CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT E DO PROCESSO DE TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA DURANTE A EMBRIOGÊNESE DE RIM E SUAS IMPLICAÇÕES EM TUMORES DE WILMS

MARIANA MASCHIETTO

Tese de doutorado apresentada à Fundação Antônio Prudente para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro Co-orientador: Prof. Dra. Beatriz de Camargo

> São Paulo 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Maschietto, Mariana Caracterização da expressão dos genes da via de sinalização WNT e do processo de transição epitélio-mesênquima durante a embriogênese de rim e suas implicações em tumores de Wilms / Mariana Maschietto – São Paulo, 2009. 151p. Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia. Orientador: Dirce Maria Carraro

Descritores: 1.TUMOR DE WILMS. 2.REGULACAO DA EXPRESSAO GENICA NA EMBRIOGENESE. 3. VIAS DE SINALIZAÇÃO. 4. RIM. 5. EXPRESSÃO GÊNICA. 6. MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO.

"A região mágica do imaginário é justamente Phantásien, à qual devemos viajar vez por outra, para lá nos tornarmos videntes. Aí podemos retornar à realidade exterior, com nova consciência, para transformar esta realidade, ou ao menos vê-la e vivenciá-la de forma diferente."

Michael Ende

DEDICATÓRIA

Muitas pessoas marcam a vida para sempre, algumas porque vão ajudando na construção e outras simplesmente por deixá-la mais leve.

Algumas pessoas nos abrem grandes portas e outras deixam nossas vidas mais alegres.

Algumas pessoas nos marcam porque nos apresentam sonhos e outras ainda porque nos desafiam a construí-los.

Os nomes que eu gostaria de escrever aqui são muitos. Mas eu sei que, ao ler essa dedicatóra, vocês vão se reconhecer nessas palavras.

Dedico essa tese a vocês.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

... em especial à minha orientadora, Dra. Dirce Maria Carraro, pela amizade, por tantas oportunidades e por todo o apoio e dedicação. Obrigada pela paciência e confiança ao longo desses anos.

... a minha co-orientadora, Dra. Beatriz de Camargo, por tantas portas abertas.

... ao pessoal do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular, fundamentais de tantas formas para o desenvolvimento do trabalho, Elisa N. Ferreira, Bruna D. F. Barros, Leticia A. Martins, Eloisa Oliviere, Tatiana I. Ricca, Bianca C. G. Lisboa, Carolina Sens, Fábio S. Piccole, Gustavo C. Molina, Mev D. Valentin, Louise D. Mota, Vera C. Prescinoti e Cristiane Gonçalves. E também a Elen P. Bastos, Maria Cristina Rangel, Nádia P. Castro Thiago Saraiva e Aderbal R. Silva, que já não estão no laboratório. Vocês foram importantes dentro e fora do laboratório.

... a Dra. Helena Brentani, do Laboratório de Biotecnologia, fundamental em muitos momentos matemáticos, estatísticos e de bioinformática desse trabalho.

... a Dra. Renata Coudry, Dr. Fernando Soares e também José Ivanildo Neves, Maria N. Fátima Ferreira, Severino Silva e Carlos Nascimento, do departamento de Anatomia Patológica que auxiliarem com os experimentos desse trabalho.

... a Dra. Adriana A. M. Dias, pelo auxílio nos experimentos com os animais.

... a Dra. Silvia Mendonça por ceder amostras tão especiais e pela ajuda com a imunoistoquímica.

... a Adriana Trapè, que participou do início desse trabalho, assim como César Torres e Luiz Paulo Camargo, que nos auxiliaram nas análises matemáticas e estatísticas iniciais.

... a Pedro Galante e Sandro de Souza do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, assim como a Lucas Fahhan e Eduardo J. Neves do IME/USP, pelo auxílio com a bioinformática.

... aos responsáveis pela Pós-Graduação, especialmente Ana Maria Kurinari, e Luciane Pitombeira.

... aos responsáveis pela Biblioteca: Rosinéia A. Carneiro, Francyni Pólen G. Lima e especialmente Sueli Francisco pela formatação da tese.

E a todas às pessoas que, direta ou indiretamente, me auxiliaram e contribuíram na realização deste estudo. Este trabalho é o resultado de todos vocês!

Em especial, agradeço...

... aos meus pais, Hermes G. Maschietto e Cleide de Cássia C. Maschietto. pela dedicação, amor, apoio incondicional, e por nunca medirem esforços para a minha felicidade. Vocês são a base das minhas conquistas.

... aos meus irmãos, Mauricio Maschietto e Murilo Maschietto. Por estarem sempre presentes, quebrando meus galhos, lendo, dançando ou dormindo, essa tese também é de vocês. Mau, depois de tantos anos, você faz muita falta em São Paulo. Murilo, o que teria sido dessa cidade se nós dois morássemos nela?

... ao meu namorado, Luiz Paulo Camargo, por seu apoio constante e principalmente por estar presente em todos os momentos.

... às minhas irmãs queridas, Melissa Chagas Assunção, Rafaella Barci Dinni e Márcia Van Dick de Toledo.

... aos meus amigos do coração, Aline do Nascimento Bolpetti, Amanda Gonçalves, Aline Lisie Ramos, Cláudia M. Campos, Juliana F. Cuzzi, Fabriciano Pinheiro, Daniel O. Vidal, Juliana M. Brandão, Eneida Navarro, Karina Okajima, Thais C. Vicente, Regina P. Bossolan.

... também não posso deixar de me lembrar de Doreen e Karol B. Zadinello, Edaise M. Silva, Yukie Sato Kuwabara, Luciane Kagohara e Roberta Peixoto.

... aos muitos amigos não citados, da mesma forma, tão especiais.

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

"Sou um pouco de todos que conheci, um pouco dos lugares que fui, um pouco das saudades que deixei, sou muito das coisas que gostei."

Ramon Hasman

RESUMO

Maschietto M. Caracterização da expressão dos genes da via de sinalização WNT e do processo de transição epitélio-mesênquima durante a embriogênese de rim e suas implicações em tumores de Wilms. São Paulo; 2009. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O desenvolvimento do rim envolve interações complexas entre as células epiteliais e mesenquimais. Uma interrupção em qualquer passo crucial da progressão morfogenética pode levar a má formação renal e doenças, incluindo câncer. O tumor de Wilms (TW) ou nefroblastoma é originado pela interrupção da diferenciação das células do blastema metanéfrico resultando em um tumor composto por três componentes histológicos, blastema, epitélio e estroma. O componente blastematoso apresenta características moleculares altamente semelhantes aos primeiros estágios da nefrogênese, sugerindo que este componente retém os eventos moleculares chaves responsáveis pela origem do tumor. Relatos mostram que a regulação não apropriada de genes de vias de transdução de sinal é um fator importante para interrupção da diferenciação renal e, provavelmente, para o aparecimento do TW. Nesse estudo, para identificar as alterações moleculares do início da diferenciação do rim e que são recapituladas no TW, a expressão de genes pertencentes às vias de transdução de sinal foi avaliada em células do blastema metanéfrico de quatro estágios temporais da diferenciação em camundongos (de 15,5 dias pós-coito até o rim completamente diferenciado), e em células do blastema de TWs e de rins diferenciados em humanos. Entre as vias avaliadas estão a via de sinalização Wnt, fosfatidilinositol (PI3K) e genes associados à transição epitélio-mesênquima e mesênquima-epitélio (EMT/MET), que são vias sabidamente envolvidas no desenvolvimento embrionário. Para avaliar TWs em humanos e nefrogênese em camundongos, foi desenvolvido um modelo que permite a hibridação das moléculas-alvo de humanos e camundongos em uma mesma plataforma de cDNA microarray. Trezentos e vinte e seis trechos de genes ortólogos de humanos e camundongos, com alta similaridade em nível de nucleotídeos, foram imobilizados em uma

plataforma de vidro. O RNA total das células capturadas a laser foi amplificado e hibridado. Foram selecionados 18 genes, cuja expressão no início da diferenciação do rim foi recapitulada no TW, dos quais 11 foram menos expressos no tumor e apresentaram expressão crescente durante a nefrogênese e 7 foram mais expressos no tumor e apresentaram expressão decrescente durante a nefrogênese. A clusterização hierárquica não supervisionada baseada na expressão dos 18 genes foi capaz de agrupar os rins maduros de ambas as espécies, humanos e murinos, e discriminá-los das amostras de TW, que por sua vez foram agrupados com os rins mais precoces, validando o modelo de análise proposto. Os 18 genes foram avaliados em grupos independentes de amostras por RNAm e proteína. Foram selecionados 12 dos 18 genes para validação por RT-PCR quantitativo no grupo inicial de amostras, dos quais, 9 (75%) confirmaram a expressão. Desses, 5 (55,6%) foram validados em um grupo independente de amostras. Quanto ao nível protéico, 8 genes foram avaliados por imunoistoquímica em TWs, rins maduros e durante a nefrogênese de humanos. A avaliação quantitativa da expressão protéica foi concordante com os resultados de expressão de RNA mensageiro para cinco (62,5%) genes. Assim, esse estudo identificou WNT5B, PI3KCA, FZD2, GRK7, TESK1 e TIMP3 como associados pela primeira vez aos TWs. As alterações da expressão desses genes devem ser eventos precoces da interrupção da diferenciação que leva а transformação maligna. Adicionalmente, combinações de trios de genes foram avaliadas como marcadores preditivos de recaída em TW. O melhor trio composto por IGF2, TESK1 e PAX2, foi capaz de discriminar corretamente 85,71% das amostras quanto a recaída e não recaída. Esse estudo contribuiu para a identificação de novos genes associados com o aparecimento do TW, e como são alterações moleculares precoces, provavelmente são desencadeadoras do aparecimento do TW. Dessa forma, são candidatos apropriados para serem testados como alvos terapêuticos e marcadores moleculares para auxiliar a prática diária do TW.

SUMMARY

Maschietto M. [Gene expression characterization of WNT signaling pathway and epithelial-mesenchymal transition during kidney embryogenesis and their implications in Wilms tumors]. São Paulo; 2009. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Kidney development involves complex interactions between epithelial and mesenchymal cells. A disruption at any crucial step of the morphogenetic progression may lead to kidney malformations and diseases, including cancer. Wilms tumor (WT) or nephroblastoma originates from the metanephric blastema cells, which were unable to complete the differentiation process, resulting in a tumor composed by three histological components, blastema, epithelia and stroma. Blastemal component presents molecular characteristics which are highly similar to the earliest stages of kidney development, suggesting that it retains the key molecular events responsible for WT onset. Deregulation of signal transduction pathways has showed to be an important factor for interruption of renal differentiation, and probably for the WT onset. In this study, aiming to identify the early molecular alterations potentially involved in WT arising, the expression pattern of genes belonging to the transduction signaling pathways was evaluated in cells of the metanephric blastema in four temporal differentiation stages from 15,5 days post-coitum to the fully differentiated kidney in mice, and in blastemal cells of WT and human differentiated kidneys. To evaluate nephrogenesis in mice and WT in humans, we developed a model that allows the hybridization of target molecules of both species in the same cDNA microarray platform. Three hundred and twenty-six stretches of orthologous genes from humans and mice that share high similarity at nucleotide level were immobilized on a glass platform. Wnt signaling pathway, phosphatidylinositol (PI3K) and genes related to epithelial-mesenchymal transition and epithelial-mesenchymal (EMT/MET), associated to the embryonic development, were among the

evaluated pathways. Blastemal cells were laser captured from 24 WT samples at four stages of nephrogenesis. Total RNA from these samples was amplified and hybridized in the platform. Eighteen genes were selected, whose expression in the initial of kidney differentiation were also observed in WT, where 11 were down-regulated in WT and reported an increasing expression during nephrogenesis and 7 were up-regulated in WT and presented a decreasing expression during nephrogenesis. Non-supervised hierarchical clustering based on the expression of 18 genes grouped differentiated kidneys from both species, human and murine, and discriminated both from WT samples, which were grouped with the earliest kidney stages, validating the model proposed by this study. The 18 genes were assessed in independent groups of samples at mRNA and protein levels. Twelve out of 18 genes were selected for validation by quantitative RT-PCR in the initial sample set and the expression of 9 (75%) genes was confirmed. From the 9 genes, 5 (55.6%) were validated in an independent group of samples. At protein level, 8 genes were evaluated by immunohistochemistry in WT, during nephrogenesis and in differentiated kidneys in humans. Quantitative evaluation of protein expression was consistent with the results of mRNA expression for 5 (62.5%) genes. This study identified WNT5B, PI3KCA, FZD2, GRK7, TESK1 and TIMP3, which had not been previously associated to WT. Gene expression alterations may be the early events of the interruption of cell differentiation that leads to malignant transformation. Additionally, combinations of trios of genes were tested as predictors of WT relapse revealing IGF2, TESK1 and PAX2 as the best trio because it was able to correctly discriminate 85.71% of the samples. This study contributes to the identification of new genes associated to the WT onset and to the early molecular alterations, which are likely to trigger the WT arising. In this way, these genes are candidates to be tested for therapeutic targets and also for molecular markers to assist the daily WT practice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Etapas da formação do glomérulo durante a embriogênese do rim	9
Figura 2	Esquema da via de transdução de sinal associada ao processo de MET/EMT, PI3K e WNT	18
Figura 3	Comparação da morfologia do rim embrionário humano e do tumor de Wilms	23
Figura 4	Confirmação da sequência amplificada para ser imobilizada na lâmina customizada	38
Figura 5	Microdissecção a <i>laser</i> de células do componente blastematoso do TW	45
Figura 6	Representação das amostras no TMA e do rim embrionário corados por hematoxilina-eosina	57
Figura 7	Gel de agarose 1% para visualização do RNA amplificado	69
Figura 8	Avaliação da qualidade da lâmina customizada	72
Figura 9	Distribuição dos 47 genes nos 24 cromossomos	76
Figura 10	Caracterização dos 47 genes diferencialmente expressos entre TW e RM quanto a processo biológico, função molecular e componente celular	78
Figura 11	Representação do comportamento dos genes durante a nefrogênese e nos TWs	80

