÁVEIS	CATEGORIAS	Nº	$\beta$ -CATENINA		P
			NÚCLEO	%	
<b>E-caderina membrana</b>	POSITIVO	44	8	16	0,263
	NEGATIVO	42	11	26	
<b>E-caderina citoplasma</b>	POSITIVO	42	8	19	0,506
	NEGATIVO	44	11	25	
<b>E-caderina núcleo</b>	POSITIVO	12	4	33	0,312
	NEGATIVO	74	15	20	
<b>APC citoplasma</b>	POSITIVO	9	0	0	0,080
	NEGATIVO	85	22	26	
<b>APC núcleo</b>	POSITIVO	89	22	25	0,255
	NEGATIVO	5	0	0	

Teste de associação pelo qui-quadrado e fisher

**Tabela 28** - Associação da positividade de e-caderina membrana com imunoposição de APC nos diferentes componentes celulares.

VARIÁVEIS	CATEGORIAS	Nº	E-CADERINA		P
			MEMBRANA	%	
<b>APC CITOPLASMA</b>	POSITIVO	9	5	55	0,715
	NEGATIVO	85	40	47	
<b>APC NÚCLEO</b>	POSITIVO	89	44	49	0,349
	NEGATIVO	5	1	20	

Teste de associação pelo qui-quadrado e fisher

**Tabela 29** - Associação da positividade de e-caderina citoplasma com imunoposição de APC nos diferentes componentes celulares.

VARIÁVEIS	CATEGORIAS	Nº	E-CADERINA		P
			CITOPLASMA	%	
APC CITOPLASMA	POSITIVO	9	4	44	0,918
	NEGATIVO	85	38	45	
APC NÚCLEO	POSITIVO	89	41	46	0,617
	NEGATIVO	5	1	20	

Teste de associação pelo quiquadrado e fisher

**Tabela 30** - Associação da positividade de e-caderina em núcleo com imunoposição de APC nos diferentes componentes celulares.

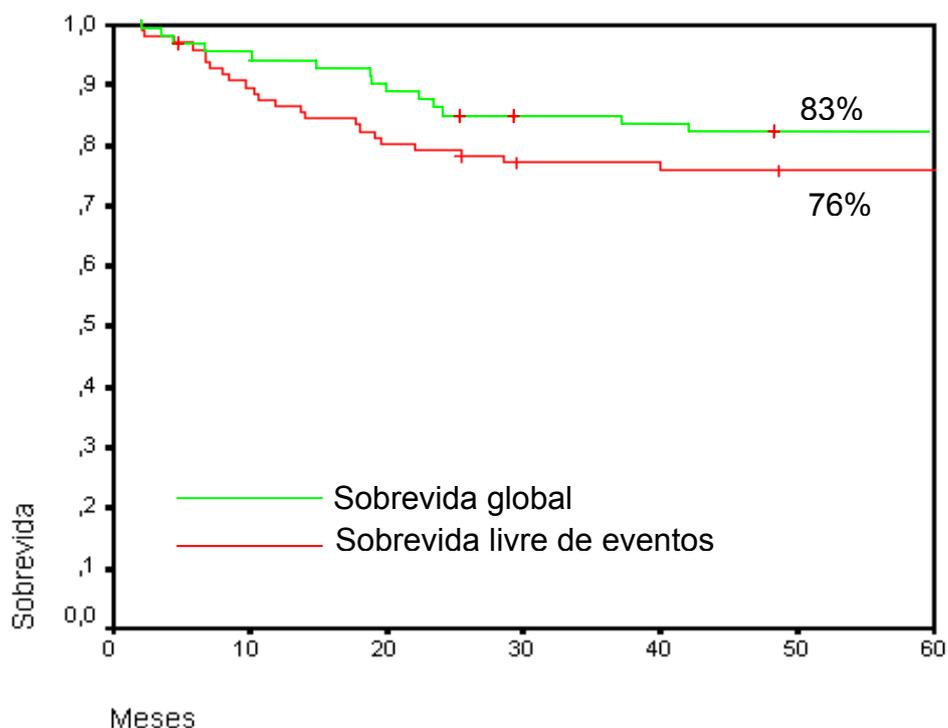
VARIÁVEIS	CATEGORIAS	Nº	E-CADERINA		P
			NÚCLEO	%	
APC CITOPLASMA	POSITIVO	9	3	33	<b>0,041</b>
	NEGATIVO	85	9	11	
APC NÚCLEO	POSITIVO	89	12	13	0,546
	NEGATIVO	5	0	0	

Teste de associação pelo quiquadrado e fisher

## 4.3 SOBREVIDA

### 4.3.1 Sobrevida Global e Livre de Eventos

A Sobrevida global em 60 meses foi 83% e a sobrevida livre de eventos 76% (Figura 12).



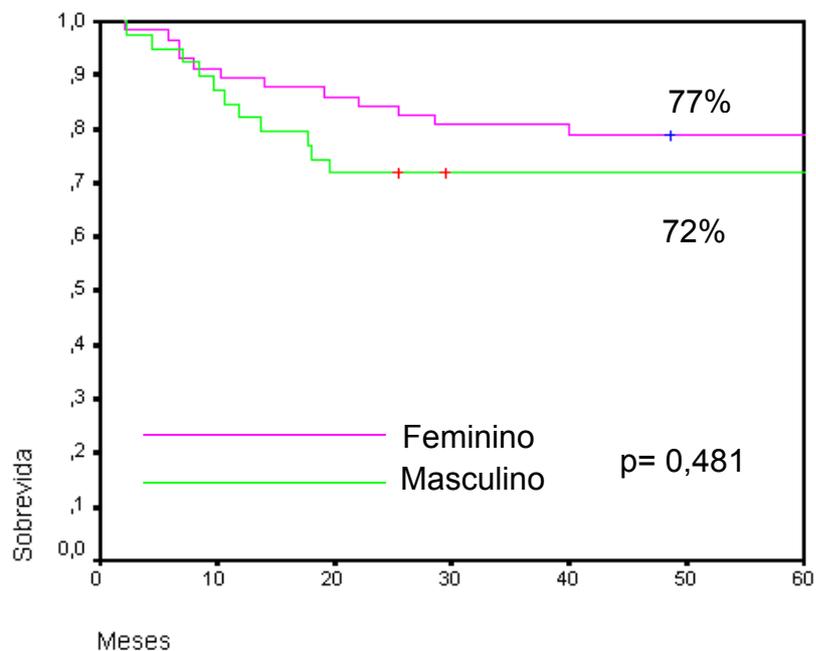
**Figura 12** - Sobrevida global sobrevida livre de eventos.

### 4.3.2 Sobrevida Livre de Eventos de acordo com Sexo, Idade e Estádio

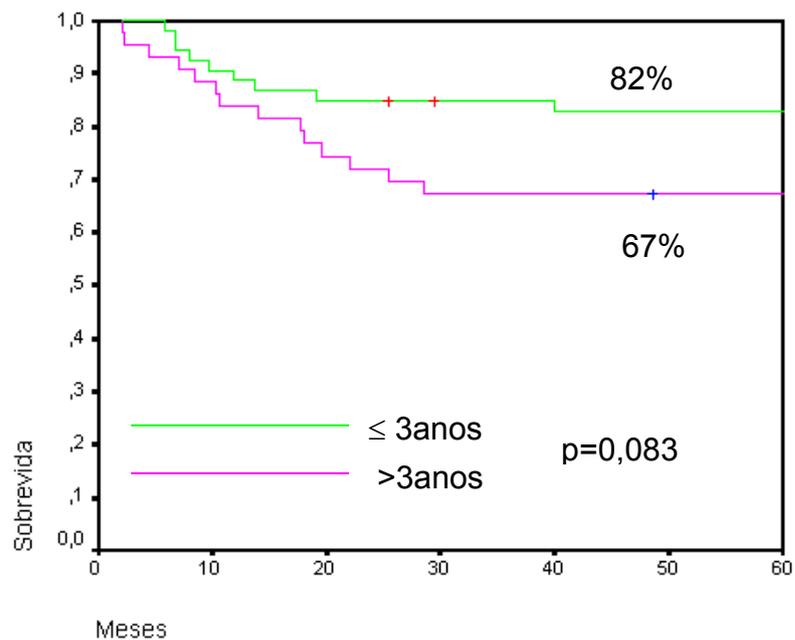
Não foi encontrada diferença entre a sobrevida livre de eventos de pacientes do sexo masculino e feminino (Figura 13)

Os pacientes que tinham idade igual ou inferior a 3 anos tiveram sobrevida livre de eventos superior aos que tinham mais de 3 anos, entretanto essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 14).

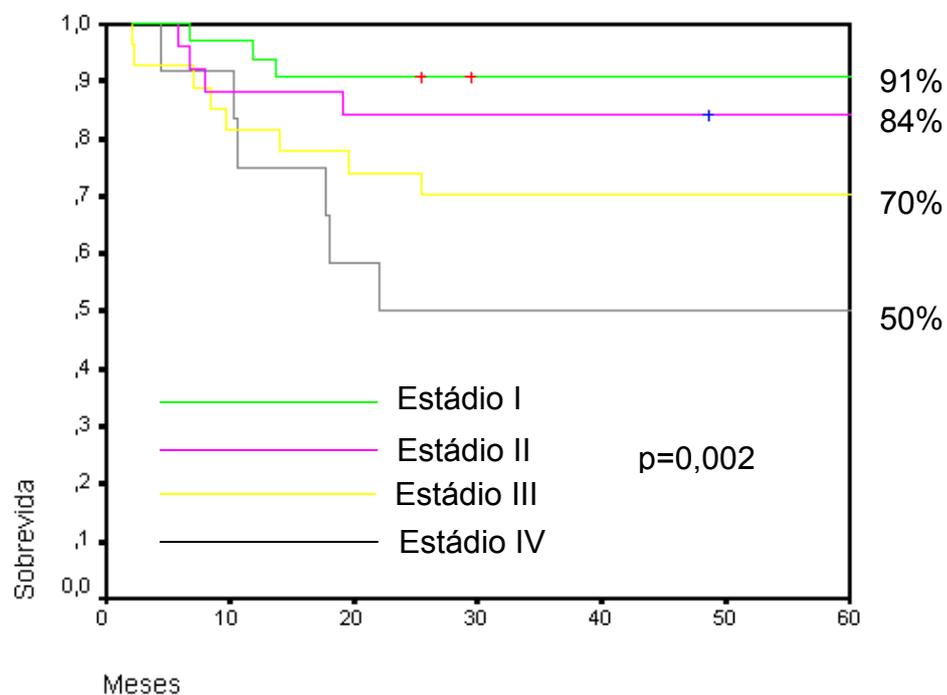
Quanto mais avançado o estágio clínico mais baixa foi a curva de sobrevida livre de eventos (Figura 15).