Figura 12	Comportamento dos 18 genes durante a nefrogênese	81
Figura 13	Clusterização hierárquica não supervisionada utilizando correlação de Pearson e <i>complete linkage</i>	83
Figura 14	Expressão relativa por qRT-PCR dos 9 validados no grupo inicial de amostras, comparando TW e RM no grupo independente de amostras	86
Figura 15	Intensidade de marcação nas amostras tumorais (TW), representadas pelo componente blastematoso, e nos rins maduros (RM), representados pelos glomérulos	88
Figura 16	Marcação citoplasmática, nuclear e de membrana de CRABP2	95
Figura 17	Marcação citoplasmática e de membrana de GRK7	96
Figura 18	Marcação citoplasmática de IGF2	97
Figura 19	Marcação citoplasmática de TESK1	98
Figura 20	Marcação citoplasmática e de membrana de WNT5B	99
Figura 21	Marcação de membrana de FZD2	100
Figura 22	Marcação citoplasmática e nuclear de HDGF	101
Figura 23	Marcação citoplasmática de TIMP3	102
Figura 24	Expressão relativa por qRT-PCR dos genes, comparando os grupos de recaída (R) e não-recaída (NR)	104

Figura 25Trios de genes com mais de 80% de acertos totais.....106

Figura 26	Tendência decrescente no nível de expressão medido por	
	qRT-PCR nas amostras de TW que não recaíram (TW NR),	
	TW que recaíram (TW R) e nos rins diferenciados	
	(RD) 1	125

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1A	Informações clínicas para as 30 amostras de TWs que foram usadas nos experimentos de cDNA <i>microarray</i> e na validação técnica dos dados encontrados	40
Tabela 1B	Informações clínicas para as 35 amostras de TWs que foram usadas nos experimentos de validação independente	41
Tabela 2	Sequências dos oligonucleotídeos utilizados, com seus respectivos tamanhos de amplificados e eficiência de amplificação	54
Tabela 3	Anticorpos selecionados para validação	58
Tabela 4	Valores limites de intensidade	63
Tabela 5A	Tratamento das amostras tumorais e normais humanas desde a microdissecção a <i>laser</i> , RNA total e RNA amplificado	66
Tabela 5B	Tratamento das amostras de rins embrionários de camundongo desde a microdissecção a <i>laser</i> , RNA total e RNA amplificado	67
Tabela 6	Concentração e qualidade das 35 amostras utilizadas na validação independente do estudo	68
Tabela 7	Relação entre RIN obtido pelas amostras e a média da concentração obtida após amplificação das amostras tumorais	69

Tabela 8	Representação de cDNAs por vias de sinalização imobilizados em lâmina de vidro	70
Tabela 9	Correlação de Pearson e número de <i>spot</i> s avaliáveis (do total de 1.808) das amostras utilizadas no estudo	73
Tabela 10	Genes diferencialmente expressos (p<0,05). Os sinais negativos e positivos representam os genes mais expressos	
	rim maduro e mais expressos no TW, respectivamente	75
Tabela 11	Genes selecionados para validação técnica com os valores de expressão dado por cDNA microarray (cDNA MA) e qRT- PCR	84
Tabela 12	Comportamento dos genes no grupo independente de amostras	85
Quadro 13	Comparação da expressão por qRT-PCR e IHQ em TW x RM dos grupos independentes com o grupo inicial de amostras	89
Tabela 14	Análise da imunoistoquímica das amostras de componente blastematoso de TW e dos rins maduros	94
Tabela 15	Combinações de trios de genes	105
Quadro 1	Estadiamento dos tumores de Wilms	4
Quadro 2	Genes selecionados para validação por imunoistoquímica e localização esperada da proteína	59
Quadro 3	Distribuição dos 47 genes nos 24 cromossomos	76

LISTA DE ABREVIAÇÕES

°C	Graus Celcius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
AC	Acetato
BM	Banho Maria
cDNA	Do inglês, DNA complementar ao RNA
COG	Do inglês, Children Oncology Group
Cy3	Do inglês, <i>Cyanine 3 dye</i>
Cy5	Do inglês, <i>Cyanine 5 dye</i>
Ct	Do inglês, Cycle threshold
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxirribonucleosídeos-Trifosfato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Do inglês, Ethylene Diamine TetrAcetic Acid
EMT	Do inglês, Epithelial-Mesenchymal Transition
EST	Do inglês, Expressed Sequence Tag
GCBTTW	Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento de Tumores de
	Wilms
MET	Do inglês, Mesenchymal-Epithelil Transition
mL	Mililitro
mМ	Milimolar
NaAc	Acetato de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCBI	Do inglês, National Center for Biotechnology Information
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
OHMS	Unidade de resistência de um condutor

ng	nanograma
NWTSG	Do inglês, National Wilms Tumor Study Group
pb	pares de base
PCR	Do inglês, Polimerase Chain Reaction
qRT-PCR	Do inglês, Quantitative Reverse Transcriptase-PCR
RaSH	Do inglês, Rapid Subtraction Hybridization
RD	Rim Diferenciado
mRNA	RNA mensageiro
RNAse	Ribonuclease
RNA	Ácido Ribonucléico
RPM	Rotações Por Minuto
RT-PCR	Do inglês, Reverse Transcriptase-PCR
SDS	Sulfato Dodecil de Sódio
SSC	Solução Salina de Citrato de Sódio
TE	Tris-EDTA
Tris	Do inglês, Trishydroxymethylaminomethane
TS	Do inglês, <i>Template Switch</i>
SIOP	Do inglês, Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique
TW	Tumor de Wilms
TWs	Tumores de Wilms
WNT	Do inglês, <i>Wingless signaling pathway</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Tumor de wilms: aspectos epidemiológicos e clínicos	1
1.2	Tumores embrionários e embriogênese: aspectos comuns	6
1.3	Vias de transdução de sinal na diferenciação	10
1.3.1	Via de sinalização celular Wnt	11
1.3.2	Transição mesênquima-epitélio e epitélio-mesênquima	14
1.4	Aspectos moleculares da nefrogênese	18
1.5	O tumor de wilms – aspectos morfológicos e moleculares	20
1.6	Desenvolvimento de um modelo para avaliar os mecanismos	
	comuns entre a nefrogênese e o surgimento do TW	29
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo geral	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3 3.1	MATERIAL E MÉTODOS	34 34
3 3.1 3.2	MATERIAL E MÉTODOS Comitê de Ética Construção da plataforma de customizada de <i>microarray</i>	34 34 34
3 3.1 3.2 3.2.1	MATERIAL E MÉTODOS Comitê de Ética Construção da plataforma de customizada de <i>microarray</i> Seleção das sequências para imobilização na plataforma de	34 34 34
3 3.1 3.2 3.2.1	MATERIAL E MÉTODOS. Comitê de Ética. Construção da plataforma de customizada de <i>microarray</i> Seleção das sequências para imobilização na plataforma de <i>microarray</i> .	34 34 34 34
3 3.1 3.2 3.2.1 3.2.2	MATERIAL E MÉTODOS. Comitê de Ética. Construção da plataforma de customizada de <i>microarray</i> Seleção das sequências para imobilização na plataforma de <i>microarray</i> . PCR dos fragmentos para construção da plataforma.	34 34 34 34 35
3 3.1 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.2	MATERIAL E MÉTODOS. Comitê de Ética. Construção da plataforma de customizada de <i>microarray</i> Seleção das sequências para imobilização na plataforma de <i>microarray</i> . PCR dos fragmentos para construção da plataforma. Purificação dos fragmentos de PCR.	34 34 34 34 35 36
 3 3.1 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 	MATERIAL E MÉTODOS. Comitê de Ética. Construção da plataforma de customizada de <i>microarray</i> Seleção das sequências para imobilização na plataforma de <i>microarray</i> . PCR dos fragmentos para construção da plataforma. Purificação dos fragmentos de PCR. Clonagem, PCR de colônia e sequenciamento.	34 34 34 35 36 37
 3 3.1 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 3.3 	MATERIAL E MÉTODOS. Comitê de Ética. Construção da plataforma de customizada de <i>microarray</i> Seleção das sequências para imobilização na plataforma de <i>microarray</i> . PCR dos fragmentos para construção da plataforma. Purificação dos fragmentos de PCR. Clonagem, PCR de colônia e sequenciamento. Casuística.	34 34 34 35 36 37 39
 3 3.1 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 3.3 3.3.1 	MATERIAL E MÉTODOS. Comitê de Ética. Construção da plataforma de customizada de microarray Seleção das sequências para imobilização na plataforma de microarray. PCR dos fragmentos para construção da plataforma. Purificação dos fragmentos de PCR. Clonagem, PCR de colônia e sequenciamento. Casuística. Amostras tumorais.	34 34 34 35 36 37 39 39 39
 3 3.1 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 3.3 3.3.1 3.3.2 	MATERIAL E MÉTODOS. Comitê de Ética. Construção da plataforma de customizada de microarray Seleção das sequências para imobilização na plataforma de microarray. PCR dos fragmentos para construção da plataforma. Purificação dos fragmentos de PCR. Clonagem, PCR de colônia e sequenciamento. Casuística. Amostras tumorais. Amostras de Rim de Camundongos.	34 34 34 35 36 37 39 39 39 39
 3 3.1 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 3.3 3.3.1 3.3.2 3.3.2 3.3.3 	MATERIAL E MÉTODOS. Comitê de Ética. Construção da plataforma de customizada de microarray Seleção das sequências para imobilização na plataforma de microarray. PCR dos fragmentos para construção da plataforma. Purificação dos fragmentos de PCR. Clonagem, PCR de colônia e sequenciamento. Casuística. Amostras tumorais. Amostras de Rim de Camundongos. Referência Universal.	34 34 34 35 36 37 39 39 39 39 39 39 39
 3 3.1 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 3.3 3.3.1 3.3.2 3.3.2 3.3.3 3.4 	MATERIAL E MÉTODOS. Comitê de Ética. Construção da plataforma de customizada de microarray Seleção das sequências para imobilização na plataforma de microarray. PCR dos fragmentos para construção da plataforma. PUrificação dos fragmentos de PCR. Clonagem, PCR de colônia e sequenciamento. Casuística. Amostras tumorais. Amostras de Rim de Camundongos. Referência Universal. Enriquecimento das amostras.	34 34 34 35 36 37 39 39 39 39 39 42 44

3.4.2	Microdissecção a laser	44
3.4.3	Dissecção do componente blastematoso	45
3.5	Extração de RNA	45
3.6	Amplificação do RNA mensageiro	47
3.7	Experimentos de Microarray	47
3.7.1	Desenho Experimental	47
3.7.2	Marcação e Hibridação	48
3.7.3	Pré-análise das lâminas hibridadas	50
3.8	Ensaios de RT-PCR quantitativo (qRT-PCR)	51
3.8.1	Síntese de cDNA	51
3.8.2	Padronização das Reações para qRT-PCR	52
3.9	Construção do Tissue-Microarray (TMA)	56
3.10	Imunoistoquímica	57
3.11	Análises matemáticas e estatísticas	60
3.11.1	cDNA <i>Microarray</i>	60
3.11.2	RT-PCR quantitativo	61
3.11.3	B Imunoistoquímica	62
3.11.3	B Imunoistoquímica	62
3.11.3 4	B Imunoistoquímica	62 64
3.11.3 4 4.1	Imunoistoquímica RESULTADOS Casuística	62 64 64
3.11.3 4 4.1 4.1.1	RESULTADOS Casuística Amostras tumorais	62 64 64 64
3.11.3 4 4.1 4.1.1 4.1.2	RESULTADOS Casuística Amostras tumorais Extração de RNA total e amplificação do RNA mensageiro das	62 64 64 64
3.11.3 4 4.1 4.1.1 4.1.2	RESULTADOS Casuística Amostras tumorais Extração de RNA total e amplificação do RNA mensageiro das amostras tumorais	62 64 64 64
3.11.3 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2	RESULTADOS Casuística Amostras tumorais Extração de RNA total e amplificação do RNA mensageiro das amostras tumorais Construção da plataforma de vias	62 64 64 64 64
3.11.3 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2 4.2.1	RESULTADOS Casuística Amostras tumorais Extração de RNA total e amplificação do RNA mensageiro das amostras tumorais Construção da plataforma de vias Pré-análises dos experimentos de <i>microarray</i> com a plataforma	62 64 64 64 70
3.11.3 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2 4.2.1	RESULTADOS Casuística Amostras tumorais Extração de RNA total e amplificação do RNA mensageiro das amostras tumorais Construção da plataforma de vias Pré-análises dos experimentos de <i>microarray</i> com a plataforma customizada	62 64 64 64 70
3.11.3 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2 4.2.1 4.3	RESULTADOS Casuística Amostras tumorais Extração de RNA total e amplificação do RNA mensageiro das amostras tumorais Construção da plataforma de vias Pré-análises dos experimentos de <i>microarray</i> com a plataforma customizada Genes diferencialmente expressos nos tws em comparação com	62 64 64 64 70 71
3.11.3 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2 4.2.1 4.3	RESULTADOS Casuística Amostras tumorais Extração de RNA total e amplificação do RNA mensageiro das amostras tumorais Construção da plataforma de vias Pré-análises dos experimentos de <i>microarray</i> com a plataforma customizada Genes diferencialmente expressos nos tws em comparação com rins diferenciados	62 64 64 70 71 74
3.11.3 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2 4.2.1 4.3 4.4	RESULTADOS Casuística Amostras tumorais Extração de RNA total e amplificação do RNA mensageiro das amostras tumorais Construção da plataforma de vias Pré-análises dos experimentos de <i>microarray</i> com a plataforma customizada Genes diferencialmente expressos nos tws em comparação com rins diferenciados Identificação dos genes alterados no TW que recapitulam os	62 64 64 70 71 74
3.11.3 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2 4.2.1 4.3 4.4	RESULTADOS Casuística Amostras tumorais Extração de RNA total e amplificação do RNA mensageiro das amostras tumorais Construção da plataforma de vias Pré-análises dos experimentos de <i>microarray</i> com a plataforma customizada Genes diferencialmente expressos nos tws em comparação com rins diferenciados Identificação dos genes alterados no TW que recapitulam os primeiros estágios da nefrogênese	62 64 64 70 71 74
3.11.3 4 4.1 4.1.1 4.2 4.2 4.2.1 4.3 4.4 4.5	RESULTADOS Casuística Amostras tumorais Extração de RNA total e amplificação do RNA mensageiro das amostras tumorais Construção da plataforma de vias Pré-análises dos experimentos de <i>microarray</i> com a plataforma customizada Genes diferencialmente expressos nos tws em comparação com rins diferenciados Identificação dos genes alterados no TW que recapitulam os primeiros estágios da nefrogênese Confirmação dos genes diferencialmente expressos por QRT-PCF	62 64 64 70 71 74 79 R83

	por RT-PCR quantitativo em um grupo independente de amostras	86
4.7	Avaliação da correspondência da expressão de rna mensageiro	
	e proteína	87
4.8	Comparação conjunta da expressão dos grupos independentes	
	com o grupo inicial de amostras	89
4.9	Caracterização tecidual da expressão protéica em TWs e durante	
	a nefrogênese	90
4.10	Busca de marcadores de recaída em TW	.103
5	DISCUSSÃO	.107
6	CONCLUSÕES	128
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
	ANEXOS	
	Anexo 1 Artigo publicado na Oncology 2008: 75(1-2):81-91	

Anexo 1	Artigo publicado na Oncology 2008 ; $75(1-2)$:81-91.
Anexo 2	Artigo na Diagnostic Molecular Pathology. In press.

1 INTRODUÇÃO

1.1 TUMOR DE WILMS: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS

As neoplasias pediátricas representam entre 2% e 3% de todas as neoplasias na maioria das populações, sendo que o percentual mediano dos tumores pediátricos observados nos Registros de Câncer de Base Populacional Brasileiros encontra-se próximo de 3%. A estimativa para o ano de 2008 para o Brasil foi de que dos 351.720 casos novos de neoplasias malignas, à exceção dos tumores de pele não melanoma, cerca de 9.890 casos novos seriam em crianças e adolescentes até os 18 anos de idade (Ministério da Saúde 2008).

Nos países em desenvolvimento, o câncer pediátrico está se destacando como a mais importante causa de óbito, devido provavelmente às atuais políticas de prevenção de outras doenças infantis. Atualmente, o câncer representa a segunda causa de morte em crianças de 1 a 19 anos no Brasil, atrás apenas de causas externas como acidentes e violência (Ministério da Saúde 2008).

Nas três últimas décadas, observou-se um avanço na terapêutica contra o câncer resultando em aumento no número de crianças que atingiram a cura e chegaram à vida adulta (YOUNG et al. 1986). A mortalidade das crianças acometidas por todos os tipos de câncer

(leucemias, linfomas e tumores sólidos), apresentou declínio importante a partir de 1960, em áreas desenvolvidas como América do Norte, Europa Central, Japão e Oceania. Declínios menos evidentes foram observados no leste Europeu, América do Sul e outras áreas pouco desenvolvidas (MARTOS e OLSEN 1993; LEVI et al. 1995).

Dentre os tumores sólidos pediátricos, os mais comumente encontrados são os retinoblastomas, hepatoblastomas, neuroblastomas, tumores neuroectodérmicos primitivos ou sarcoma de Ewing, rabdomiossarcomas e nefroblastomas ou tumores de Wilms (TW). Os tumores renais representam 5 a 10% (LITTLE 1999) dos tumores da infância, sendo que aproximadamente 95% destes são TWs, que afetam uma em cada 10.000 crianças (RIVERA e HABER 2005).

Na década de 1970, a incidência de TW era considerada estável, independente de raça, sexo ou área geográfica (INNIS 1973). Já no final da década de 1990, os estudos mostraram variações geográficas, com maiores incidência na Escandinávia, Nigéria e Brasil, e menores no Japão, Índia e Cingapura (PARKIN et al. 1988). Um estudo caso-controle sugeriu que pode existir uma relação entre o aumento da incidência de TW no Brasil e a exposição dos pais a pesticidas (SHARPE et al. 1995) ou com a ingestão de analgésicos que contenham dipirona pelas mães durante a gravidez (FRANCO et al. 1991). Apesar de ter sido banido em países europeus e na América do Norte devido ao risco de causar agranulocitose (0,2 a 2 casos por milhão), a dipirona é largamente utilizada no Brasil, inclusive em postos de saúde.

2

O pico de incidência ocorre entre o segundo e terceiro anos de vida, sendo que 75% das crianças que desenvolvem a neoplasia têm menos de cinco anos. Pacientes com TW bilateral tendem a ser diagnosticados mais precocemente que aqueles com tumor unilateral, com média de 32 meses nos casos bilaterais e de 44 meses nos casos unilaterais, sendo a idade média geral de apresentação do tumor de 29,5 meses para os meninos e de 32,6 meses para as meninas (BRESLOW et al. 1996; DOME e COPPES 2002). Os resultados do primeiro estudo do Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento do Tumor de Wilms (GCBTTW) mostraram que a idade média de acometimento no país é um pouco maior, 36 meses para os meninos e 46 meses para as meninas. Aparentemente, existe um pequeno desvio de incidência para o sexo feminino (FRANCO et al. 1991).

Os registros do Hospital A.C. Camargo mostram que a frequência relativa de pacientes portadores de TW aumentou entre 1985 e 1989 e a mortalidade diminuiu entre 1980 e 1984, ambos mantendo-se constantes a partir desses anos com 76% de sobrevida livre de doença em cinco anos (DE CAMARGO 2003).

O tratamento do TW é sempre multidisciplinar, com cirurgia, quimioterapia e radioterapia em alguns casos selecionados. Até o momento, os fatores prognósticos considerados importantes para a decisão terapêutica são o estadiamento (Quadro 1) e o tipo histológico. Atualmente são curadas entre 76 e 90% das crianças e o objetivo atual é identificar marcadores de bom e mau prognóstico que permitam reduzir ou intensificar o tratamento,

3

respectivamente, diminuindo a morbidade dos tratamentos e aumentando as taxas de cura e sobrevida.

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

Quadro 1 – Estadiamento dos tumores de Wilms.

Os dois grandes grupos cooperativos que estudam TWs são o NWTSG (*National Wilms Tumor Study Group*) que preconiza a nefrectomia como opção de terapêutica inicial e administração da quimioterapia adjuvante, e a SIOP (*Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique*), cuja linha terapêutica aconselha a quimioterapia pré-operatória, por facilitar a cirurgia reduzindo o tamanho dos tumores, sendo este o regime adotado como modelo de tratamento no Brasil.

Os TWs podem apresentar até três componentes: blastematoso, epitelial e estromal. Essa heterogeneidade morfológica tem sido usada por alguns protocolos de tratamento como tendo significância prognóstica. Nesse caso, tumores mais diferenciados, com predomínio de componente epitelial e estromal, apresentam um melhor prognóstico, apesar de não serem quimiossensíveis. Esses tumores são menos agressivos e como não respondem bem à quimioterapia, não são elegíveis para tratamento com agentes mais tóxicos. O componente blastematoso é mais responsivo à quimioterapia, e em tumores tratados com quimioterapia pré-operatória, as áreas blastematosas são freqüentemente necróticas com poucas células reconhecíveis (WEIRICH et al. 2001). No entanto, seguindo o protocolo da SIOP, que adota a quimioterapia pré-operatória, se na peça tumoral houver predomínio do componente blastematoso após o tratamento, o tumor é considerado de alto risco, pois indica que o componente é resistente a quimioterapia.

Nos últimos anos, diversos trabalhos vêm buscando marcadores moleculares na tentativa de predizer o comportamento dos TWs, com pouco sucesso. Classificadores baseados em dados de microarray compostos por 50 genes obtiveram uma acurácia modesta para estratificação de TWs estadio III, com sensibilidade mediana de 47% e especificidade de 70%, para tumores que recaem e não recaem (HUANG et al. 2009). Outro estudo encontrou que, a despeito de praticamente todos os TWs serem positivos para tromboplastina, o aumento da sua expressão protéica foi associado com recaída tumoral. Como a maioria desses tumores foi tratada com quimioterapia prévia à cirurgia, não foi possível avaliar a influência do tratamento para a expressão de tromboplastina (MACIEL et al. 2009). Um trabalho desenvolvido no nosso laboratório avaliou amostras de TWs sem tratamento quimioterápico, homogêneas quanto às características clínicas e histopatológicas e identificou um trio de genes composto por TSPAN3, MPP2 e CDO1 capaz de classificar 68,7% das amostras que não recaem e todas as amostras que recaem após o tratamento (MASCHIETTO et al, em preparação). Apesar de esse estudo apresentar um índice de acerto relativamente alto, o trio de genes ainda precisa ser validado em outros grupos de amostras, e a busca de marcadores moleculares para identificar pacientes de alto e baixo risco ainda se faz necessária.

Alguns eventos histológicos e biológicos foram sugeridos como capazes de desencadear ou manter a tumorigênese do TW, entretanto as etapas desse mecanismo ainda são desconhecidas. Ainda é necessário ultrapassar um dos desafios atuais no estudo do TW, que tem sido entender sua tumorigênese, uma vez que esta mostra grande complexidade. Um melhor entendimento da patogênese do TW requer estudos que correlacionem os achados clínico-epidemiológicos, com seus aspectos histológicos e moleculares, pois existem evidências de que essas variáveis podem estar intimamente relacionadas (DOME e COPPES 2000).

1.2 TUMORES EMBRIONÁRIOS E EMBRIOGÊNESE: ASPECTOS COMUNS

Os tumores embrionários são neoplasias originárias de células primordiais que sofreram mutações espontâneas e não são decorrentes de mutações adquiridas por ação ambiental, como ocorre com a maior parte das neoplasias de adultos. Os tumores embrionários derivam de tecidos imaturos e possuem capacidade de diferenciação heteróloga resultando em uma aparência anátomo-patológica que lembra fases do desenvolvimento do tecido de origem (DEHNER 1998), um dos aspectos que diferenciam esses tumores dos tumores de adulto.

Já no século 19, Lobstein e Cohnheim foram os primeiros a sugerir semelhanças entre a embriogênese humana e a biologia das células tumorais (RATHER 1978). A recente idéia de que estudos moleculares de tumores embrionários sob uma perspectiva da sua correspondente embriogênese pode evidenciar eventos moleculares comuns a ambos os processos, o desenvolvimento e a tumorigênese, tem se tornado muito atrativa.

Alguns trabalhos desenvolvidos sob essa perspectiva em meduloblastomas (KHO et al. 2004; SCHÜLLER et al. 2006) revelam mecanismos comuns do desenvolvimento do órgão e do tumor. Em TW, diversos trabalhos, inclusive um de nosso grupo, identificaram uma assinatura gênica associada ao TW e ao desenvolvimento do rim, evidenciando mecanismos moleculares comuns dos dois processos (LI et al. 2002; LI et al. 2005; MASCHIETTO et al. 2008)

Os rins são formados pela interação recíproca entre células epiteliais e mesenquimais vindas do mesoderma intermediário. É uma formação contínua, com novos néfrons sendo adicionados nas camadas mais externas do córtex renal, onde as células mesenquimais indiferenciadas residem (SCHEDL 2007).

No momento da indução dada pelo broto uretérico, essas células seguem uma série de eventos morfogenéticos bem definidos. Primeiro, cerca de 20 células mesenquimais condensam-se, passam pela transição

7

mesênquima-epitélio (MET, do inglês, *mesenchymal epithelial transition*) e se diferenciam para agregados epiteliais, o blastema metanéfrico, em torno do broto uretérico, formando a vesícula renal. Essas células proliferam, cada vesícula renal se organiza na forma de "vírgula" e então forma o corpo "S". Este se alonga e se diferencia em diversos segmentos do néfron: os túbulos proximais e distais, a alça de Henle e o glomérulo (SAXÉN e SARIOLA 1987) (Figura 1).

Como consequência desse processo contínuo, néfrons mais primitivos são encontrados nas regiões mais externas do córtex enquanto que as estruturas mais maduras residem próximo à medula renal. O número de néfrons varia bastante entre indivíduos, de 300 mil até um milhão por rim (NYENGAARD et al. 1992). Em humanos, a nefrogênese é um processo que normalmente cessa na 36ª semana da gestação (HASTIE 1994), sendo essa idade específica nas diferentes espécies.



Legenda: A flecha vermelha indica a direção em que os eventos de formação do glomérulo acontecem B. Rim de embrião humano de 13 semanas de idade expondo as células mesenquimais, o blastema metanéfico em todas as suas etapas de diferenciação até a formação de glomérulos e C. Esquematização de um glomérulo, adaptado de http://embryology.med.unsw.edu.au/Notes/urogen7.htm, com legenda indicativa da morfologia das células dos diferentes túbulos. D. Rim humano mostrando túbulos e glomérulos completamente diferenciados.

Fonte: Adaptado de SCHEDL (2007).

Figura 1 - Etapas da formação do glomérulo durante a embriogênese do rim.