**Figura 13** - Sobrevida livre de eventos de acordo com sexo.



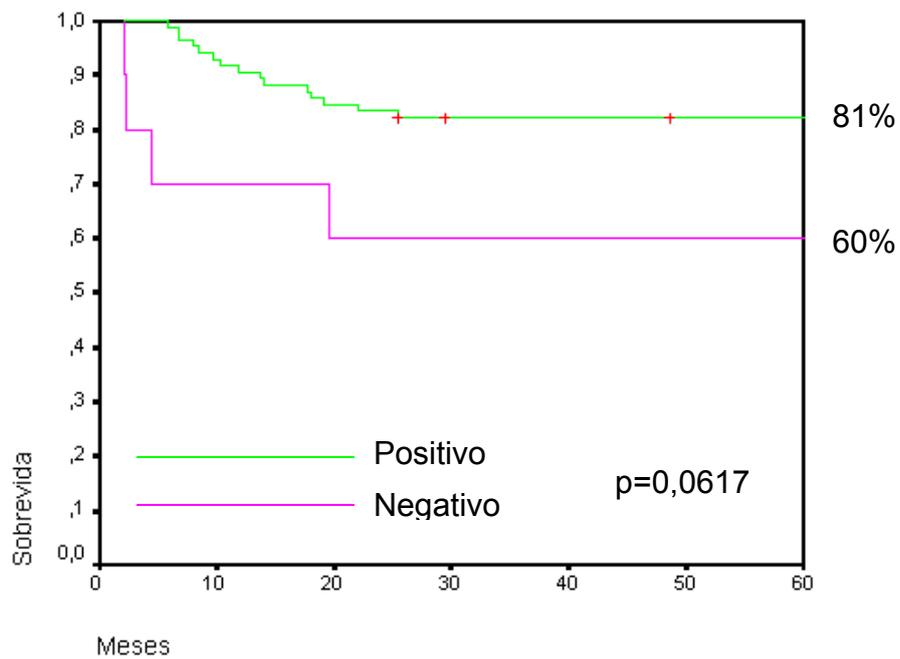
**Figura 14** - Sobrevida livre de eventos de acordo com idade.



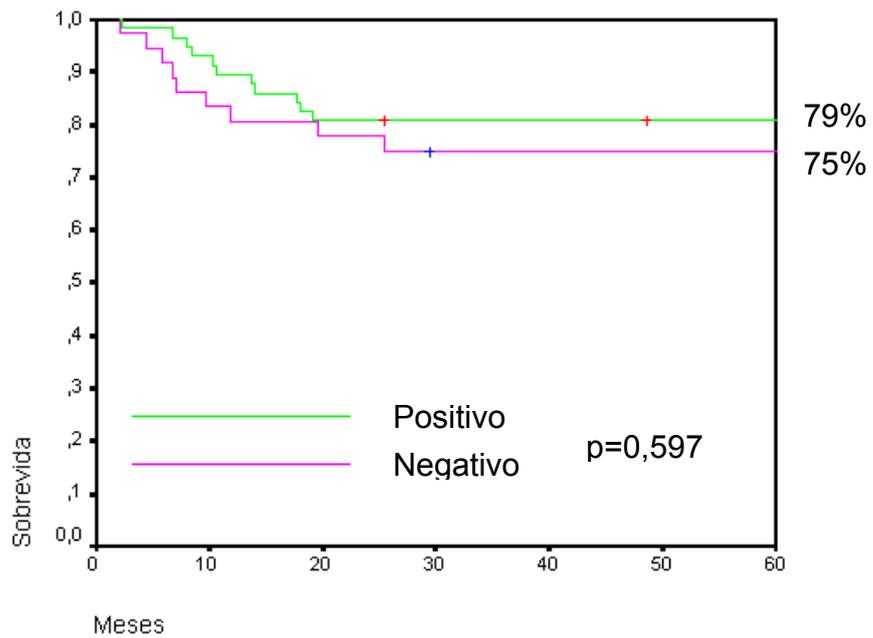
**Figura 15** - Sobrevida livre de eventos de acordo estágio.

#### 4.3.3 Sobrevida Livre de Eventos de acordo com Expressão de WT1, p53, $\beta$ -Catenina, E-Caderina e APC

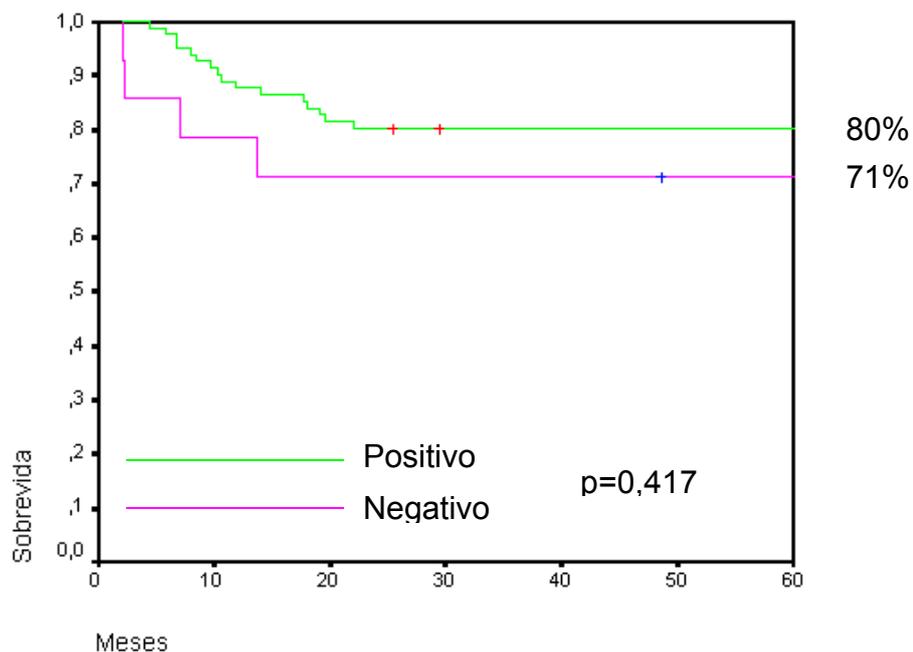
Não foi encontrado diferença estatisticamente significativa da sobrevida livre de eventos entre pacientes com ou sem expressão dos marcadores analisados como pode ser visto nas Figuras de 16 a 25.



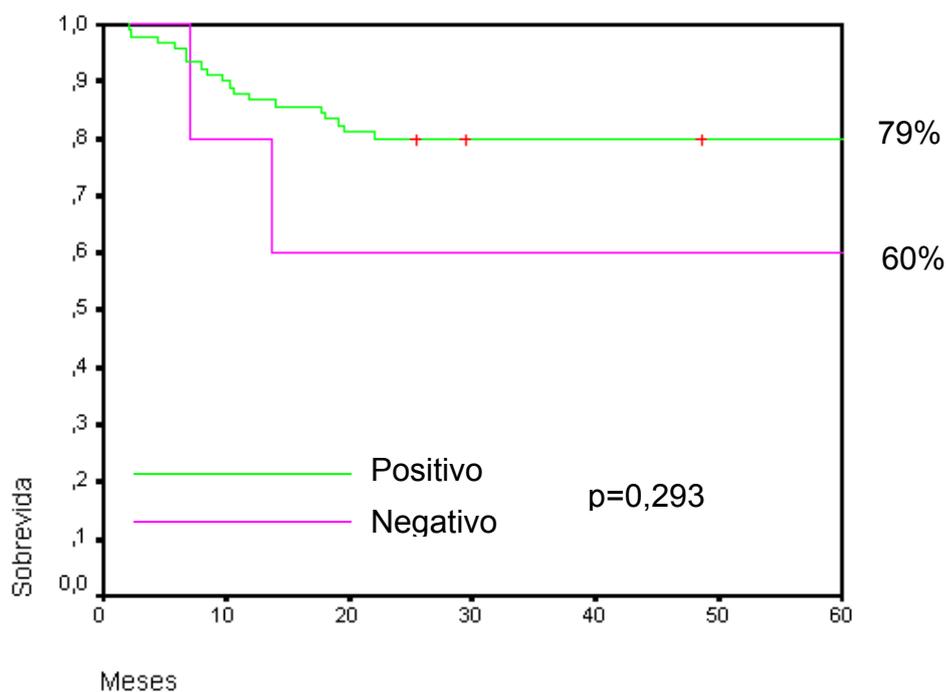
**Figura 16** - Sobrevida livre de eventos de acordo com a imunoposição de WT1.



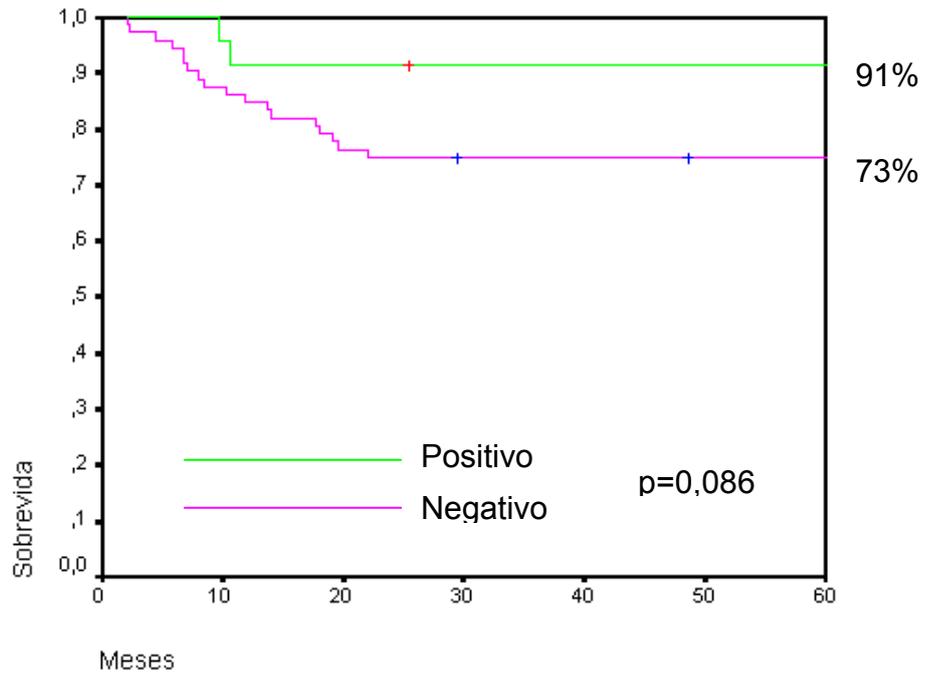
**Figura 17** - Sobrevida livre de eventos de acordo com a imunoposição de p53.