Dentre os tumores embrionários, os TWs são os que mostram melhor correlação morfológica com as fases do desenvolvimento embrionário. Aparentemente, os TWs nascem da persistência de células mesenquimais condensadas, o blastema metanéfrico, que normalmente já tenha começado a responder aos sinais indutivos de diferenciação vindos do broto uretérico resultando em tumores com grande similaridade estrutural com o desenvolvimento do rim (MIERAU et al. 1987). Consequentemente, a maioria dos TWs é do tipo trifásico, contendo uma mistura de células blastematosas indiferenciadas, estromais e epiteliais, presentes em proporções variáveis com diversidade de arranjo arquitetural e graus de diferenciação (BECKWITH 1983 e 1993). Esses dados sugerem que genes que participam da diferenciação das células renais desempenham uma função importante no TW.

Considerando que o TW é resultante da interrupção da diferenciação das células renais, avaliar esses tumores sob a perspectiva do desenvolvimento do rim possibilita a identificação de genes de sinalização celular cuja alteração leva à perda do controle da diferenciação renal.

1.3 VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL NA DIFERENCIAÇÃO

A comunicação entre as células é frequentemente mediada por moléculas secretadas que se ligam a receptores de superfície celular e modulam a atividade de efetores intracelulares específicos (KESTLER e KÜHL 2008). As vias intracelulares regulam propriedades das células como motilidade, adesão e divisão celular, além de funções bioquímicas especializadas (MARTÍN-BLANCO 1997). Os estudos de vias de transdução de sinal revelaram modelos interessantes da comunicação e principalmente da diferenciação e especialização celulares (NOSELLI e AGNÈS 1999).

1.3.1 Via de sinalização celular Wnt

A sinalização da via celular Wnt é implicada em numerosos aspectos do desenvolvimento e controla uma variedade de processos durante o desenvolvimento como especialização, proliferação, polaridade e migração celulares, sendo importante tanto durante a embriogênese quanto para a manutenção do tecido adulto. Uma interferência nessa sinalização pode resultar em defeitos do desenvolvimento e câncer (KESTLER e KÜHL 2008). Em vertebrados, 19 genes *WNT*s codificam para proteínas com um padrão de resíduos de cisteína conservado (TAKADA et al. 2006), que interagem com 10 membros de receptores transmembrana da família Frizzled (WODARZ e NUSSE 1998), além dos co-receptores LRPs (PINSON et al. 2000; TAMAI et al. 2000) e outros. Em conjunto, essas proteínas formam complexos que ativam respostas intracelulares específicas (CADIGAN e LIU 2006). Atualmente se considera que essa via é dividida em pelo menos três braços de sinalização celular: Wnt/β-catenina ou via canônica, Wnt/Cálcio e Wnt/JNK ou de polaridade planar celular (KESTLER e KÜHL 2008).

Estudos concentram esforços na compreensão do braço canônico da via Wnt (MORIN 1999; PEIFER e POLAKIS 2000), altamente conservado entre as espécies e que está mais claramente implicado nos processos de

transformação neoplásica. Recentemente, a associação da via Wnt/Cálcio com esses processos também tem se intensificado (TAMIMI et al. 2008; MASCHIETTO et al. 2008).

No braço canônico da via, infere-se que, ocorrendo a ativação da via Wnt durante a embriogênese, a β-catenina (*CTNNB1*) é impedida de ser degradada, sendo transportada para o núcleo, onde participa de complexos protéicos e regula a expressão de diversos genes.

Nas células em processo de diferenciação, a ligação de uma proteína Wnt ligante a um receptor Frizzled e ao co-receptor LRP leva à ativação de uma cascata que resulta na desmontagem do complexo de destruição, um processo que envolve as proteínas Dishevelled, CKIy e CKIE e resulta no acúmulo de β-catenina citoplasmática (PEIFER e POLAKIS 2000). Este é um processo altamente regulado que controla diversas funções durante o desenvolvimento como a sinalização de proliferação, adesão, diferenciação, morfologia celular apoptose (BRENNAN BROWN 2004). е е Subsequentemente, a β -catenina interage com fatores de transcrição da família TCF/LEF transformando o complexo de repressor para ativador da transcrição. Ao ser transportado para o núcleo, esse complexo interage com outras proteínas como BCL9, Groucho ou CtBP (LOGAN e NUSSE 2004; CLEVERS 2006) e regulam a transcrição de diversos genes, tais como o cMYC (HE et al. 1998) e CCND1 (TETSU e MCCORMICK 1999).

Nas células já diferenciadas, esse braço está desativado devido à ausência de uma proteína Wnt ligante, o que mantém a concentração de βcatenina citoplasmática baixa devido à sinalização do complexo de destruição formado por GSK3 β , AXIN1, APC e WTX (MORIN 1999, PEIFER e POLAKIS 2000; KIMELMAN e XU 2006). Ao se ligar ao complexo, a β catenina é fosforilada por CKI α e GSK3 β , que sinaliza para ubiquitinação e degradação via proteossomo (LIU et al. 2002). A fosforilação ocorre nos resíduos de serina e treonina localizados na porção amino-terminal (ABERLE et al. 1997). Os baixos níveis de β -catenina citoplasmática permitem que esta participe da adesão célula-célula, ligando-se à ϵ -caderina e outras proteínas do citoesqueleto.

Em alguns tumores existem evidências da reativação desse processo, onde a β-catenina passa a exercer um papel de fator de transcrição e o complexo volta a ativar a transcrição de genes que deveriam permanecer silenciados (WALTZER e BIENZ 1999; MOON et al. 2002). Alterações na regulação dessa via são reconhecidamente importantes no desenvolvimento de inúmeros tumores (SPARKS et al. 1998; MIYOSHI et al. 1998).

A sinalização da via Wnt independente de β-catenina é menos compreendida, parcialmente porque se sobrepõe com outras vias de sinalização celular. As proteínas Wnts envolvidas são a Wnt11 e Wnt5A (DEJMEK et al. 2006), que controlam a sinalização do cálcio intracelular e consequentemente, as enzimas sensíveis ao íon, como PKC (KINOSHITA et al. 2003; TU et al. 2007), CamKII (TOPOL et al. 2003; OUKO et al. 2004), além da fosfatase calcinerina que é capaz de ativar o fator de transcrição NFAT (DEJMEK et al. 2006).

A via Wnt/Cálcio parece também ter a função de suprimir a sinalização da via Wnt/β-catenina, através da ativação da proteína quinase

C dependente de calmodulina (CaMKII) e da quinase Nemo-like (NLK) (KÜHL 2004; LOGAN e NUSSE 2004; SEIFERT e MLODZIK 2007), através da fosforilação dos fatores de transcrição TCF (ISHITANI et al. 1999, 2003). Essa via também foi associada à formação de tumores (LIANG et al. 2003; KREMENEVSKAJA et al. 2005; TAMIMI et al. 2008).

O terceiro braço da via Wnt, a Wnt/JNK, regula a polaridade de células epiteliais orientando-as no contexto do tecido do qual fazem parte. Apesar de já ter sido demonstrado o papel desse braço da via em células de Drosophila (STRUTT 2003), o papel que tem em vertebrados foi descrito apenas durante a gastrulação e na migração das células da crista neural. Sabe-se que esse processo é ativado através do envolvimento das proteínas Wnt11 e Wnt5A (VEEMAN et al. 2003; MATSUI et al. 2005, DE CALISTO et al. 2005).

1.3.2 Transição Mesênquima-Epitélio e Epitélio-Mesênquima

Células epiteliais e mesenquimais representam os principais tipos celulares de mamíferos. Células epiteliais são caracterizadas por interações coesivas, diferenciação das membranas em apical, lateral e basal, polarização celular das organelas e citoesqueleto, ausência de motilidade entre outras. Células mesenquimais podem ou não interagir com outras células, são fusiformes sem distribuição polarizada de organelas e citoesqueleto e algumas células têm capacidade de se locomover e, às vezes, até de invadir. Durante o desenvolvimento, algumas células podem trocar de *status* epitelial para mesenquimal, o que é regulado por um

processo conhecido como transição epitélio-mesênquima (EMT, do inglês, *Epithelial-Mesenchymal Transition*). Em alguns casos, o EMT é reversível e a célula sofre a transição mesênquima-epitélio (MET) (LARUE e BELLACOSA 2005). O primeiro MET ocorre na pré-implantação do embrião com a formação do trofoderma, e o primeiro EMT é observado no desenvolvimento embrionário durante os movimentos de gastrulação e formação da mesoderme (SHOOK e KELLER 2003). No rim, as células mesenquimais são originárias do mesoderma intermediário, e passam pela MET dando origem às células epiteliais do blastema metanéfrico (SAXÉN e SARIOLA 1987).

Tanto EMT quanto MET são dependentes de ε -caderina (*CDH1*), sendo que a EMT é associada com a diminuição da sua expressão. Essa molécula de adesão célula-célula é uma glicoproteína transmembrana dependente de cálcio e presente na maioria das células epiteliais embrionárias e diferenciadas (LARUE e BELLACOSA 2005). A diminuição da função da ε -caderina na adesão celular marca o surgimento do processo EMT no qual as células epiteliais adotam um fenótipo fibroblasto-*like* e apresentam atividade invasiva (BOYER et al. 1993; THIERY e CHOPIN 1999). Nesse sentido, a perda de ε -caderina tem sido associada às mudanças moleculares observadas nas células neoplásicas metastáticas mais agressivas (THIERY 2003) sendo que a sua re-expressão foi observada durante a intravasão e a implantação das células metastáticas (KANG e MASSAGUE 2004; THIERY e MORGAN 2004).

15

A ε -caderina é regulada pela via de sinalização celular PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*). A família PI3K é constituída por enzimas que, quando ativadas, fosforilam lipídeos de inositol para gerar 3-fosfoinositóis, que apresentam papel de mensageiros secundários dentro dessa via. Muitas proteínas de sinalização são recrutadas especificamente por lipídeos fosforilados. Estas proteínas incluem quinases serina-treonina, proteínas de tirosina-quinase e fatores regulatórios das proteínas G. Essas proteínas são normalmente encontradas no citosol na forma inativa, mas quando localizadas na membrana se tornam ativadas e participam na montagem de complexos de sinalização e ativação de cascatas de quinase (BRADER e ECCLES 2004). Efetores de sinalização *downstream* a PI3K incluem membros da família AKT serina-treonina quinase (também conhecida como PKB) sendo que células com produção constitutiva de formas ativas de AKT também produzem o repressor transcricional SNAIL, conhecido por reprimir a expressão de ε -caderina (GRILLE et al. 2003).

Na membrana, a ε-caderina interage com a β-catenina formando um complexo associado à junção aderente das células epiteliais e ancorado ao citoesqueleto de actina (JAWHARI et al. 1999). Esta interação é fundamental para que ocorra uma adesão célula-célula eficiente (HIROHASHI e KANAI 2003) e quando esta é alterada ou perdida, as células tumorais podem adquirir capacidade invasiva.

A β-catenina tem, portanto, uma função dupla nesse processo: como membro da função aderente, ela é essencial na ligação das caderinas ao citoesqueleto, permitindo a adesão celular, e como membro da via de
sinalização Wnt, ao ser translocada para o núcleo, ela se liga aos fatores de transcrição TCF/LEF que dirigem a expressão de diversos genes e entre eles, alguns envolvidos na MET. Já foram descritas duas proteínas reguladas por esse complexo de transcrição como capazes de estimular a motilidade celular: o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e o fator de crescimento epitelial (EGF) (MULLER et al. 2002).

Entre os vários tipos de regulação da ε -caderina está a repressão transcricional regulada pelos repressores *SIP1* (*smad interacting protein 1*) (COMIJN et al. 2001), *SNAIL* e *SLUG* (BATLLE et al. 2000; HEMAVATHY et al. 2000; BOLOS et al. 2003), os quais se ligam às sequências E-box de seu promotor e diminuem sua expressão, o que afeta a adesão célula-célula e permite a invasão dos tecidos. Foi demonstrado que SNAIL tem um domínio semelhante ao da β -catenina e que esse domínio sinaliza fosforilação por GSK3 β . Portanto, a proteína GSK3 β é considerada um dos pontos de conexão dos dois processos - via de sinalização Wnt e processos EMT/MET (YOOK et al. 2005) (Figura 2).

Adicionalmente, como a expressão de ε-caderina é dependente de cálcio, a via de sinalização Wnt/Cálcio também pode estar envolvida com o processo EMT (GARRIOCK e KRIEG 2007).





Figura 2 - Esquema da via de transdução de sinal associada ao processo de MET/EMT, PI3K e WNT.

1.4 ASPECTOS MOLECULARES DA NEFROGÊNESE

Ao se aproximar das células mesenquimais vindas do mesoderma intermediário, o broto uretérico envia sinais para que essas células passem pela MET resultando em células blastematosas que se diferenciam nas células especializadas do rim (SCHEDL 2007).

O mesênquima metanéfrico é importante para o crescimento e engalhamento apropriado do ureter assim como a nefrogênese é

dependente dos sinais vindos do ureter. A esse processo, foram associados diversos genes pertencentes aos braços da via de sinalização celular Wnt, Wnt/β-catenina, Wnt/JNK e Wnt/Cálcio.

No rim, pelo menos cinco genes Wnts apresentam um padrão específico de expressão como *WNT2B* (LIN et al. 2001), *WNT11* (KISPERT et al. 1996), *WNT9B* (KARNER et al. 2009), *WNT6* (ITÄRANTA et al. 2006), *WNT4* (STARK et al. 1994). Wnt9B é fortemente expressa no tubo uretérico e análises de animais *knockout* para essa proteína mostraram que sua sinalização é essencial para a indução da nefrogênese e para a expressão de marcadores precoces da formação do néfron como *PAX8*, *FGF8*, *LIM1* e *WNT4*, uma vez que os animais não expressaram esses marcadores (PARK et al. 2007).

Apesar de cada proteína Wnt poder ativar diversas vias, existem evidências de que a Wnt9B age especificamente através da sinalização da via WNT/ β -catenina (IGLESIAS et al. 2007). Experimentos *in vitro* usando um inibidor de GSK3, necessário para a degradação de β -catenina, resulta na ativação do programa de diferenciação do néfron (KUURE et al. 2007).

A expressão de *CITED1*, um modificador transcricional que inibe a função de *CTNNB1*, bloqueia a conversão epitelial a partir do mesênquima metanéfrico (PLISOV et al. 2005). De fato, *CTNNB1* é necessário e suficiente para induzir a expressão dos marcadores nefrogênicos mais precoces.

Outra proteína dessa família, WNT4, quando ativada inicia a MET nas células mesenquimais renais. Camundongos *knockout* para *WNT4*

apresentam ausência quase completa de néfrons (KOBAYASHI et al. 2005; IGLESIAS et al. 2007), indicando que WNT4 é necessário e suficiente para induzir a nefrogênese. A ativação de WNT4 parece ser controlada por uma rede complexa de genes que incluem WT1 (SIM et al. 2002), PAX2 (TORBAN et al. 2006) e FGF8 (GRIESHAMMER et al. 2005; PERANTONI 2005). Enquanto que WNT9B age provavelmente através da via de sinalização canônica Wnt/β-catenina, a via ativada por WNT4 é menos clara. Experimentos com Xenopus laevis e zebrafish sugerem que WNT4 age através da via de polaridade planar celular (DU et al. 1995; UNGAR et al. 1995). Adicionalmente, a ativação constitutiva de CTNNB1 pode induzir os marcadores iniciais da formação do néfron, mas não resulta em uma transição completa do mesênquima para o epitélio (PARK et al. 2007). Isso pode indicar que, apesar da ativação da via de sinalização canônica Wnt/βcatenina ser importante para a indução do néfron, sua repressão possivelmente envolve um mecanismo de feedback que é igualmente necessário para que a nefrogênese ocorra.

1.5 O TUMOR DE WILMS – ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES

O rim pode apresentar diversas anormalidades de desenvolvimento, incluindo agenesia (ausência do rim), múltiplos ureteres, hipoplasia renal (tamanho reduzido do rim) e displasia (estruturas anormais, incluindo tumores), sendo que cada uma dessas correspondem a problemas em estágios específicos do seu desenvolvimento. Apesar de ser possível correlacionar anormalidades com estágios específicos do desenvolvimento, existe uma dificuldade muito grande em relacionar esses achados com genes específicos. Isso se deve ao fato de diversos genes participarem de várias fases durante o desenvolvimento, com funções dependentes do contexto (SCHEDL 2007).

Os TWs têm dois tipos distintos de histologia, com e sem elementos mesenquimais ectópicos, sugerindo que podem se originar em dois momentos da diferenciação celular durante a MET, resultando em tumores com predomínio de células mesenquimais ou epiteliais (nefrogênicas) (FUKUZAWA et al. 2009). Os TWs mostram morfologia bastante heterogênea com células indiferenciadas e epiteliais imaturas que lembram fases do desenvolvimento do rim, resultando em tumores classicamente trifásicos, nos quais as células blastematosas, estromais e epiteliais estão presentes (BECKWITH 1983 e 1993). Normalmente, um dos componentes é predominante, quando se apresenta em mais de dois terços (65%) da peça tumoral, sendo esse tumor designado como predominante desse componente.

O componente blastematoso é composto de células pequenas com núcleos irregulares e pequenos, citoplasma escasso, com numerosas figuras mitóticas, corpos apoptóticos e ocasionalmente aparecem rosetas como no neuroblastoma (BECKWITH et al. 1996). O padrão de crescimento pode ser do tipo difuso, serpentina, nodular ou basalóide. O tipo blastematoso difuso, ao contrário de outros subtipos de TW que não invadem a borda, tem um

padrão de crescimento infiltrativo resultando em poucos tumores classificados como sendo de estadio I, e mais de 75% deles como estadios III e IV (BECKWITH et al. 1996). Entretanto, como o blastema é mais responsivo à quimioterapia do que os outros componentes, em tumores tratados, as áreas blastematosas são frequentemente necróticas com poucas células reconhecíveis.

As células do componente epitelial são bem diferenciadas e consistem de túbulos lineados por células colunares com núcleos hipercromáticos, túbulos e estruturas glomerulares que lembram aquelas do rim normal. Epitélio mucinoso e escamoso, estruturas neurais e células neuroendócrinas também podem estar presentes (JENKINS et al. 1991). O componente estromal consiste principalmente de células fusiformes indiferenciadas imersas em matriz mixóide sendo que numerosas células mesenquimais ectópicas podem ser encontradas como células musculares lisas ou estriadas, adiposas, cartilaginosas, ósseas e osteóide (WIGGER 1996; SABA et al. 1998) (Figura 3).



Legenda: A. Rim embrionário humano de 21 semanas. B. Componente estromal: células mesenquimais com diferenciação rabdomioblástica, C. Componente epitelial: células organizadas em túbulos. D. Componente blastematoso. E. TW trifásico apresentando os três componentes.

Figura 3 – Morfologia do rim embrionário humano e do tumor de Wilms.

Os TWs podem ocorrer na presença ou não de restos nefrogênicos. Estes são células do blastema metanéfrico que persistiram após o nascimento (BECKWITH 1998) e são reconhecidos como possíveis lesões precursoras dos TW. Acredita-se que eventos genéticos adicionais são necessários para transformar essas células indiferenciadas e levar à formação massiva de tumores (SCHEDL 2007).

Conforme a localização morfológica, os restos nefrogênicos são divididos em perilobares e intralobares. Consistem de células blastematosas permeadas por elementos epiteliais e mesenquimais. Podem ser dormentes, esclerosantes ou hiperplásicos, sendo que todos esses tipos podem aparecer juntos. Eles são encontrados em até 1% de rins de recém-nascidos e sugere-se que sofram regressão ou terminem sua diferenciação ainda na infância. Os restos nefrogênicos que persistem podem regredir para um tecido fibroso ou evoluir para TW. São associados a aproximadamente 40% dos casos de TW esporádicos e a 100% dos pacientes com TW bilaterais (BECKWITH et al. 1990; BECKWITH 1993).

Apesar da semelhança morfológica entre as células embrionárias renais e as células do TW ter sido notada já na primeira descrição desse tumor por Carl Max Wilhelm Wilms em 1.899 e por diversos trabalhos posteriores (NICHOLSON 1931, WILLIS 1962 de HASTIE 1994), poucos genes foram associados com a nefrogênese e implicados na patogênese dos TWs (HASTIE 1994).

O *WT1* foi o primeiro gene envolvido na diferenciação renal e no aparecimento do TW por estudos independentes. É encontrado mutado em 5% a 10% dos TWs esporádicos (CALL et al. 1990; GESSLER et al. 1994, SCHUMACHER et al. 1997) e mutação germinativa predispõe a síndromes com má-formações do trato genito-urinário (HABER et al. 1990; GESSLER et al. 1992; DAVIES et al. 2004). Além do *WT1* ser necessário para a indução do rim, a proteína também tem um papel importante na formação do néfron e na diferenciação dos podócitos (DAVIES et al. 2004). Consequentemente, a perda da função do *WT1* durante o desenvolvimento do rim acarreta na provável retenção das células precursoras renais em um estado multipotente e seriam necessárias mutações adicionais em outros genes poderiam para transformar essas células.

Alterações germinativas de *IGF*2, localizado em 11p15.5, estão associadas à maior probabilidade de desenvolvimento de TW e a má-formações do trato genito-urinário, sendo considerado um dos genes

reguladores do desenvolvimento desse sistema (KREIDBERG et al. 1993; MROWKA e SCHEDL 2000). Esse gene, que codifica um fator de crescimento embrionário normalmente expresso pelo alelo paterno, é encontrado expresso em até 30% dos TWs (OGAWA et al. 1993; BJORNSSON et al. 2007). Esse aumento de expressão está associado à duplicação do alelo paterno ou à expressão do alelo materno que ocorre devido à perda do *imprinting* (RAINIER et al. 1993; DOME e COPPES 2002).

Outro gene com padrão de expressão semelhante nos TWs e no desenvolvimento renal é o *hTert*, que faz parte do complexo da telomerase. Aparentemente, *hTert* mostra padrões de expressão semelhantes no rim em desenvolvimento, nos restos nefrogênicos e em TWs, sugerindo que a persistência das células embrionárias pode levar à transformação maligna, provavelmente por existir uma falha na regulação dos genes envolvidos no complexo da telomerase, impedindo que as células dos restos nefrogênicos se diferenciem ou entrem em apoptose e, consequentemente, persistam após o nascimento (YASHIMA et al. 1998).

Apesar de não ter sido encontrada associação do *PAX2* com os TWs (TAMIMI et al. 2006), mesmo que *PAX2* seja essencial para o correto desenvolvimento do rim, a baixa expressão de *WNT5A*, um gene regulado por *PAX2*, em TWs de predomínio blastematoso em relação a rins fetais, sugere que pode haver um papel de ambos os genes com o desenvolvimento do rim e com o surgimento do TW (TAMIMI et al. 2008).

A grande maioria de tumores com mutação de WT1 também carregam mutações de CTNNB1. Essas mutações são normalmente

encontradas no códon 45, uma região de fosforilação de serina requerida para a degradação dessa proteína (MAITI et al. 2000; KUSAFUKA et al. 2002). A ausência da fosforilação leva ao acúmulo da β-catenina no núcleo, resultando em ativação de alvos transcricionais. Embora os genes-alvo responsáveis pela formação do tumor sejam desconhecidos, provavelmente induzem a proliferação de células precursoras, levando ao câncer.

O envolvimento da sinalização de CTNNB1 como uma via geral na formação do TW também é amparado pela descoberta recente do WTX, encontrado mutado em 10 a 30% dos TWs (RIVERA et al. 2007; HUFF et al. 2007; PEROTTI et al. 2008). O WTX forma um complexo com CTNNB1, AXINA1 e APC (KIMELMAN 2006), responsável por sequestrar a β-catenina do citoplasma, bloqueando sua atividade de regulação gênica e antagonizando a sinalização Wnt/β-catenina, enguanto que a inibição de WTX aumenta a atividade de β-catenina no núcleo. WTX age como regulador negativo da β-catenina e experimentos em Xenopus laevis e zebrafish mostraram que essa participação se dá na ubiquitinação da βcatenina (MAJOR et al. 2007). WTX é o primeiro gene supressor de tumor localizado em uma região que sofre inativação do cromossomo X. Assim, tanto homens quanto mulheres têm apenas uma cópia funcional desse gene, e como consequência, a mutação de um alelo (single hit) poderia ser suficiente para sua inativação. WTX sofre splicing alternativo e uma de suas variantes pode se translocar para o núcleo. Nessa localização, o WTX se liga ao WT1 aumentando sua atividade transcricional (RIVERA et al. 2009), indicando que esse gene tem um papel importante na embriogênese renal.

Recentemente, foi verificado que mutações de *WTX*, *WT1* e *CTNNB1* juntas correspondem no máximo a 30% dos TWs esporádicos (RUTESHOUSER et al. 2008), sugerindo que outros genes determinantes para o processo de tumorigênese de TW ainda não foram associados a essa patologia.

Além da descrição e caracterização de genes individuais envolvidos no TW, existe uma correlação estreita entre o padrão de expressão geral no tumor e no início da diferenciação normal do rim que fornece suporte à hipótese da recapitulação da nefrogênese normal pela morfologia. A comparação dos genes super-expressos no TW com os genes superexpressos em cinco estágios do desenvolvimento normal do rim (STUART et al. 2001) mostrou que o TW tem um padrão de expressão semelhante aos primeiros estágios do desenvolvimento do rim (LI et al. 2002; LI et al. 2005). Considerando que o tumor é composto por populações celulares numérica e morfologicamente distintas, o padrão de expressão do tumor como um todo tem um poder menor de refletir a relação entre o TW e o processo da nefrogênese. Em uma análise semelhante de padrão de expressão, mas com o cuidado de analisar os três componentes dos TWs em separado, foi identificado que, preferencialmente, o componente blastematoso, e não o tumor como um todo, apresenta o padrão de expressão mais semelhante aos primeiros estágios da nefrogênese, sugerindo que este componente apresenta a informação molecular que reflete a interrupção na diferenciação das células no tumor, conferindo, portanto, uma condição permissiva para seu aparecimento (MASCHIETTO et al. 2008).

Esse estudo levou à identificação de 25 genes supostamente envolvidos nos na diferenciação completa do rim e na tumorigênese de Wilms. Entre eles, APC e PLCG2, ambos pertencentes à via de sinalização Wnt parecem ter papel importante nos dois processos uma vez que mostram a recapitulação dos primeiros estágios de desenvolvimento do rim no tumor. No rim fetal de 11 semanas de idade, a localização de APC foi nuclear, passando para nuclear e citoplasmática no rim de 13 semanas de idade e exclusivamente citoplasmática nos rins de 17 semanas de idade até os rins completamente diferenciados. Nos TWs, APC mostrou positividade nuclear semelhante ao rim fetal de 11 semanas de idade. PLCG2 foi completamente negativo nos rins fetais até 18 semanas de idade, positivo em todas as células nos rins de 19 semanas até o rim diferenciado, sendo que este último também apresentou positividade muito forte em algumas células tubulares. Mais de 80% dos TWs foram negativos para PLCG2. Além de mostrarem a recapitulação dos primeiros estágios de desenvolvimento do rim no tumor, esses dados confirmam a ativação da via Wnt/β-catenina no tumor pela positividade nuclear de APC e da desregulação da Wnt/Cálcio pela ausência de expressão de PLCG2 (MASCHIETTO et al. 2008).

A ativação da via Wnt também foi mostrada em TWs com mutações concomitantes de *WT1* e *CTNNB1* (LI et al. 2004; ZIRN et al. 2006; FUKUZAWA et al. 2009) além daqueles tumores com mutações de *WTX*, que é um regulador negativo da via (MAJOR et al. 2007).