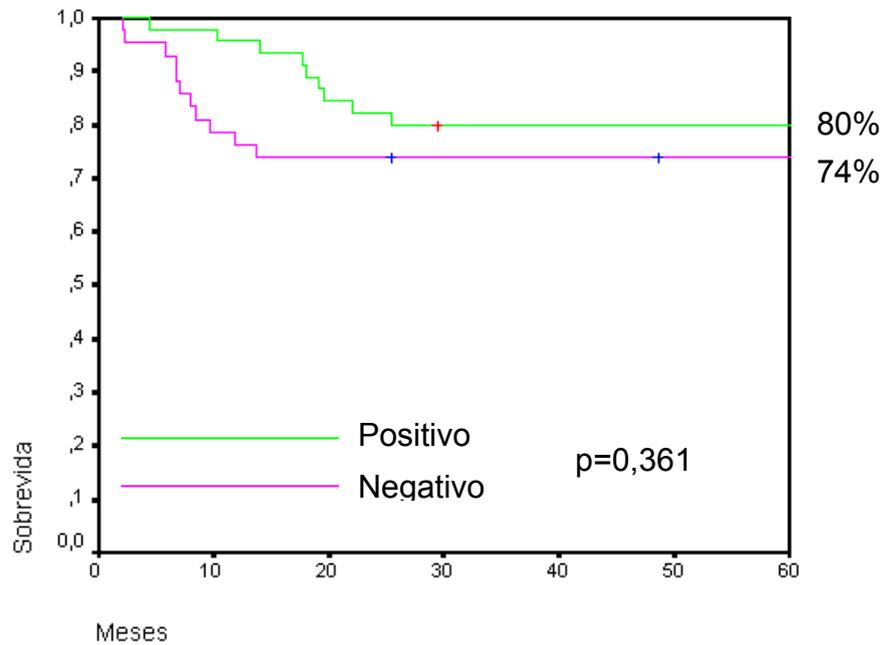
**Figura 18** - Sobrevida livre de eventos de acordo com a imunopressão de  $\beta$ -catenina em membrana.



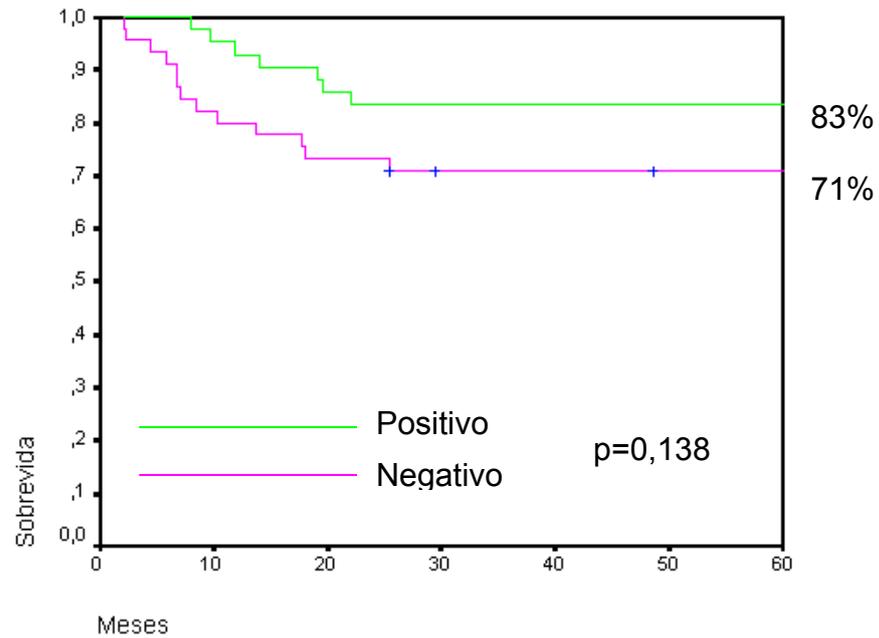
**Figura 19** - Sobrevida livre de eventos de acordo com a imunopressão de  $\beta$ -catenina em citoplasma



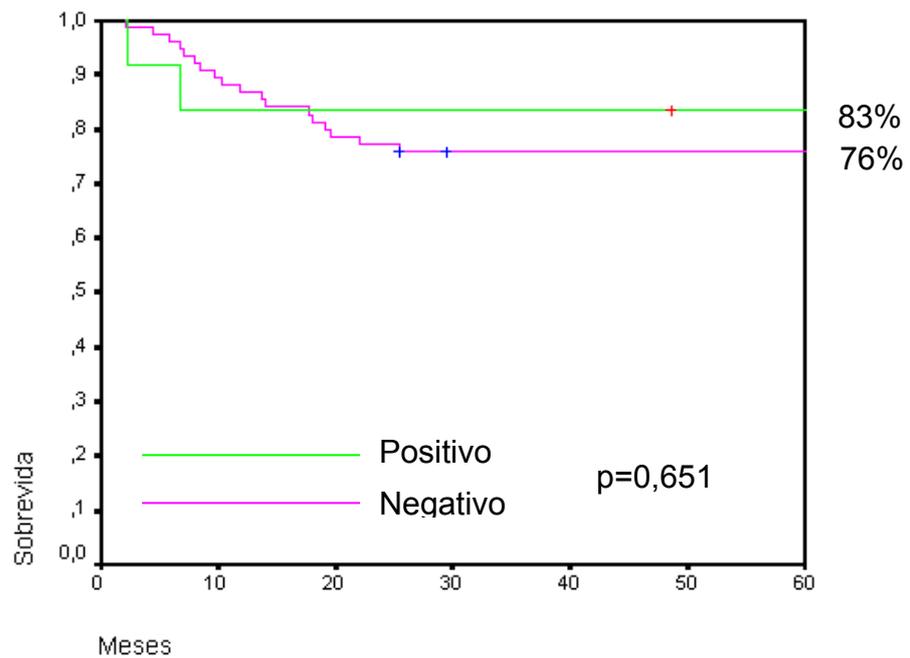
**Figura 20** - Sobrevida livre de eventos de acordo com a imunopressão de  $\beta$ -catenina em núcleo



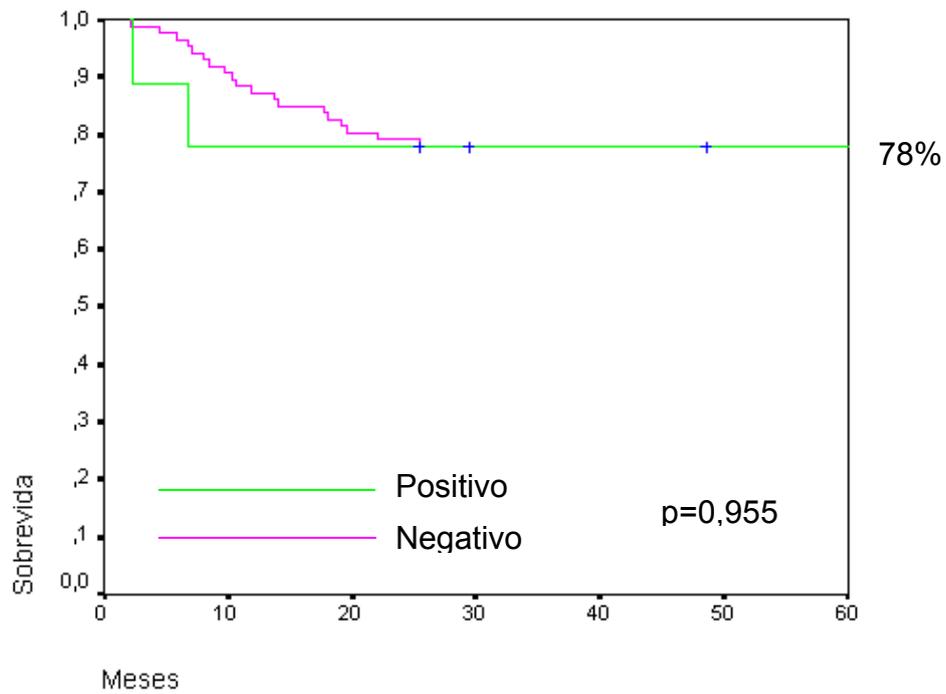
**Figura 21** - Sobrevida livre de eventos de acordo com a imunopressão de E-caderina em membrana.



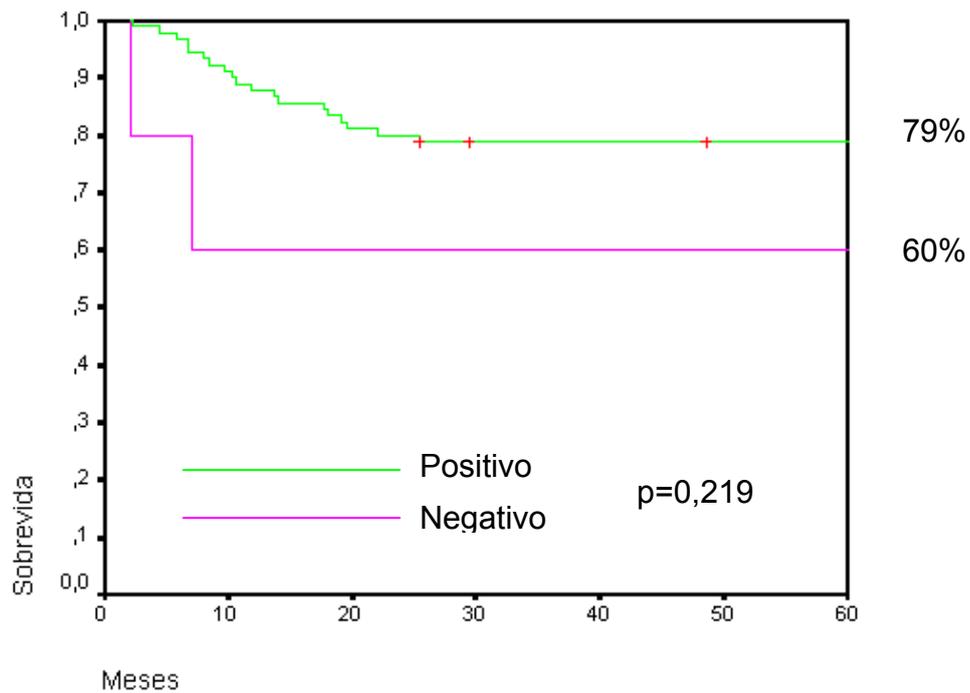
**Figura 22** - Sobrevida livre de eventos de acordo com a imunexpressão de E-caderina em citoplasma.