A via Wnt/β-catenina foi associada aos TWs de linhagem mesenquimal, ou seja, com predominância de componente estromal,

diferente dos TWs de linhagem nefrogênica, com predominância do componente blastematoso ou epitelial, que não mostrou ativação da via canônica. Apesar da histologia não ter sido inicialmente considerada, os dois grupos de tumores foram separados por mutações de *CTNNB1*, o que está diretamente relacionado com a histologia e com a via Wnt. Foram encontradas mutações de *WTX* nos dois grupos, sugerindo que talvez a via não esteja sendo regulada por esse gene em TWs (FUKUZAWA et al. 2009).

Em conjunto, esses dados mostram a importância da via de sinalização celular Wnt durante a embriogênese do rim e na formação do TW destacando genes que podem ser determinantes na gênese do tumor.

1.6 DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO PARA AVALIAR OS MECANISMOS COMUNS ENTRE A NEFROGÊNESE E O SURGIMENTO DO TW

Dados sugerem que a melhor compreensão da regulação dos genes das vias de sinalização celular Wnt e PI3K assim como os genes envolvidos em MET/EMT durante o desenvolvimento dos rins e nos TWs será importante para identificação de genes chaves envolvidos nos primeiros eventos da formação desses tumores (LI et al. 2002; LIANG et al. 2003, KANG e MASSAGUE 2004; THIERY e MORGAN 2004; KREMENEVSKAJA et al. 2005; LI et al. 2005; ZIRN et al. 2006; SCHEDL 2007; TAMIMI et al. 2008; KESTLER e KÜHL 2008; MASCHIETTO et al. 2008). Os mecanismos básicos que envolvem a formação dos TWs serão cada vez mais bem compreendidos quanto mais se conhecer as informações moleculares do desenvolvimento do rim. Da mesma forma, estudos dos genes regulados durante a nefrogênese e que recapitulam seus estágios mais iniciais nos tumores poderão contribuir para a identificação dos eventos precoces envolvidos com o aparecimento do tumor.

A melhor caracterização dos eventos moleculares da nefrogênese se dá pela análise detalhada dos diversos estágios do desenvolvimento do rim. No entanto, o uso de embriões humanos que represente esses estágios esbarra em aspectos éticos, sendo que a alternativa para a caracterização molecular detalhada dos estágios da nefrogênese seria a análise comparativa com dados de outros animais.

Uma das dificuldades encontrada nesse tipo de delineamento experimental, que permita analisar molecularmente os tumores e sua relação com a respectiva embriogênese, é a inexistência de um modelo validado que avalie o padrão de expressão de duas espécies em um único estudo. Para contornar essa problemática, KHO et al. (2004) fizeram a comparação do perfil de expressão gênica de meduloblastomas humanos, um tumor embrionário, e o desenvolvimento de cerebelo de camundongo, usando plataformas diferentes em que estavam imobilizadas sequências específicas para cada organismo e analisaram os genes ortólogos presentes em ambas as plataformas.

O nosso estudo teve uma proposta diferente, que foi o desenvolvimento de um modelo que permitisse a hibridação com sondas

oriundas de humanos e camundongos na mesma plataforma, gerando resultados confiáveis e robustos, independente da hibridação ser intra- ou inter-específica. Para tanto, foi construída uma plataforma de microarray na qual os trechos das seguências imobilizadas compartilham alto nível de similaridade entre genes ortólogos de camundongo e humano, permitindo a comparação dos dados de expressão entre diferentes estágios de desenvolvimento do rim em camundongo e em tumores humanos. A disponibilidade de sequências de diversas espécies em bancos de dados públicos tem permitido a identificação de genes ortólogos baseado na sequências transcritas (FERREIRA et similaridade de al. 2004). Especialmente entre camundongos e humanos, estudos genômicos comparativos mostraram altos níveis de similaridade na sequência de nucleotídeos em regiões codificantes (MAKALOWSKI et al. 1996).

Assim, para seleção dos trechos das sequências, foram estabelecidos critérios para que as sequências imobilizadas na lâmina apresentassem alto nível de similaridade entre os genes ortólogos das duas espécies. Para identificação das sequências ortólogas, as sequências de ORESTES imobilizadas em uma plataforma de cDNA *microarray* da instituição (4.8K002) foram alinhadas com as sequências de camundongo para estabelecimento dos parâmetros. Após a identificação das sequências ortólogas de camundongos baseados nos critérios de e-value⁻⁵, alinhamento mínimo de 50% e identidade de 87% da sequência alinhada, as hibridações foram avaliadas quanto à qualidade e replicabilidade dos experimentos com RNAs de tecidos de humanos e camundongos.

A análise de qualidade das hibridações foi avaliada através da correlação de Pearson que identificou que tanto os valores de hibridação intra- quanto inter-específica foram maiores do que 80%, indicando que ambas as hibridações são de alta qualidade e muito similares. A replicabilidade experimental foi verificada através da análise de *Levene* (CARROL et al. 1985) que compara a variância dos valores de intensidade de sinal entre os experimentos de camundongo e de humano. A análise de Levene mostrou que a hibridação interespecifica apresenta reprodutibilidade semelhante à hibridação intra-específica (TRAPÈ 2006).

Esses resultados permitiram o estabelecimento dos critérios para a construção de uma lâmina de *microarray* cujas sequências imobilizadas sejam ortólogas entre camundongos e humanos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar eventos moleculares precoces determinantes da formação do TW através da caracterização da expressão dos genes das vias de sinalização celular Wnt, PI3K e do processo MET/EMT nas várias etapas do desenvolvimento do rim e no tumor.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenho e construção da plataforma de cDNA *microarray* para hibridação com sondas de RNA humano e de camundongo;
- ➔ Ensaios de cDNA microarray;
- Validação dos dados encontrados por RT-PCR quantitativa e imunoistoquímica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COMITÊ DE ÉTICA

O trabalho foi submetido ao CONEP FR-82136, ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e ao Comitê de Ética em Uso de Animais – CEUA 006/2006, pertencentes à Fundação Antônio Prudente e foi aprovado por ambos os comitês.

3.2 CONSTRUÇÃO DA PLATAFORMA DE CUSTOMIZADA DE MICROARRAY

3.2.1 Seleção das sequências para imobilização na plataforma de microarray

Os genes foram selecionados a partir do banco de dados do KEGG release 36 (www.kegg.com). Foram selecionados 203 genes pertencentes à via Wnt, 110 genes pertencentes ao sistema de sinalização fosfatidilinositol (PI3K) e 90 genes citados na literatura como envolvidos com o processo EMT/MET totalizando 403 genes.

A sequências completas correspondentes aos 403 genes humanos foram alinhadas às respectivas sequências de camundongo, disponibilizadas pelos bancos de dados MGC (http://mgc.nci.nih.gov/), RefSeq (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/) e mRNAsHTCs – Unigene (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene). Para seleção da região de maior similaridade em nível de nucleotídeos, foram utilizados os parâmetros evalue⁻⁵ e alinhamento mínimo de 50% entre as sequências humana e murina, que foram estabelecidos em colaboração com o grupo do Dr. Sandro de Souza e fez parte do projeto de iniciação científica de Adriana Trapè. Os trechos das sequências dentro desses parâmetros foram considerados como representantes do gene humano e murino.

Esses trechos foram alinhados com o banco de ORESTES coordenado pelo Laboratório de Biologia Computacional do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer. Para os trechos não representados por ORESTES, foram desenhados oligonucleotídeos nas regiões de similaridade usando o programa Oligonucleotídeo *3* (http://www.basic.neu.edu/biotools/ Oligonucleotídeo3.html), seguindo os critérios: 1) os fragmentos estendidos por esses oligonucleotídeos deveriam ter no mínimo 100 bases, 2) conteúdo GC de 50 a 60%, 3) começar e terminar com G ou C, 4) apresentar 16 a 21 pares de bases, 5) temperatura de anelamento entre 58 e 68°C e 6) diferença em graus de temperatura entre os pares de oligonucleotídeos menor que 4°C. Os oligonucleotídeos foram avaliados no programa *OligoTech* versão 1.00 (Copyright[©] 1995) para identificação de estruturas secundárias e homodímeros (ausentes ou com temperatura de até 30°C).

3.2.2 PCR dos fragmentos para construção da plataforma

A síntese de cDNA a partir de RNA total de um *pool* de linhagens celulares humanas foi realizada com oligo-dT(15) e *Superscript* II segundo

as recomendações do fabricante. Previamente à realização da PCR, betaína 1M foi adicionada ao cDNA com incubação a 97 °C por 5 minutos para facilitar a desnaturação das fitas.

A reação padrão de PCR utilizou cDNA convertido de 10 ng de RNA total, 1X Tampão de Reação, 1,0 mM de MgCl₂, 1U de *Taq DNA Polymerase Recombinant* (kit Promega®), 0,2 mM de dNTPs e 400 mM de cada par de oligonucleotídeos em volume final de 25 μL. O programa padrão de amplificação dos fragmentos foi desnaturação inicial por 2 minutos a 94°C seguida de 40 ciclos a 94°C por 45 segundos, temperatura em *touchdown* (10 ciclos a 64°C, 10 ciclos a 62°C, 20 ciclos a 60°C) por 45 segundos e 72°C por 60 segundos, com uma fase de elongamento final a 72°C por 7 minutos. Algumas alterações foram introduzidas tanto nos reagentes quanto na ciclagem para os fragmentos que não amplificaram na reação padrão. Essas alterações incluíram a temperatura de alinhamento dos iniciadores (até 52°C) e a concentração de MgCl₂ (até 4 M), de oligonucleotídeos (até 1.600 mM) e de molde (até 40 ng).

3.2.3 Purificação dos fragmentos de PCR

Cinco µL da PCR foram avaliadas em gel de agarose 1% para verificação da amplificação da banda com tamanho esperado (Figura 4A). Estas reações tiveram o volume restante (20 µL) corrido em um segundo gel de agarose 1%, para retirada e purificação dos fragmentos.

A purificação dos fragmentos cortados do gel foi realizada utilizando o *kit* GFX^{TM} (Fermentas Life Sciences), conforme recomendações do fabricante.

3.2.4 Clonagem, PCR de colônia e sequenciamento

Para clonagem dos produtos purificados, 6,4 µL do eluído foram adicionados aos reagentes do kit Inst/A Clone (Fermentas Life Science), conforme recomendações do fabricante, resultando em volume de 10 µL. A reação foi submetida a 22°C por 16 horas e, em seguida, dialisada por 30 minutos em uma membrana filtrante Milipore mili-Q (0,025µm).

Quarenta µL de bactérias eletrocompetentes provenientes da linhagem ADH10B de *E. coli* foram adicionadas à 4 µl de ligação dialisada e seguiu-se a eletroporação (2,5 KV, 25 µFD e 200 OHMS). As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio de CG-ágar contendo ampicilina, X-Gal e IPTG, onde cresceram por cerca de 16 horas em estufa a 37°C. A PCR de duas a três colônias de cada placa foi realizada com Taq DNA Polymerase (Phoneutria Biotecnologia e Serviços LTDA), segundo recomendações do fabricante, e a amplificação do fragmento específico foi verificado em gel de agarose 1% (Figura 4A).

As reações que apresentaram fragmento de tamanho esperado foram sequenciadas no aparelho ABI 3130 (Applied Biosystems), usando o *kit* de sequenciamento BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) (Figura 4B). As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências correspondentes

de cada fragmento através da ferramenta *bl2seq* (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (Figura 4C e D).



Legenda: A. Gel de agarose 1% mostrando amplificação das bandas no tamanho esperado. Marcador de 100pb. B. Cromatograma de um fragmento do gene GATA3 purificado de gel de agarose. Alinhamento do fragmento com os genes humano (C) e murino (D).

Figura 4 – Confirmação da sequência amplificada para ser imobilizada na lâmina customizada.

As bactérias cujos clones tiveram suas sequências confirmadas foram estocadas em glicerol e armazenadas a -80°C.

Em média, 15x10⁻³ng de cada fragmento (em média) foram usados para montagem das lâminas de vidro Corning Gaps II (Corning) com o auxílio do robô *Flexys* (*Genome Solutions*, *UK*). Os fragmentos foram organizados em grupos de 48 *subarrays*, dispostos em quatro colunas com 12 fileiras cada um, e cada *subarray* com 49 *spots*, dispostos em sete colunas com sete fileiras cada um. As etapas de imobilização dos *amplicons* na lâmina de vidro foram realizadas sob coordenação do Dr. Alex Fiorini de Carvalho.

3.3 CASUÍSTICA

3.3.1 Amostras tumorais

Através de uma colaboração com o grupo americano de estudos de tumores pediátricos, o C*hildren Oncology Group* (*COG*) coordenado pelo Dr. Paul Grundy e Dr. Jeffrey Dome, 90 amostras de TW homogêneas quanto a tratamento cirúrgico e quimioterápico foram adquiridas, das quais 65 foram utilizadas para o presente projeto. São amostras que não apresentam tratamento quimioterápico prévio à cirurgia.

Das 65 amostras, 30 foram utilizadas para os experimentos de cDNA *microarray*, das quais 15 apresentaram recaída tumoral e 15 não apresentaram recaída tumoral pós-tratamento quimioterápico, todas de estádios avançados (III e IV) (Tabela 1A). Essas amostras foram denominadas de grupo inicial e usadas para identificar genes das vias de transdução de sinal possivelmente envolvidos com o surgimento do TW.

O segundo grupo, composto por 35 amostras, foi usado para validação dos genes obtidos das análises do grupo inicial. Essas amostras foram estadiadas de I a IV, sendo que 23 não apresentaram recaída e 12 apresentaram recaída tumoral após tratamento quimioterápico, todas com pelo menos oito anos de seguimento (Tabela 1B).