**Figura 23** - Sobrevida livre de eventos de acordo com a imunexpressão de E-caderina em núcleo.



**Figura 24** - Sobrevida livre de eventos de acordo com a imunopressão de APC em citoplasma



**Figura 25** - Sobrevida livre de eventos de acordo com a imunopressão de APC em núcleo

## 5 DISCUSSÃO

Altas taxas de curas são atualmente alcançadas em pacientes portadores de tumor de Wilms. O sucesso no tratamento desses pacientes se deve principalmente a abordagem multidisciplinar, por meio do trabalho conjugado do oncologista pediatra, cirurgião, patologista e radioterapeuta, no sentido de determinar, da forma mais precisa possível, a extensão da doença e instituir as diferentes abordagens terapêuticas para cada caso. A estratificação dos grupos de riscos tem sido definida pelos dois mais importantes grupos de estudos dessa doença, o NWTS e *International Society of Pediatric Oncology* (SIOP). A identificação de fatores clínicos, histológicos e moleculares, que são capazes de alterar o prognóstico desses pacientes, têm sido descrita por estes grupos cooperativos, e têm sido usada para reduzir com segurança a terapia e suas complicações em pacientes que tenham fatores considerados de bom prognóstico, assim como para intensificar a terapia nos que têm fatores de prognóstico desfavorável. A combinação das altas taxas de curas e com os baixos índices de recaídas alcançados para os pacientes com tumor de Wilms, tornar mais difícil a identificação de novos fatores de prognóstico por meio de estudos estatísticos.

Este estudo consta de uma casuística de pacientes com tumor de Wilms admitidos no Departamento de Pediatria do Hospital A.C. Camargo no período de 1978 a 1999 e que preenchiam os critérios de inclusão no

estudo. Entretanto salientamos que esta amostra representa o número total de pacientes com tumor de Wilms que foram admitidos no período citado acima, uma vez que, como mostrado na Tabela 21, a população deste estudo tem características clínicas e evolução semelhante ao do número total de pacientes.

A média e mediana da idade dos pacientes de 4 e 3 anos respectivamente, assim como o predomínio de pacientes do sexo feminino, visto na nossa casuística é semelhante ao que é encontrado na literatura (HUNG et al. 2004; REINHARD et al. 2004; BRESLOW et al. 2006; SUITA et al. 2006). Em um estudo brasileiro realizado por GRABOIS et al. (2005), a mediana de idade foi 49,11 meses e 58,3% dos pacientes eram do sexo feminino.

Em nossa casuística a média de idade dos pacientes foi significativamente maior entre os pacientes com estádios avançados, assim como foi encontrada sobrevida significativamente inferior para os pacientes com idade maior a três anos. É possível que este fato esteja relacionado ao diagnóstico tardio, já que os pacientes têm estágio e idade avançados.

FRANCO et al. (1991), em seu estudo, também encontraram maior frequência de doença avançada em pacientes mais velhos, sendo que a média de idade para pacientes com doença precoce foi 37,5 meses e para aqueles com doença avançada 56,3 meses.

Estudando pacientes com estágio I, PRITCHARD-JONES et al. (2003) encontraram mediana de idade igual a 1,91 anos, diferente da mediana encontrada para todos os outros estádios que foi de 3,2 anos. Cinquenta por

cento desses pacientes com estágio I tinham menos de dois anos de idade, vinte e seis por cento tinham de 2 a 4 anos e 23% mais que 4 anos. Assim como no nosso estudo, REINHARD et al. (2004) observaram que a idade também foi associada à sobrevida de pacientes com tumor de Wilms, sendo que a sobrevida livre de eventos foi 78,8% para pacientes com idade maior ou igual a 2 anos e 83,2% para os com menos de 2 anos de idade ( $p=0,005$ ).

Como acontece na maioria dos casos, a manifestação clínica mais freqüente entre os pacientes da nossa análise foi tumoração abdominal palpável no momento do diagnóstico (84% dos casos), trinta e dois por cento apresentavam dor e 16% hematuria, apenas em dois pacientes foi diagnosticado hipertensão arterial sistêmica. No estudo de SUITA et al. (2006) os sinais e sintomas mais freqüentes em pacientes com tumor de Wilms com histologia favorável no Japão foram tumoração abdominal em 63% dos casos, hematuria em 27% e dor abdominal em 13,5%. A baixa freqüência de hipertensão arterial encontrada em nossa casuística pode refletir que este sinal clínico foi subdiagnosticado, provavelmente por falta de investigação adequada. No estudo do GCBTT onde foram estudados 602 pacientes com tumor de Wilms tratados em vários estados brasileiros, sessenta e sete por cento apresentavam massa abdominal palpável, quarenta e oito por cento apresentavam dor e vinte e sete por cento tinham hematuria. Hipertensão arterial sistêmica não é citada neste estudo brasileiro como um sinal clínico encontrado na população de estudo (DE CAMARGO 1996).

Em nossa análise, a sobrevida global e livre de eventos foi respectivamente 83% e 76%, semelhante ao que é visto em outras séries. No estudo da SIOP e German Society of Oncology e Hematology (GPOH), publicado por REINHARD et al. (2004), a sobrevida global em 5 anos dos 440 pacientes analisados foi de 89,5%, a sobrevida livre de recaídas foi 87,7% e 63,5% para os pacientes com doença localizada e metastática, respectivamente. No estudo 4 do NWTs, avaliando pacientes com estágio de I a IV, tratados no período 1986 a 1994, a sobrevida livre de recaídas em 2 anos para os pacientes considerados de baixo risco foi 91% e para os de alto risco 90% (GREEN et al. 1998).

Com relação ao estágio, os pacientes com estágios I e II tiveram sobrevida livre de eventos em 5 anos significativamente superior aos pacientes com estágios avançados (III e IV) em nossa análise, sendo que essa sobrevida foi 91, 84, 70 e 50% para os pacientes com estágios I, II, III e IV, respectivamente. Esses achados são semelhantes ao descritos por SUITA et al. (2006), em que a sobrevida global foi 92, 100, 75 e 57% para os pacientes com estágios I, II, III e IV respectivamente. No estudo de GRABOIS et al. (2005), os pacientes com estágio IV tiveram sobrevida bem menor que os pacientes dos outros estágios, sendo que a sobrevida para pacientes com estágio I foi de 100%, para estágio II 94,2%, estágio III 83,2% e para aqueles com estágio IV foi 31,3%.

O tumor de Wilms é uma neoplasia embrionária, constituída classicamente por três componente histológicos: blastema, epitélio e mesênquima (estroma), os quais podem ser encontrados em diferentes

proporções em cada tumor. As células do blastema e epitélio apresentam alto grau de proliferação, enquanto que as do estroma são constituídas por componentes heterogêneos como osso, fibras musculares, cartilagem, não apresentando comportamento agressivo. Por este motivo existe a dúvida se o estroma constitui ou não uma neoplasia maligna.

De fato acredita-se que o predomínio de um ou outro componente histológico do tumor é capaz de determinar o comportamento da doença. Em seu estudo BECKWITH et al. (1996) descreveram que tumores que têm predomínio do componente epitelial apresentam um comportamento menos agressivo, ou seja, nestes casos a doença costuma ser localizada, entretanto pouco sensível ao tratamento quimioterápico. Ao contrário, tumores que apresentam predomínio de blastema estão associados com doença disseminada, maior agressividade tumoral, e também com melhor resposta a terapia.

ZHUANG et al. (1997) estudaram a perda de heterozigose e expressão do gene *WT1* nos diferentes componentes do tumor de Wilms esporádico. O resultado deste estudo mostrou que o estroma apresenta a mesma deleção do gene *WT1* que a encontrada no blastema e epitélio, sugerindo a possibilidade do componente estromal ser derivado de células tumorais do componente blastematoso.

Avaliando a relação entre a expressão do gene *WT1* e os componentes histológicos do tumor de Wilms, MIWA et al. (1992), mostraram que tumores com predomínio blastematoso tinham maior intensidade da expressão de *WT1* mRNA, enquanto que aqueles com

predomínio estromal tinham fraca ou indetectável expressão. Esses resultados, somando-se ao fato que *WT1* mRNA é fortemente expresso em rim fetal normal, sugerem que o *WT1* pode estar envolvido tanto no desenvolvimento do rim normal como na tumorigênese do nefroblastoma, principalmente na diferenciação do blastema.

No nosso estudo a imunoexpressão das proteínas foi feita por meio da construção de TMA. Essa técnica tem sido considerada extremamente eficiente para análise de biomarcadores em vários tecidos simultaneamente, garantindo também maior efetividade do custo e tempo, quando comparada a imunohistoquímica convencional. Muitas técnicas de patologia convencional e molecular podem ser realizadas usando um único *Tissue Array*, que é capaz de analisar morfologia, DNA, RNA e proteínas em múltiplas amostras teciduais (MOCH et al. 2001; KUMAR et al. 2004; ANDRADE et al. 2007).

HENDRIKS et al. (2003), analisando expressão de proteínas em tumor colorretal hereditário, usando imunohistoquímica pelo método convencional e TMA, encontraram concordância entre as duas técnicas, com a vantagem que na imunohistoquímica usando TMA, um número grande de tumores pôde ser avaliado simultaneamente. Apesar dessa técnica ser cada vez mais usada para avaliar marcadores envolvidos na tumorigênese e/ou prognóstico de tumores em adultos, ainda existem poucos estudos onde foram utilizada a técnica de TMA em tumores pediátricos. Analisando a superexpressão de c- KIT em tumores renais em crianças, incluindo 274 com tumor de Wilms, JONES et al. (2007) utilizaram a técnica de TMA. Outro recente estudo que usou esta tecnologia para estudar tumor de Wilms

foi realizada por VASEI et al. (2008), que construíram 5 blocos de TMA utilizando oito amostras (*spots*) de cada bloco de parafina originário de 45 casos de tumor de Wilms. Neste estudo os autores analisaram marcadores capazes de aumentar a precisão do diagnóstico através de biópsia por agulha do nefroblastoma. No nosso estudo utilizou-se agulha de 1mm e puncionou-se 4 *spots* de diferentes profundidades de cada amostra do bloco doador. FRIDMAN et al. (2006), utilizaram TMA para estudar a imunexpressão de cyclooxygenase-2 em tumor de Wilms usando 3 ou 4 *spots* de cada amostra a ser analisada.

Quanto a imunexpressão de WT1 e p53, nossos resultados mostraram que ambos foram mais freqüentemente expressos no componente blastema (WT1: 97% e p53: 63% dos casos) e epitélio (WT1: 87% e p53: 58% dos casos), quando comparados com o estroma (WT1: 13% e p53: 22% dos casos) e com o tecido renal não tumoral (ausência de expressão em todos os casos estudados). Estes achados sugerem que na maioria dos casos o componente estromal tem ausência de imunexpressão de WT1 e p53, como no rim normal, entretanto alguns casos apresentam imunexpressão destas proteínas, assim como também acontece no componente blastematoso e epitelial.

Assim como nos nossos resultados, CHEN et al. (2004), estudando a imunexpressão de WT1 em 25 pacientes com tumor de Wilms, encontraram imunopositividade nuclear em graus variados nos componentes blastematoso e epitelial, enquanto que as células do componente estromal,

assim como os rhabdomioblastos, mostraram intensa positividade citoplasmática.

Observamos associação estatisticamente significativa entre a imunoposição do WT1 e do p53, tanto quando todos os casos foram avaliados, assim como também quando foram avaliados os componentes separadamente. MAHESWARAN et al. (1993, 1995) descreveram que a proteína WT1 pode estabilizar p53, modulando sua propriedade de ativação e inibindo sua habilidade de induzir apoptose. Esta ação, possivelmente, contribui para a alta frequência da expressão da proteína p53 selvagem vista no tumor de Wilms. DUPONT et al. (2004) descreveram associação entre expressão de p53 e da proteína WT1 quando estudaram 130 carcinomas endometriais usando TMA.

No estudo de LAHOTI et al. (1996) 60% dos tumores apresentaram imunopositividade para proteína p53, entretanto apenas em 16% havia mutação do gene *p53*, concluindo que o acúmulo da proteína p53 não ocorre somente devido a mutação do gene *p53*, mas também pode ser secundário a estabilização do p53 normal por outras proteínas.

A mutação, assim como, a imunoposição de *p53* tem sido associada a histologia desfavorável (presença de anaplasia) no tumor de Wilms (CHEAH et al. 1996; GOVENDER et al. 1998; BENIERS et al. 2001). Entretanto o significado desse achado entre os tumores com histologia favorável tem sido pesquisado e discutido. HUANG et al. (2002), analisando tecido de tumor com histologia desfavorável, histologia favorável com estágio avançado e com doença localizada, encontraram maior expressão

de *p53* e de genes que regulam a angiogênese tanto no tecido com histologia favorável cujo paciente tinha doença avançada quanto nos tecidos com anaplasia.

Não houve associação entre a imunexpressão tumoral da proteína *p53* com idade ao diagnóstico, realização de quimioterapia pré-operatória, estágio e recaída entre os pacientes analisados em nossa série. A anaplasia encontrada em 5 tumores não foi avaliada com imunexpressão dos marcadores estudados, entretanto 4 destes tumores expressavam positividade da proteína *p53* em um ou mais dos componentes histológicos.

No estudo da expressão da proteína *p53* por imunistoquímica em 97 amostras de tumor de Wilms, SREDNI et al. (2001) consideraram *p53* positivo quando foi encontrada positividade nuclear forte e difusa desse marcador. Essa positividade foi associada à presença de metástases ( $p=0,038$ ) e à ocorrência de recaída ( $p=0,06$ ), porém não houve associação com a presença de anaplasia e também não foi capaz de influenciar a sobrevida dos pacientes.

Assim como em nossos resultados, D'ANGELO et al. (2003), estudando 63 casos de tumor de Wilms unilateral com histologia favorável, também não encontraram correlação entre a imunexpressão de *p53* com estágio ( $p>0,3$ ) e progressão ou recaída de doença ( $p>0,3$ ). Neste estudo os autores atribuíram este achado ao fato de todos os seus pacientes não terem recebido quimioterapia pré-operatória, diferente da maioria dos estudos em que foi encontrada associação da imunexpressão do *p53* com prognóstico. Por este motivo presumiu-se que muitos dos tumores com

histologia favorável que expressam p53 são sensíveis ao tratamento quimioterápico, e que apenas os tumores que mantêm imunopositividade de p53 após quimioterapia apresentariam prognóstico desfavorável. Esta suposição não é compatível com os nossos resultados, pois analisando exclusivamente os 20 pacientes que não receberam quimioterapia pré-operatória, não houve associação com fatores de prognóstico e a imunopositividade do p53. Por outro lado, o estudo de SKOTNICKA-KLONOWICZ et al. (2001), que avaliaram 61 pacientes tratados de acordo com os critérios da Sociedade Internacional de oncologia Pediátrica, ou seja, utilizando quimioterapia pré-operatória, mostrou que, apesar dos pacientes com imunopositividade de p53 terem significativamente estádios mais avançados e maior grau de malignidade, a positividade para p53 não foi um fator prognóstico independente neste grupo de pacientes com tumor de Wilms.

GOVENDER et al. (1998) avaliaram a expressão da proteína p53 em uma série de 93 crianças com tumor de Wilms e não encontraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes que receberam e aqueles que não receberam quimioterapia pré-operatória ( $p=0,678$ ), assim como entre aqueles que recidivaram ou morreram versus os que se encontravam vivos e sem recidiva ( $p=,238$ ). Entretanto o grupo de pacientes com mais alta expressão de p53 tiveram tempo de sobrevida significativamente inferior quando comparados ao grupo com menor expressão da proteína (12,6 meses versus 24,8 meses ( $p=0,0003$ )).

Na literatura médica especializada há poucos estudos avaliando o papel prognóstico da imunexpressão da proteína WT1 em tumor de Wilms. Nos resultados de CHEN et al. (2004) 23% (3 de 13 ) dos pacientes com estágio precoce (I/II) apresentavam blastema com imunexpressão nuclear do WT1, enquanto que 67% (8 de 12) dos que tinham estágio avançado (III/IV) apresentavam blastema com positividade nuclear do WT1 ( $p=0,036$ ). Esse resultado é divergente dos nossos achados, pois os pacientes com estágio precoce 94% tiveram imunexpressão nuclear do WT1 e 81% dos que tinham estágio avançado apresentaram essa positividade ( $p=0,036$ ). Além da imunexpressão do WT1 ter sido associada aos estágios mais precoces de doenças, os pacientes que tinham a imunexpressão tiveram sobrevida superior aos que não tinham (81% versus 60%), apesar desta diferença não ter sido estatisticamente significativa ( $p=0,061$ ).

A via Wnt também tem um importante papel tanto na formação do rim normal quanto na tumorigênese do tumor de Wilms e outros tumores (KOESTERS et al. 1999; MAITI et al. 2000; KUSAFUKA et al. 2002; ZIRN et al. 2006). Nós estudamos o perfil de imunexpressão de três proteínas que participam diretamente desta via. As proteínas  $\beta$ -catenina, E-caderina e APC foram avaliadas nos diferentes tecidos tumorais (blastema, epitélio e estroma) e também nos diferentes componentes celulares (membrana, citoplasma e núcleo).

Ao analisarmos o perfil de expressão da proteína  $\beta$ -catenina observamos que na maioria dos casos estudados houve preservação da imunexpressão em membrana (85%) e citoplasma (94%) e em 24% dos

casos encontramos acúmulo nuclear dessa proteína. A imunexpressão nuclear ocorreu principalmente nos componentes blastematoso (21% dos casos estudados) e estromal (36%), enquanto que foi pouco freqüente entre as células do componente epitelial (5% das células do componente epitelial estudadas). Em 14% e 75% dos casos, as células do componente blastematoso e estromal respectivamente, não apresentaram imunexpressão em membrana da  $\beta$ -catenina. Já no componente epitelial, apenas em 5% dos casos não foi encontrada imunexpressão da  $\beta$ -catenina em membrana. No rim normal avaliado não houve imunexpressão nuclear da  $\beta$ -catenina, apenas em 2 casos não foi encontrada imunexpressão em membrana e todos os casos apresentavam expressão em citoplasmática.

Estes achados sugerem que mutação do gene  *$\beta$ -catenina* e/ou alterações de sinalização da via Wnt podem levar ao acúmulo anormal da proteína  $\beta$ -catenina no núcleo celular assim como causar perda da expressão em membrana, principalmente nas células tumorais do estroma e do blastema, contribuindo de alguma forma para o desenvolvimento do tumor de Wilms nestes casos.

KOESTERS et al. (2003) analisaram a expressão celular da proteína  $\beta$ -catenina e correlacionaram seus achados com a mutação do gene  *$\beta$ -catenina*. Semelhante aos nossos resultados, os autores encontraram imunorreatividade da  $\beta$ -catenina em membrana e citoplasma em todas células do componente epitelial de todos os tumores avaliados. Enquanto que expressão nuclear da  $\beta$ -catenina foi encontrada nos componentes blastematoso e estromal, apesar de fortemente expressas, apenas 5 a 10%

das células de cada tumor tinham expressão nuclear. Neste estudo todos os 9 tumores que apresentavam mutação do gene *β-catenina* tinham concomitante imunoexpressão da proteína *β-catenina* em todos os componentes celulares, enquanto que dos 27 tumores que não tinham mutação detectável, quinze (quase 50%), também apresentavam imunoexpressão em todos os componentes celulares, incluindo acúmulo nuclear. Os autores sugerem que imunorreatividade nuclear da proteína *β-catenina* na ausência de mutação do gene *β-catenina*, indica que defeitos em outros genes da via Wnt podem estar envolvidos no desenvolvimento do tumor de Wilms.