Amostras de 17 rins maduros humanos morfologicamente normais, bordas de TWs, foram retiradas do Banco de Tumores do Hospital A.C. Camargo. Dessas, quatro foram utilizadas para comparação com o grupo inicial de amostras de TWs e 13 amostras foram utilizadas como amostras independentes para validação dos dados.

Uma lâmina corada com hematoxilina-eosina permitiu a confirmação da presença das células do componente blastemotoso no caso dos TWs e de células blastematosas maduras, os podócitos, nos rins, e auxiliou a dissecção para enriquecimento e/ou microdissecção a *laser*.

Tabela	1A -	Informações	clínicas	para a	as 30	amostra	as de	TWs	que fo	ram
usadas	nos	experimentos	de cDN	A mic	roarra	y e na	valida	ção t	técnica	dos
dados e	encor	ntrados.								

Amostra	Recaída	Sexo	Estadia mento	ldade (meses)	Amostra	Recaída	Sexo	Estadia mento	ldade (meses)
BC1-1	Sim	М		14	BC1-16	não	F		24
BC1-2	Sim	М		52	BC1-17	não	F		45
BC1-3	Sim	F		58	BC1-18	não	F		170
BC1-4	Sim	М		75	BC1-19	sim	F	IV	29
BC1-5	Sim	F		100	BC1-20	sim	М	IV	48
BC1-6	Sim	F		34	BC1-21	sim	F	IV	62
BC1-7	Sim	М		69	BC1-22	sim	М	IV	64
BC1-8	Sim	F		38	BC1-23	sim	F	IV	57
BC1-9	Sim	F		48	BC1-24	sim	F	IV	129
BC1-10	Não	F		63	BC1-25	não	F	IV	71
BC1-11	Não	F		107	BC1-26	não	F	IV	69
BC1-12	Não	F		54	BC1-27	não	М	IV	44
BC1-13	Não	F	III	53	BC1-28	não	F	IV	48
BC1-14	Não	F		110	BC1-29	não	F	IV	.48
BC1-15	Não	М		39	BC1-30	não	F	IV	76

M: masculino, F: feminino.

Amostra	Recaída	Perda de Heterozi gose	Estadiamen to final	Amostra	Recaída	Perda de Heterozi gose	Estadiamen to final
P1060	não	1p-/16q-	IV	P1065	Não	1p-/16q-	
P1068	não	1p-/16q-	IV	P1144	Não	1p-/16q-	IV
P1070	não	1p-/16q-	IV	P178	Não	1p-/16q-	IV
P1088	não	1p+/16q-	111	P2050	Não	1p-/16q-	111
P1124	não	1p-/16q-	111	P2063	Não	1p-/16q-	
P1247	não	1p-/16q-	IV	P2081	Não	1p-/16q-	111
P1290	não	1p-/16q-	111	P002	Sim	1p-/16q-	
P2113	não	1p-/16q+	IV	P1104	Sim	1p+/16q-	I
P399	não	1p-/16q-	Ш	P1108	Sim	1p-/16q+	II
P4094	não	1p-/16q-		P128	Sim	1p-/16q-	
P4135	não	1p-/16q-	IV	P201	Sim	1p-/16q-	III
P4159	não	1p-/16q-	111	P219	Sim	1p-/16q-	111
P4181	não	1p+/16q-		P342	Sim	NA	IV
P4196	não	1p-/16q-	IV	P4057	Sim	1p+/16q+	
P4272	não	1p-/16q-		P420	Sim	1p-/16q+	III
P277	sim	1p-/16q-	II	P697	Sim	1p-/16q+	II
P001	Não	1p-/16q-		P970	Sim	1p-/16q+	III
P095	Não	1p-/16q-					

Tabela **1B** - Informações clínicas para as 35 amostras de TWs que foram usadas nos experimentos de validação independente.

NA: informação não disponível

Adicionalmente, um *pool* de RNA total de rins fetais normais obtidos de 34 fetos caucasianos feminino/masculino abortados espontaneamente com idades dentre 12 e 31 semanas foi comprado da Clontech.

Para a construção de um *tissue-microarray* (TMA), todas as amostras diagnosticadas como TWs e emblocadas em parafina do Departamento de Anatomia Patológica tiveram suas lâminas de hematoxilina-eosina reanalisadas pelo Prof. Dr. Fernando A. Soares. Apenas a região em que estava representado o componente blastematoso foi selecionada, resultando em 145 amostras. Foram também selecionadas 20 amostras de rim

diferenciado morfologicamente normal além de um painel contendo 19 amostras de rins de embriões humanos com idade entre 13 e 24 semanas. Estas últimas amostras foram obtidas através de uma colaboração com a Dra. Silvia Lourenço, da Faculdade de Odontologia da USP. As amostras de embriões humanos pertencem a um projeto desenvolvido pela pesquisadora com aprovação das comissões de ética da instituição. As 19 amostras estão divididas em 8 idades (semanas) sendo 1 embrião de 13 semanas, 1 embrião de 17 semanas, 1 embrião de 18 semanas, 3 embriões de 19 semanas, 1 embrião de 20 semanas, 7 embriões de 21 semanas, 3 embriões de 22 semanas e 2 embriões de 24 semanas.

3.3.2 Amostras de Rim de Camundongos

Foi utilizada a linhagem CD1 de *Mus musculus*, não isogênico. Os estágios do desenvolvimento do camundongo foram selecionados após revisão da literatura (11,5, 13,5, 15,5 e 17,5 dias pós-coito, recém-nascido e 1 semana após o nascimento, denominados de E11,5d, E13,5d, E15,5d, E17,5d, RN e SEM, respectivamente), baseando-se na embriologia do rim, sendo que o primeiro estágio estabelecido (11,5 dias pós-coito) refere-se ao início da formação do rim (10 dias pós-coito) enquanto que o último estágio (uma semana após o nascimento) foi selecionada porque a maturação das células do rim em camundongos termina no sétimo dia após o nascimento (SCHWAB et al. 2004; RIVERA e HABER 2005).

Os experimentos com camundongos foram realizados com o auxílio da Dra. Adriana Abalen Martins Dias. Para obtenção dos embriões foi

realizado o acasalamento entre machos e fêmeas e o cruzamento foi monitorado pela detecção do *plug* vaginal. No caso de ter havido acasalamento, meia-noite foi considerada a hora da fecundação do óvulo.

Os rins foram localizados nos animais de todas as idades com exceção do estágio de E11,5d. Essa idade foi excluída do estudo. Os rins foram isolados usando uma lupa de aumento de seis vezes. Dessa forma, obtivemos rins das idades E15,5d, E17,5d, RN e SEM (5 amostras de cada estágio) e não foi possível isolar os rins dos embriões de E13,5d.

Portanto, a nefrogênese normal em camundongos foi representada por quatro estágios: E15,5d, E17,5d, RN e SEM, nomeados nesse trabalho de 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

3.3.3 Referência Universal

Para os experimentos de hibridação competitiva, foi usado um *pool* de RNA de 15 linhagens cedido pela infraestrutura de *microarray* da Instituição. As 15 linhagens do *pool* são Daudi (linfoma de Burkitt), DLD-1 (adenocarcinoma de cólon), DU145 (carcinoma de próstata), FaDU (carcinoma epidermóide de faringe), GM637 (fibroblasto), H1080 (fibrossarcoma), H146 (carcinoma de pulmão), HB4α (célula luminal de mama), HEK293 (rim embrionário humano), Jurkat (leucemia aguda de células T), Saos-2 (osteossarcoma), SK-BR-3 (adenocarcinoma de mama), SK-MEL-28 (melanoma), T24 (carcinoma de bexiga) e T98G (glioblastoma).

3.4 ENRIQUECIMENTO DAS AMOSTRAS

3.4.1 Preparação das amostras para microdissecção a laser

Cortes histológicos de 0,4 µm foram realizados em condições de baixa temperatura (de 20 a 25°C negativos) para fins de preservação da integridade do RNA total. Foram coletadas de 15 lâminas de cada amostra. As primeiras e últimas lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina para confirmação da presença das células de interesse. As demais lâminas foram mantidas a -80°C.

No momento da microdissecção, pelo menos duas lâminas foram coradas seguindo as seguintes etapas: 1) Imersão da lâmina em etanol 75% por 30 segundos para fixação do tecido, 2) Imersão da lâmina em água nuclease-free (Sigma) por até 30 segundos para hidratação, 3) Hematoxilina por 30 segundos, 4) Reagente *blue* (aproximadamente 1ml de hidróxido de amônio em 50ml de água nuclease-*free* (SIGMA) por 30 segundos, 5) Eosina por 30 segundos para coloração da lâmina, 6) Etanol 75% por 30 segundos, 7) Etanol 95% por 30 segundos e 8) Etanol 100% por 2 minutos para desidratação, 9) Imersão da lâmina em xilol por 5 minutos para diafanização e 10) Secagem a temperatura ambiente.

3.4.2 Microdissecção a laser

Tanto a análise histológica quanto a microdissecção a *laser* foram realizadas pela Dra. Renata Coudri do Departamento de Anatomia Patológica. O aparelho utilizado foi o *Pixcell Laser Capture Microdissection*

System (*Arcturus Systems for Microgenomics*), que permitiu a captura apenas das células de interesse do estudo (Figura 5).



Legenda: A. Lâmina com um corte de 4 µm mostrando células estromais e blastematosas. B. Lâmina durante o procedimento. C. Células selecionadas já aderidas ao *cap*. D. Lâmina mostrando região de onde as células foram capturadas.

Figura 5 - Microdissecção a *laser* de células do componente blastematoso do TW.

O diâmetro do feixe de raios *laser* foi ajustado para 15 µm para as amostras tumorais e 7,5 µm para as amostras de embriões. Desta forma, a cada disparo foi possível coletar de uma a duas células por tiro. O tempo de captura estabelecido para obtenção de RNA sem prejuízo de sua integridade variou de 10 a 20 minutos.

3.4.3 Dissecção do componente blastematoso

Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina dos TWs foram usados para avaliação das proporções de cada componente e a dissecção manual garantiu uma representação de pelo menos 80% de componente blastematoso.

3.5 EXTRAÇÃO DE RNA

Para as amostras microdissecadas a *laser*, a extração de RNA foi realizada utilizando o *kit PicoPureTM RNA Isolation* (ARCTURUS #KT0204), conforme recomendações do fabricante. Para o restante das amostras, o RNA total foi extraído através de TRIzol (Sigma) segundo as recomendações do fabricante.

A concentração e a qualidade do RNA foram medidas usando o Nanodrop (Thermo Scientific) e o Bioanalyzer, respectivamente.

Para a avaliação da qualidade de RNA no Bioanalyzer, 1 µL (máximo de 80 ng) do eluído de RNA total de cada amostra é usado em um *chip* próprio para a corrida. O programa gera duas imagens, uma correspondente a um gel de agarose e a outra referente a um eletroesferograma que reflete a qualidade do RNA. Conforme o resultado do eletroesferograma, é atribuído um valor de qualidade (RIN – RNA integrity number) que varia de 1 (qualidade ruim) a 10 (excelente qualidade) (SCHROEDER et al. 2006). A imagem semelhante ao gel de agarose mostra as bandas 28 e 18S, permitindo uma avaliação de qualidade também de forma visual.

3.6 AMPLIFICAÇÃO DO RNA MENSAGEIRO

Foram usados dois protocolos de amplificação. O protocolo usado para amplificação da amostra referência, baseia-se na amplificação guiada pela T7-RNA polimerase e iniciador *Template Switch* (TS) (WANG et al. 2000; GOMES et al. 2003). Resumidamente, o cDNA é sintetizado a partir do RNA total, utilizando-se oligonucleotídeos que ancoram na cauda poli-A dos RNA mensageiros e possuem sítio para RNA polimerase II. Para uma produção exponencial de RNA, este cDNA é submetido à transcrição *in vitro* em dois *rounds* de amplificação.

Para as amostras microdissecadas a *laser*, utilizou-se o *kit RiboAmp*TM *RNA amplification* (ARCTURUS # KIT0201) para as amostras humanas, conforme recomendações do fabricante. Para as amostras de rins fetais de camundongos, como a quantidade de células capturadas foi muito baixa, principalmente nos embriões mais jovens (~400 células), foi usado o *kit RiboAmp*TM *HS Plus* (ARCTURUS # KIT0505), apropriado para baixas quantidades de RNA total (extraído de até 500 células).

3.7 EXPERIMENTOS DE MICROARRAY

3.7.1 Desenho Experimental

Para esse estudo, foi utilizada a hibridação competitiva. Nesse caso, as hibridações são feitas utilizando uma amostra-referência, comum a todas as hibridações, marcada com um corante fluorescente distinto da amostrateste, que se refere às amostras de interesse do estudo. As amostras teste e referência são misturadas e hibridadas em uma mesma lâmina. Como a hibridação é competitiva, os valores de fluorescência obtidos revelam níveis relativos de expressão de cada transcrito na amostra-teste comparada com a amostra-referência. Dessa forma, o uso da amostra-referência possibilita comparações de experimentos independentes (NOVORADOVSKAYA et al. 2004).

Todas as amostras, humanas e de camundongo, foram hibridadas com o RNA amplificado de uma mesma amostra referência, e foram citadas ao longo da tese como hibridações intra-específicas (RNA humano *versus* plataforma de cDNA humano) e inter-específicas (RNA camundongo *versus* plataforma de cDNA humano).

O sistema usado foi o *dye-swap*, que consiste na hibridação de uma amostra duas vezes, usando a inversão de fluoróforos. Essa inversão é realizada para minimizar erros decorrentes das propriedades específicas de cada cianina (Cy3 e Cy5) que apresentam eficiências de incorporação distintas na síntese do cDNA a partir do RNA.

3.7.2 Marcação e Hibridação

Seis µg de RNA amplificado de amostra teste ou 4 µg de RNA amplificado de referência foram misturados com 9,0 µg de oligonucleotídeo randômico (dN6) e 1,0µL de RNA *mix* controle em volume de 15,9 µL. O cDNA marcado foi sintetizado usando *SuperScript* II, segundo recomendações do fabricante, 10mM dCTP e 25mM dos demais

desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP e dGTP), 2,0 μ L de cianina (Cy3 ou Cy5), em volume final de 30 μ L. A reação foi mantida por 2 horas a 42° C.

Posteriormente, a reação foi inativada com a adição de 1,5 µL 0,5M EDTA e 1,5 µL 1 M NaOH a 70°C por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,5 µL 1M HCI para neutralização e purificação em coluna Autoseq G50 (Amersham Biosciences).

Para a hibridação, as reações de cDNAs Cy3 e Cy5 purificadas foram misturadas a 4 µg poly-A DNA (*Amersham Biosciences*), 4 µg *Cot1* DNA (*Invitrogen*), 20 µg BSA. Após redução do volume em *speed-vac*, foram adicionados 50 µL de tampão de hibridação pré-aquecido a 70°C, 25 µL de formamida deionizada, 9,5 µL 50X solução *Denhardt* s e 10 µg esperma de salmão e mantidos sob agitação a 45°C. A lâmina customizada foi lavada com água deionizada, após pré-hibridação por 6 horas a 42°C em tampão contendo 5X SSC; 0,2% SDS; 1% BSA e solução 5X *Denhardt* s.

As amostras teste e referência misturadas foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e hibridadas na plataforma em uma câmara mantida sob agitação a 42°C por 16 horas.

Posteriormente à hibridação, as lâminas foram lavadas com tampões pré-aquecidos a 42°C, sendo uma vez com tampão 2X SSC por 15 minutos, duas vezes 0,1X SSC, 0,1% SDS por 15 minutos, e por fim, duas vezes 0,1X SSC por 15 minutos. Para secagem, as lâminas foram centrifugadas por 2 minutos a 1.000 rpm, e em seguida, submetidas à digitalização de imagens.

Os sinais gerados foram capturados pelo ScanArray Express (Perkin Elmer Life Sciences, Inc., EUA), um scanner a laser confocal com canal duplo. A leitura dos fluoróforos é separada e a composição da imagem realizada pelo programa. Os valores de fluorescência obtidos correspondem à expressão de cada transcrito na amostra-teste e na amostra-referência.

3.7.3 Pré-análise das lâminas hibridadas

Após a captura de sinal, os dados são submetidos às pré-análises para verificação da qualidade das lâminas, segundo critérios estabelecidos pela Dra. Helena Brentani, do Laboratório de Biotecnologia do Hospital A.C. Camargo.

Foram eliminados os pontos da lâmina que apresentaram emissão de fluorescência igual ou menor (*outliers*) que o sinal emitido pelo ruído (*background*). Para esse cálculo, foi usado o valor de intensidade do *background* e o desvio-padrão calculado a partir da fluorescência emitida por cada *spot*. Esses valores são usados para gerar uma distribuição normal com *cut-off* de 95% (subtração local). Foram eliminados também os pontos que apresentaram saturação de hibridação, sendo esse dado baseado numa emissão de sinal maior ou igual a 63.000 (sendo 65.550 = 16 BIT). Nesse caso, o excesso de material hibridado gera um sinal muito intenso que supera a capacidade do detector de medir a intensidade proporcional de fluorescência, invalidando a quantificação.

3.8 ENSAIOS DE RT-PCR QUANTITATIVO (QRT-PCR)

3.8.1 Síntese de cDNA

As amostras utilizadas nos experimentos de cDNA *microarray* foram microdissecadas a *laser*, e como consequência, havia a disponibilidade apenas de RNA amplificado para uso nos experimentos de validação técnica. Nesse sentido, foi desenvolvido um trabalho no laboratório para avaliar a reprodutibilidade e a acurácia da expressão relativa gerada por cDNA convertido a partir de RNA total e de RNA amplificado através da metodologia de qRT-PCR. As medidas relativas de 34 genes geradas pelos dois tipos de cDNAs foram comparadas entre duas amostras e avaliadas quanto à diferença de expressão gênica e à variabilidade intra-experimental. Esses dados mostraram que o uso de cDNA convertido a partir de RNA amplificado serverimental. (FERREIRA et al. 2009).

Para síntese de cDNA a partir de RNA amplificado, 9 ng de iniciadores Oligo-dT(15) foram adicionado a 1 μ g de RNA amplificado, aquecidos por 70°C por 5 minutos seguidos de 4°C por mais 5 minutos e adicionados os reagentes do *kit* "*SuperscriptTM III*" em volume de 20 μ L, conforme recomendações do fabricante.

A síntese de cDNA a partir de RNA total seguiu o protocolo da IMPROM (Promega). A 2 µg de RNA total, foram acrescidos 0,25 µg de

oligo-dT(15), aquecidos a 70°C por 5 minutos seguidos de 4°C por mais 5 minutos, conforme recomendações do fabricante.

3.8.2 Padronização das Reações para qRT-PCR

As reações foram realizadas no aparelho *ABI Prism*® 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) em volume final de 20 µl, contendo 1X SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 400 nM a 1.600 nM de oligonucleotídeos e cDNA convertido a partir de 12 ng de RNA total. As reações foram realizadas nas condições universais de ciclagem que consiste em 10 minutos a 95°C para a ativação da enzima AmpliTaq Gold DNA Polymerase, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos e um minuto a 60 °C para o pareamento dos iniciadores e extensão. Ao final da amplificação foi adicionada uma etapa de 20 minutos de duração, na qual a temperatura aumenta gradualmente de 60 °C para 95 °C a 0,2 °C por segundo com a contínua aquisição da fluorescência (MORRISON et al. 1998), a partir da qual se obtém uma curva de dissociação, na qual a presença de um pico único confirma a especificidade da amplificação. As reações foram realizadas em placas de 96 poços -MicroAmp® Optical (Applied Biosystems).

Uma vez que a cada ciclo da reação novas moléculas de fita dupla são formadas, o nível de fluorescência emitida aumenta gradualmente, sendo que quanto menor o ciclo em que a fluorescência atinge um determinado limite, maior é o nível de expressão do transcrito analisado (MORRISON et al. 1998). O parâmetro utilizado é o Ct (*Cycle Threshold* ou
ciclo limite), uma linha aleatória fixa na região exponencial das reações e usada para determinar o ciclo em que cada amostra atinge determinado valor de fluorescência (LIVAK et al. 2001). As reações, realizadas em duplicada, aceitaram valores de desvio padrão até 0,6 e foram repetidas quando ultrapassaram esse valor.

oligonucleotídeos foram desenhados usando o Os programa OligoTech versão 1.0 em exons diferentes, a fim de evitar resultados artefatuais referentes à contaminação genômica. Foram seguidas as recomendações sugeridas pelo fabricante (Applied Biosystems), como temperatura de anelamento entre 60°C e 70°C, 40 a 60% de conteúdo GC, tamanho do oligonucleotídeo entre 16 e 20 bases, tamanho de fragmento amplificado entre 80 e 150 bases. O alinhamento único no genoma humano para cada par de oligonucleotídeos foi avaliado através da ferramenta PCR silico disponibilizada Universidade in pela Santa Cruz (http://genome.ucsc.edu/). oligonucleotídeos, Os assim como suas sequências, estão representados no Tabela 2.

53

Tabela	2	 Sequências 	dos	oligonucleotídeos	utilizados,	com	seus
respecti	vos	tamanhos de ar	nplific	ados e eficiência de	amplificaçã	0.	

Genes	Primer Forward 5´-3´	Primer Reverse 5´-3´	cDNA amplificado (pb)	Amplificado genômico (pb)	Eficiência
ACTB	CAGGATGCAGAAGGAG	CTGCTGGAAGGTGGAC	130	187	100%
GAPDH	CTTTGTCAAGCTCATTTCC	CTTACTCCTTGGAGGCC	92	196	100%
SHPK	CCTTGGGTGATTTACAG	GAATCCTGAAGGCATGG	110	5.809	100%
CDH6	CTGTTGACAAGGATGACC	GGTGCTCATCTCGTGTC	158	338	100%
CRABP 2	GGTGAAATGGGAGAGTG	CGTAGACCCTGGTGCAC	152	617	100%
FRZB	GTGGAAGGATCGACTCG	GAGTTCCTGCCAGACTTC	124	3.107	120%
HDGF	GCTACCAAGGAAGATGCTG	GACAGCAGCAGGAACAGG	100	296	100%
HIPK1	GACCAGTGCAGCACAAC	GCTGGGTTGCTGCTTC	87	1.156	106%
IGF2	CTGGAGACGTACTGTGC	GCTTCCAGGTGTCATATTG	114	417	100%
ITPR3	CAACTCCACCATGAAGCTG	GTTCTGGACATCCACAAAGC	61	741	106%
PAX2	CACTCTGCCTGGTTACC	GTGGCTGTACGGGTTG	115	2.374	100%
PIK3CA	GTGATTAGTAAAGGAGCCC	GAGATTGGCATGCTGTCG	105	3.822	96%
TESK1	CCTTCACCGAAATTACCCA	GGAAGCGTGGCAGAGG	130	482	100%
TIMP3	CTGAACTATCGGTATCACC	CTCGTTCTTGGAAGTCAC	84	1.125	100%
WNT5B	CTCATGAACCTGCACAAC	CTACATGAGCCGGACAC	95	3.881	100%
IGF1R	TGTCCAACGAGCAAGTCCT	GTTATACTGCCAGCACATG	110	8.462	99%
LRP1	GCCTGATGATGTGGGAG	GCTTCTCGTCCGTGCTG	143	296	117%
PIK3C3	CAGTGGTGGAACAGATTC	CCTTGCTGGTTACTCTG	141	13.750	103%
PPP2R 1A	CATCCTAGAGAAGCTGACC	GAGGCCAGTGTTTGCTC	113	269	100%
WNT3	CATCTTCCACTGGTGCTG	CATGAGACTTCGCTGAATC	134	4.179	100%
SFRP2	CATAATGGAAACGCTTTG	CCTGTTTCTGTCCCATG	244	4.352	98%

Para cada par de oligonucleotídeos foram testadas diferentes concentrações (1.600 nM, 1.200 nM, 800 nM e 400 nM), sendo as quantidades ideais padronizadas individualmente. Considerou-se a utilização da menor concentração de oligonucleotídeos, a fim de se evitar a formação de estruturas secundárias devido ao seu excesso obtendo-se os menores valores de Cts.

Obtidas as concentrações ideais dos oligonucleotídeos, a eficiência para cada par foi calculada usando cinco diluições seriadas de cDNA convertido de RNA total (50ng, 5ng, 0,5ng, 0,05ng e 0,005ng), como descrito

nos protocolos da *Applied Biosystems*. A partir dos resultados, um gráfico relaciona os Cts com o valor das quantidades de cDNA em logaritmo de base 10. O valor correspondente ao coeficiente angular (*slope*) da equação da reta da curva padrão (y = $\underline{a}x$ + b, \underline{a} = slope) é utilizado para cálculo da eficiência da reação (Tabela):

Para identificar o gene normalizador mais estável no grupo de amostras utilizada no estudo, foram avaliados cinco genes endógenos, *GAPDH, ACTB, HuPO, HPRT1* e *BCR*, através da ferramenta *geNorm* (VANDESOMPELE et al. 2002). O programa calcula uma medida de estabilidade gênica para os genes testados em um determinado grupo de amostras e indica quais os genes mais estáveis para serem utilizados como normalizadores. A estabilidade é determinada partindo-se do princípio de que dois genes normalizadores ideais possuem razões de expressão semelhantes em todas as amostras analisadas, independente dos tipos celulares. A análise do *geNorm* identificou os genes *ACTB* e *GAPDH* como mais estáveis, sendo a média usada para o cálculo da medida relativa.

O uso da amostra calibradora, que é uma amostra comum utilizada em todas as placas, permite a comparação de duas reações independentes para um mesmo gene. Essa amostra é utilizada quando o número de amostras avaliadas é superior ao número de amostras que cabem em uma placa e no caso de haver necessidade de repetições de amostras que eventualmente apresentaram duplicatas ruins (desvio padrão maior do que 0,6). A expressão diferencial dos transcritos alvo foi determinada pela quantificação relativa em relação à média de *GAPDH* e *ACTB*. Para cálculo da medida relativa de expressão foi utilizado o modelo matemático proposto por PFAFFL (2001) que leva em consideração a eficiência de amplificação de cada par de oligonucleotídeos.

3.9 CONSTRUÇÃO DO TISSUE-MICROARRAY (TMA)

O TMA foi construído utilizando o aparelho *Tissue Arrayer* 1 (*Beencher Instruments Microarray Technology, Silver Spring, USA*). As áreas selecionadas foram identificadas no bloco de parafina e puncionadas com agulha de um mm. Os cilindros obtidos foram transferidos para um novo bloco de parafina receptor em posição bidimensional determinada e gravada pelo equipamento segundo um mapa com identificação de cada cilindro que permite a localização exata de cada caso. O bloco de TMA foi cortado no micrótomo rotativo na espessura de 3 µm e colhidos em lâminas adesivas da *Instrumedics (Hackensack NJ, EUA*). Para confirmação da representação das amostras, a primeira e a última lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (Figura 6).



Legenda: A. Tissue-microarray. B. spot que contém quase que apenas componente blastematoso. C. spot representante de rim maduro. D. Em azul, área do rim embrionário – córtex renal - avaliada para marcação das proteínas por imunoistoquímica. Rim de embrião de 13 semanas no detalhe.

Figura 6 - Representação das amostras no TMA e do rim embrionário corados por hematoxilina-eosina.

3.10 IMUNOISTOQUÍMICA

As reações de imunoistoquimica foram realizadas usando o sistema de visualização com polímero (Advance HRP, K4068, DAKO). Os cortes foram