Outros estudos que compararam mutação do gene *β-catenina* e expressão da proteína *β-catenina* em outros tumores, também não conseguiram explicar a expressão nuclear de *β-catenina* apenas como secundária a mutação do gene *β-catenina*. SU et al. (2006), analisaram 91 casos de tumores carcinoides gastrointestinais e observaram que expressão nuclear da *β-catenina* em 29,7% dos casos, dos quais em nenhum encontrou-se mutações dos genes *β-catenina* ou *APC*, ou seja, a mutação desses genes não parece estar implicada na presença de expressão nuclear da *β-catenina* nesses tumores. YAMAOKA et al. (2006), ao estudar 15 casos de hepatoblastoma encontraram imunopositividade nuclear da *β-catenina* em todos, porém nenhum apresentava mutação do *CTNNB1* (gene que codifica a proteína *β-catenina*).

Os nossos resultados não mostraram associação da imunopositividade da  $\beta$ -catenina com idade do paciente ao diagnóstico, estágio da doença, realização de quimioterapia pré-operatória ou evolução dos pacientes. No estudo de KOESTERS et al. (2003) a imunoexpressão da  $\beta$ -catenina também não foi diferente em relação ao estágio ou com presença de histologia desfavorável. Entretanto, ELLISON et al. (2005), ao correlacionarem a imunoexpressão de  $\beta$ -catenina com evolução dos pacientes com meduloblastoma, encontraram melhor sobrevida global e livre de doença para o grupo de pacientes que tinha imunorreatividade nuclear.

RAMBURAN et al. (2006) estudaram a imunoexpressão de E-caderina, caderina-11,  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -catenina em nefroblastoma. Nesse estudo os tumores que receberam quimioterapia pré-operatória apresentaram mais freqüentemente a expressão de E-caderina,  $\alpha$ - e  $\gamma$ -catenina. Como nos nossos resultados, os autores não encontraram relação entre expressão de E-caderina e  $\beta$ -catenina com a evolução dos pacientes.

Em nossa análise, avaliando a imunoexpressão de E-caderina nos componentes celulares encontramos que houve imunoexpressão na membrana em 47% dos casos, em citoplasma em 44% e em núcleo em 12%. O acúmulo em núcleo foi encontrado principalmente nos componentes blastema e mesênquima, 21 e 25% respectivamente, enquanto que a positividade nuclear da E-caderina só foi observada em 6% no componente epitelial. A imunoexpressão em membrana foi freqüente nos componentes blastematoso (86%) e epitelial 91%, porém inexistente no componente estromal. Já as células de tecido renal que mostraram imunoexpressão de

E-caderina, todas tinham positividade em membrana e citoplasma, e nenhuma em núcleo.

Semelhante aos nossos achados, SCHULZ et al. (2000), mostraram, por meio de imunistoquímica, que 50% dos tumores avaliados tinham alteração na expressão da E-caderina, sendo que 27% tinham expressão nuclear ou citoplasmática e 23% não apresentaram imunorreatividade em membrana citoplasma ou núcleo. Neste mesmo estudo os autores não identificaram alterações em RNA mensageiro usando RT-PCR, e apenas em 2 de 20 tumores observou-se perda de um alelo da *E-caderina*.

Assim como a  $\beta$ -catenina, também não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a imunexpressão de e-caderina e idade do paciente, estágio da doença, utilização de quimioterapia pré-operatória e evolução dos pacientes. SAFFORD et al. (2005), encontraram significativa redução da imunexpressão de E-caderina em pacientes com tumor de Wilms que apresentavam metástases ao diagnóstico, porém não encontraram relação desse achado com frequência de recaída. Neste estudo, os autores também encontraram, cinco mutações diferentes em sete tumores com estágio avançado e apenas uma mutação em um tumor com estágio precoce de doença. ALAMI et al. (2003), estudando a imunexpressão de E-caderina,  $\gamma$ - e  $\beta$ -cateninas em tecido de tumor primário e de metástases em tumor de Wilms, encontraram significativa baixa expressão de E-caderina e  $\gamma$ -catenina citoplasmática e imunopositividade da  $\beta$ -cateninas em núcleo em tecido metastático, quando comparado ao tumor primário, sugerindo que essas proteínas possam estar envolvidas com

mecanismo de desenvolvimento das metástases em nefroblastoma. De fato, outras publicações, estudando principalmente carcinomas, também tem implicado a E-caderina e  $\beta$ -catenina como proteínas que podem ter papel na disseminação tumoral (PARKER et al. 2001; TANAKA et al. 2002).

Nossa análise mostrou imunoposição do APC em núcleo em 95% dos tumores avaliados, em citoplasma em 9% e nenhum apresentou expressão em membrana. Nos componentes blastematoso e epitelial houve imunopositividade nuclear em 100% dos casos avaliados. No componente mesenquimal a positividade nuclear ocorreu em 89% dos casos. Nas amostras de rim normal 100% apresentaram imunoposição citoplasmática do APC e houve imunopositividade nuclear em 9% dos casos. Não encontramos estudos publicados que demonstrem a frequência de imunoposição de APC especificamente em nefroblastoma. Entretanto é descrito que o APC pode transitar entre o citoplasma e núcleo e pode afetar diretamente o acúmulo de  $\beta$ -catenina no citoplasma ou no núcleo devido sua capacidade de alterar a estabilização dessa proteína (HENDERSON et al. 2000). HAO et al. 2002, estudando a expressão de  $\beta$ -catenina e perda do alelo APC em carcinoma colorretal esporádico, sugerem que, apesar de existir alguns mecanismos capazes de causar expressão anômala da  $\beta$ -catenina, a disfunção do APC pode ter um papel importante nessa expressão.

RAMBURAN et al. (2005) encontraram que, dos 100 tumores de Wilms avaliados, trinta por cento apresentavam perda de heterozigose do APC e 16% inabilidade microsatélite deste gene. Estes achados não

apresentaram correlação com as características clinicopatológicas e não demonstrando papel prognóstico nesta análise. No estudo de LUGLI et al. (2007), a perda citoplasmática do APC, analisada usando TMA, em câncer colorretal, também não foi significativamente associada aos fatores de prognósticos estudados. Nos 89 hepatocarcinomas estudados por ISHIZAKI et al. (2004), não foram encontradas mutações do *APC*, entretanto acharam mutações nos genes *β-catenina* em 41,7% dos casos, *Axin1* em 54,2% e *Axin2* em 37,5%, sugerindo que as mutações destes genes possam alterar a sinalização da via Wnt, resultando no acúmulo nuclear da proteína *β-catenina*.

Assim como *β-catenina* e E-caderina, não encontramos associação da imunoexpressão do APC com idade do pacientes, estágio da doença, realização de quimioterapia pré-operatória e presença de recaída.

Apesar de todos os avanços alcançados nos últimos anos sobre os conhecimentos do tumor de Wilms, talvez a ciência esteja dando os primeiros passos para a compreensão dos caminhos que levam ao desenvolvimento do nefroblastoma. Provavelmente, existam várias vias, associadas entre si ou não, envolvidas na complexa tumorigênese deste tumor.

MAITI et al. (2000) encontram associação significativa entre a mutação do WT1 e da *β-catenina*, sendo que dos 20 tumores que tinham mutação da *β-catenina*, dezenove tinham concomitante mutação do WT1. Nos nossos resultados não encontramos associação significativa entre a imunoexpressão do WT1 com a imunoexpressão da *β-catenina* de uma

forma geral, ou quando analisado separadamente os diferentes componentes tumorais. Em correlação com os resultados descritos acima por MAITI et al. (2000), podemos supor que as mutações tanto de WT1 quanto da  $\beta$ -catenina, podem não ser isoladamente responsáveis por alterações na imunexpressão dos produtos desses genes.

Em nossas análises, a imunexpressão do WT1 foi significativamente associada com a expressão da proteína APC no núcleo e com a ausência de sua expressão no citoplasma. Sugerindo que o acúmulo nuclear das proteínas WT1 e APC possam estar diretamente relacionadas a uma alteração específica na via Wnt. Não foram encontrados artigos que avaliem a relação entre a imunexpressão de WT1 e APC.

A imunexpressão do APC no núcleo também foi associada com a expressão da  $\beta$ -catenina em citoplasma e membrana. Não observamos associação entre a imunexpressão nuclear do APC e da  $\beta$ -catenina, entretanto, dos 5 casos onde não houve imunexpressão do APC no núcleo nenhum tinha  $\beta$ -catenina nuclear expressa. A falta de poder estático dessa análise pode se dever ao fato que dos 94 casos onde o APC foi avaliado, apenas 5 não apresentaram imunorreatividade em núcleo celular. Por outro lado, encontramos uma tendência de associação da imunexpressão da  $\beta$ -catenina com perda de expressão do APC no citoplasma ( $p=0,080$ ). Portanto, é provável que exista realmente um mecanismo comum que leve a expressão anômala dessas proteínas nas células do tumor de Wilms.

Foi encontrada associação entre a imunexpressão da  $\beta$ -catenina em membrana com E-caderina em membrana e citoplasma, mas não

observamos associação de expressão anormal entre ela. O que poderia sugerir que, mesmo participando da via Wnt, essas duas proteínas não estejam simultaneamente alteradas na tumorigênese do nefroblastoma.

Em recente publicação MASCHIETTO et al. (2008) investigaram a associação entre os genes envolvidos na nefrogenese e os encontrados no tumor de Wilms e observaram que os genes presentes no componentes blastematosos coincidiam com a maioria dos genes encontrados na fase inicial do desenvolvimento do tecido renal normal. Três genes envolvidos na via Wnt (PLCG2, ROCK2 e APC) estavam simultaneamente expressos no rim embrionário e no componente blastematoso do tumor de Wilms.

Diante dos nossos resultados e dos estudos publicados na literatura, percebemos que a tumorigênese do nefroblastoma é bastante complexa, pois vários mecanismos podem estar envolvidos e determinado mecanismo que culmina com expressão anormal de proteínas específicas podem ocorrer em uns casos, mas em outros não.

De fato, o tumor de Wilms, assim como a maioria dos cânceres, é caracterizado por alterações de múltiplos genes. Alguns envolvidos no crescimento celular, outros com a diferenciação e outros com o potencial proliferativo das células tumorais.

Além do papel prognóstico que as alterações gênicas possam representar, o conhecimento de suas implicações na tumorigênese do nefroblastoma pode ser o primeiro passo para o desenvolvimento de um tratamento específico, com menos efeitos tóxicos, por meio de terapia alvo.

A análise da expressão de proteínas que possam estar envolvidas no mecanismo de formação do tumor de Wilms, representa um dos caminhos que pode ser explorado para um melhor entendimento da tumorigênese dessa doença. Infelizmente, os estudos de imunexpressão não seguem padrões definidos, o que dificulta muito a comparação dos resultados. No nosso estudo, seguindo uma padronização do departamento de Anatomia Patológica da nossa instituição, optamos por considerar como imunopositiva as amostras que tivessem pelo menos 10% das células do spot positivas, sem considerar a intensidade da expressão. Devemos salientar de forma crítica que poderíamos ter resultados distintos dos que encontramos caso tivéssemos optado por outro ponto de corte para considerar imunexpressão, ou se tivéssemos classificado a intensidade da expressão do marcador.

Acreditamos que a metodologia e os resultados deste estudo, juntamente com os conhecimentos obtidos em outros estudos já realizados e ainda a serem feitos, possam, de alguma forma, gerar conhecimentos capazes de criar padrões uniformes para análise dos achados de imunexpressão.

## 6 CONCLUSÕES

### 6.1 PRINCIPAIS

a) WT1 e p53 foram mais freqüentemente expressos no componente blastematoso e epitelial que no estromal. O tecido renal normal demonstrou ausência de expressão desses marcadores em todos os casos estudados.

b) A expressão nuclear da  $\beta$ -catenina foi mais freqüente noblastema e mesênquima, pouco freqüente em epitélio e inexistente em tecido renal normal.

E-caderina em núcleo foi pouco freqüente em todos os componetes tumorais.

Não houve expressão em membrana da E-caderina no componente mesenquimal.

Na maioria dos casos a E-caderina no estroma não foi expressa em nenhum componente celular.

O APC em núcleo foi frequentemente expresso em todos os componentes do tumor de Wilms.

No rim normal o APC não apresentou expressão nuclear.

A perda de expressão da da E-caderina em membrana, a expressão da  $\beta$ -catenina e APC em núcleo sugerem alteração da via WnT e conseqüente influência na tumorigênese do tumor de Wilms.

- c) Não houve associação estaticamente significativa entre os marcadores estudados e as características clínicas, epidemiológicas, tratamento e evolução dos pacientes, com exceção da expressão WT1 que foi associada com estádios precoces.
- d) Não foi encontrada diferença da sobrevida livre de doença dos pacientes deste estudo em relação a expressão dos marcadores estudados.
- e) Observou-se associação entre a expressão de:
- WT1 com p53
  - WT1 com APC em citoplasma e em núcleo
  - p53 com  $\beta$ -catenina, E-caderina e APC em núcleo
  - $\beta$ -catenina em membrana com E-caderina em membrana e citoplasma e APC em núcleo.
  - $\beta$ -catenina em citoplasma com APC em núcleo
  - E-caderina em núcleo com APC em citoplasma.

## 6.2 SECUNDÁRIAS

- a) A mediana de idade foi 3anos, a maioria dos pacientes era do sexo feminino e da raça branca. A maior parte deles tinham estádios de I a III. Cirurgia foi a primeira abordagem terapêutica na maioria dos casos deste estudo.
- b)** Sobrevida global em 5 anos foi 83% e a sobrevida livre de eventos 76%.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alami J, Williams BR, Yeger H. Differential expression of E-cadherin and beta catenin in primary and metastatic Wilms's tumours. **Mol Pathol** 2003; 56:218-25.

Andrade VP, Cunha IW, Silva EM, et al. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **J Bras Patol Med Lab** 2007; 43:55-60.

Barker N, Clevers H. Catenins, Wnt signaling and cancer. **Bioessays** 2000; 22:961-5.

Beckwith JB, Palmer NF. Histopathology and prognosis of Wilms tumors: results from the First National Wilms' Tumor Study. **Cancer** 1978; 41:1937-48.

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.

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

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. New developments in the pathology of Wilms tumor. **Cancer Invest** 1997; 15:153-62.

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

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.

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

Bonaiti-Pellie C, Chompret A, Tournade MF, et al. Genetics and epidemiology of Wilms' tumor: the French Wilms' tumor study. **Med Pediatr Oncol** 1992; 20:284-91.

Bonetta L, Kuehn SE, Huang A, et al. Wilms tumor locus on 11p13 defined by multiple CpG island-associated transcripts. **Science** 1990; 250:994-7.

Breslow NE, Beckwith JB. Epidemiological features of Wilms' tumor: results of the National Wilms' Tumor Study. **J Natl Cancer Inst** 1982; 68:429-36.

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

Breslow NE, Beckwith JB, Perlman EJ, Reeve AE. Age distributions, birth weights, nephrogenic rests, and heterogeneity in the pathogenesis of Wilms tumor. **Pediatr Blood Cancer** 2006; 47:260-7.

Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. **J Pathol** 2001; 195:72-9.

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

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 BF, Tzen CY, Liang DC, Liu HC, Huang YW, Fan CC. Immunohistochemical expression of Wilms' tumor 1 protein in nephroblastoma. **J Chin Med Assoc** 2004; 67:506-10.

Coppes MJ, Pritchard-Jones K. Principles of Wilms' tumor biology. **Urol Clin North Am** 2000; 27:423-33

D'Angelo MF, Kausik SJ, Sebo TJ, Rathbun SR, Kramer SA, Husmann DA. p53 immunopositivity in histologically favorable Wilms tumor is not related to stage at presentation or to biological aggression. **J Urol** 2003; 169:1815-7.

De Camargo B, de Andrea ML, Franco EL. Catching up with history: treatment of Wilms' tumor in a developing country. **Med Pediatr Oncol** 1987; 15:270-6.

De Camargo B, Franco EL. Single-dose versus fractionated-dose dactinomycin in the treatment of Wilms' tumor. Preliminary results of a clinical trial. The Brazilian Wilms' Tumor Study Group. **Cancer** 1991; 67:2990-6.

De Camargo B. **Fatores que influenciam o prognóstico clínico em pacientes com tumor de Wilms: um estudo nacional**. São Paulo; 1996 [Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

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

Dome SJ, Perman EJ, Ritchey MML, Coppes MJ, Kalapurakal M, Grundy PE. Renal tumors. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. **Principles and practice of pediatric oncology**. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2006. p 905-32.

Dupont J, Wang X, Marshall DS, et al. Wilms Tumor Gene (WT1) and p53 expression in endometrial carcinomas: a study of 130 cases using a tissue microarray. **Gynecol Oncol** 2004; 94:449-55.

Ellison DW, Onilude OE, Lindsey JC, et al. beta-Catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: the United Kingdom Children's Cancer Study Group Brain Tumour Committee. **J Clin Oncol** 2005; 23:7951-7.

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.

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.

Fridman E, Pinthus JH, Kopolovic J, Ramon J, Mor O, Mor Y. Expression of cyclooxygenase-2 in Wilms tumor: immunohistochemical study using tissue microarray methodology. **J Urol** 2006; 176:1747-50.

Grabois MF, Mendonça GA. Prognosis for patients with unilateral Wilms' tumor in Rio de Janeiro, Brazil, 1990-2000. **Rev Saude Publica** 2005; 39:731-7.

Govender D, Harilal P, Hadley GP, Chetty R. p53 protein expression in nephroblastomas: a predictor of poor prognosis. **Br J Cancer** 1998; 77:314-8.

Green DM, D'Angio GJ, Beckwith JB, et al. Wilms tumor. **CA Cancer J Clin** 1996; 46:46-63.

Green DM, Breslow NE, Beckwith JB, et al. Comparison betumor de Wilmseen single-dose and divided-dose administration of dactinomycin and doxorubicin for patients with Wilms' tumor: a report from the National Wilms' Tumor Study Group. **J Clin Oncol** 1998; 16:237-45.

Hao X, Frayling IM, Willcocks TC, et al. Beta-catenin expression and allelic loss at APC in sporadic colorectal carcinogenesis. **Virchows Arch** 2002; 440:362-6.

Hajra KM, Fearon ER. Genes Chromosomes Cadherin and catenin alterations in human cancer. **Cancer** 2002; 34:255-68.

Henderson BR. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. **Nat Cell Biol** 2000; 2:653-60.

Hendriks Y, Franken P, Dierssen JW, et al. Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors. **Am J Pathol** 2003; 162:469-77.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. **Science** 1991; 253:49-53.

Houlston RS. What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. **Mol Pathol** 2001; 54:206-14.

Huang J, Soffer SZ, Kim ES, et al. p53 accumulation in favorable-histology Wilms tumor is associated with angiogenesis and clinically aggressive disease. **J Pediatr Surg** 2002; 37:523-7.

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

Ishizaki Y, Ikeda S, Fujimori M, et al. Immunohistochemical analysis and mutational analyses of beta-catenin, Axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas. **Int J Oncol** 2004; 24:1077-83.

Jones C, Rodriguez-Pinilla M, Lambros M, et al. c-KIT overexpression, without gene amplification and mutation, in paediatric renal tumours. **J Clin Pathol** 2007; 60:1226-31.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J Am Sta Assoc** 1958;53:457-81.

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. Introduction to the genetics of primary renal tumors in children. **Med Pediatr Oncol** 1993; 21:193-8.

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.

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

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

Koufos A, Grundy P, Morgan K, et al. Familial Wiedemann-Beckwith syndrome and a second Wilms tumor locus both map to 11p15.5. **Am J Hum Genet** 1989; 44:711-9.

Kramer S, Meadows AT, Jarrett P. Racial variation in incidence of Wilms' tumor: relationship to congenital anomalies. **Med Pediatr Oncol** 1984; 12:401-5.

Kremer M, Quintanilla-Martinez L, Fuchs M, et al. Influence of tumor-associated E-cadherin mutations on tumorigenicity and metastasis. **Carcinogenesis** 2003; 24:1879-86.

Kumar B, De Silva M, Venter DJ, Armes JE. Tissue microarrays: a practical guide. **Pathology** 2004; 36:295-300.

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.

Lahoti C, Thorner P, Malkin D, Yeger H. Immunohistochemical detection of p53 in Wilms' tumors correlates with unfavorable outcome. **Am J Pathol** 1996; 148:1577-89.

Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease **Annu Rev Cell Dev Biol** 2004; 20:781-810.

Lugli A, Zlobec I, Minoo P, Baker K, et al. Prognostic significance of the wnt signalling pathway molecules APC, beta-catenin and E-cadherin in colorectal cancer: a tissue microarray-based analysis. **Histopathology** 2007; 50:453-64.

Maiti S, Alam R, Amos CI, Huff V. Frequent association of beta-catenin and WT1 mutations in Wilms tumors. **Cancer Res** 2000; 60:6288-92.

Maheswaran S, Park S, Bernard A, et al. Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993; 90:5100-4.

Maheswaran S, Englert C, Bennett P, Heinrich G, Haber DA. The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. **Genes Dev** 1995; 9:2143-56.

Maschietto M, de Camargo B, Brentani H et al. Molecular Profiling of Isolated Histological Components of Wilms Tumor Implicates a Common Role for the Wnt Signaling Pathway in Kidney and Tumor Development. **Oncology** 2008; 75:81-91

Miwa H, Tomlinson GE, Timmons CF, et al. RNA expression of the WT1 gene in Wilms' tumors in relation to histology. **J Natl Cancer Inst** 1992; 84:181-7.

Moch H, Kononen T, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? **Adv Anat Pathol** 2001; 8:14-20.

Parker C, Rampaul RS, Pinder SE, et al. E-cadherin as a prognostic indicator in primary breast cancer. **Br J Cancer** 2001; 85:1958-63.

Pastore G, Carli M, Lemerle J, et al. Epidemiological features of Wilms' tumor: results of studies by the International Society of Paediatric Oncology (SIOP). **Med Pediatr Oncol** 1988; 16:7-11.

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.

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

Pritchard-Jones K, Kelsey A, Vujanic G, et al. Older age is an adverse prognostic factor in stage I, favorable histology Wilms' tumor treated with vincristine monochemotherapy: a study by the United Kingdom Children's Cancer Study Group, Wilm's Tumor Working Group. **J Clin Oncol** 2003; 21:3269-75.

Ramburan A, Oladiran F, Smith C, Hadley GP, Govender D. Microsatellite analysis of the adenomatous polyposis coli (APC) gene and immunoexpression of beta catenin in nephroblastoma: a study including 83 cases treated with preoperative chemotherapy. **J Clin Pathol** 2005; 58:44-50.

Ramburan A, Hadley GP, Govender D. Expression of E-cadherin, cadherin-11, alpha-, beta- and gamma-catenins in nephroblastomas: relationship with clinicopathological parameters, prognostic factors and outcome. **Pathology** 2006; 38:39-44.

Reinhard H, Semler O, Bürger D, et al. Results of the SIOP 93-01/GPOH trial and study for the treatment of patients with unilateral nonmetastatic Wilms Tumor. **Klin Padiatr** 2004; 216:132-40.

Riccardi VM, Sujansky E, Smith AC, Francke U. Chromosomal imbalance in the Aniridia-Wilms' tumor association: 11p interstitial deletion. **Pediatrics** 1978; 61:604-10.

Rivera MN, Kim WJ, Wells J, et al. An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. **Science** 2007; 315:642-5.

Ruteshouser EC, Robinson SM, Huff V. Wilms tumor genetics: mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors. **Genes Chromosomes Cancer** 2008; 47:461-70.

Safford SD, Freemerman AJ, Langdon S, et al. Decreased E-cadherin expression correlates with higher stage of Wilms' tumors. **J Pediatr Surg** 2005; 40:341-8.

Schulz S, Becker KF, Braungart E, et al. Molecular analysis of E-cadherin and cadherin-11 in Wilms' tumours. **J Pathol** 2000; 191:162-9.

Schumacher V, Schneider S, Figge A, et al. Correlation of germ-line mutations and tumor de Wilms-hit inactivation of the WT1 gene with Wilms tumors of stromal-predominant histology. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94:3972-7.

Skotnicka-Klonowicz G, Kobos J, Łoś E, Trejster E, Szymik-Kontorowicz S, Daszkiewicz P. Prognostic value of p53 expression in Wilms' tumor in children. **Med Sci Monit** 2001; 7:1224-9.

Simon R, Sauter G. Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors. **Exp Hematol** 2002; 30:1365-72.

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.

Su MC, Wang CC, Chen CC, et al. Nuclear translocation of beta-catenin protein but absence of beta-catenin and APC mutation in gastrointestinal carcinoid tumor. **Ann Surg Oncol** 2006; 13:1604-9.

Suita S, Kinoshita Y, Tajiri T, et al. Clinical characteristics and outcome of Wilms tumors with a favorable histology in Japan: a report from the Study Group for Pediatric Solid Malignant Tumors in the Kyushu Area, Japan. **J Pediatr Surg** 2006; 41:1501-5.

Takeuchi S, Bartram CR, Ludwig R, et al. Mutations of p53 in Wilms' tumors. **Mod Pathol** 1995; 8:483-7.

Tanaka M, Kitajima Y, Edakuni G, Sato S, Miyazaki K. Abnormal expression of E-cadherin and beta-catenin may be a molecular marker of submucosal invasion and lymph node metastasis in early gastric cancer. **Br J Surg** 2002; 89:236-44.

Vasei M, Moch H, Mousavi A, Kajbafzadeh AM, Sauter G. Immunohistochemical profiling of Wilms tumor: a tissue microarray study. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2008; 16:128-34.

Yamaoka H, Ohtsu K, Sueda T, Yokoyama T, Hiyama E. Diagnostic and prognostic impact of beta-catenin alterations in pediatric liver tumors. **Oncol Rep** 2006; 15:551-6.

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.

Zirn B, Samans B, Wittmann S, et al. Target genes of the WNT/beta-catenin pathway in Wilms tumors. **Genes Chromosomes Cancer** 2006; 45:565-74.

***ANEXOS***

---

**Anexo 1 - Ficha para levantamento dos dados clinico-epidemiológicos.**

- 1- NOME:
- 2- RG:
- 3- DATA NASCIMENTO:
- 4- DATA ADMISSÃO:
- 5- PROCEDÊNCIA:
- 6- RAÇA: ( ) BRANCA ( ) NEGRA ( ) ASIÁTICA ( ) OUTRAS
- 7- HISTÓRIA FAMILIAR: ( ) NÃO ( ) SIM QUAL:
- 8- SINAIS E SINTOMAS ( ) MASSA ABDOMINAL ( ) DOR ABDOMINAL  
( ) HEMATÚRIA ( ) HIPERTENSÃO ( ) OUTROS:
- 9- ESTÁDIO ( ) I ( ) II ( ) III ( ) IV ( ) V
- 10- ANOMALIAS CONGÊNITAS ( ) NÃO ( ) SIM QUAL:
- 11- TRATAMENTO REALIZADO  
QUIMIOTERAPIA /PROTOCOLO:  
CIRURGIA ( ) NÃO ( ) SIM ( ) PRÉ-QT ( ) PÓS-QT  
RADIOTERAPIA ( ) NÃO ( ) SIM ( ) TUMOR PRIMÁRIO  
( ) PULMÃO  
( ) OUTROS
- 13- DATA DO FIM DO TRATAMENTO:
- 12- RECAÍDA ( ) NÃO ( ) SIM DATA:  
SÍTIO: ( ) ABDOMEN ( ) PULMÃO ( ) OUTROS
- 13- EVOLUÇÃO ( ) VIVO ( ) ÓBITO
- 14- DATA DO ÚLTIMO CONTATO:



**Anexo 3 – Expressão de  $\beta$ -Catenina E-Caderina e APC dos 96 pacientes.**

CASO	$\beta$ -CATENINA			E-CADERINA			APC		
	<i>Memb</i>	<i>Citop.</i>	<i>Núcleo</i>	<i>Memb</i>	<i>Citop.</i>	<i>Núcleo</i>	<i>Memb</i>	<i>Citop.</i>	<i>Núcleo</i>
1	pos	pos	neg	pos	pos	pos	neg		pos
2	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos
3	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos
4	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos
5	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
6	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos
7	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
8	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos
9	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos
10	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg
11	pos	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg	pos
12	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos
13	neg	pos	neg	neg	neg	pos	neg		pos
14	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
15	neg	pos	pos	neg	neg	pos	neg	neg	pos
16	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
17	pos	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg	pos
18	pos	pos	pos	pos	neg	pos	neg	neg	pos
19	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos
20	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg		pos
21	pos	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg	pos
22	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos
23	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg		pos
24	pos	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg	pos
25	pos	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg	pos
26	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos
27	pos	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg	pos
28	pos	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg	pos
29	pos	pos	pos				neg	neg	pos
30	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos
31	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
32	neg	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg	pos
33	pos	pos	neg	neg	pos	pos	neg	neg	pos
34	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
35	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos
36	pos	pos	neg	neg	pos	neg	neg		pos
37	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos
38	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
39	pos	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg	pos
40	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos
41	pos	pos	neg				neg	neg	pos
42	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg	pos
43	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos
44	neg	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos
45	pos	pos	pos				neg	neg	pos
46	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos
47	pos	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg	pos
48	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
49	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	pos	pos
50	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos

CASO	β-CATENINA			E-CADERINA			APC		
	Memb	Citop.	Núcleo	Memb	Citop.	Núcleo	Memb	Citop.	Núcleo
51	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
52	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos
53	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos
54	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos
55	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg	pos	pos
56	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos
57	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos
58	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos
59	neg	neg	neg				neg	neg	neg
60	pos	pos	neg				neg	pos	pos
61	pos	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg	pos
62	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
63	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
64	pos	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg	pos
65	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos
66	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos
67	pos	pos	pos						
68	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos
69	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos
70	pos	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg	pos
71	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos
72	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos
73	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos
74	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
75	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
76	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos
77	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos
78	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
79	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos
80	pos	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg	pos
81				pos	neg	neg	neg	neg	pos
82	pos	pos	pos				neg	neg	pos
83	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
84	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos
85	pos	pos	neg				neg	neg	pos
86	pos	pos	neg				neg	neg	pos
87	pos	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg	pos
88	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos
89	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos
90	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos
91	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos
92	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos
93	pos	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg	pos
94	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
95	pos	pos	neg	neg	neg		neg	pos	pos
96	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos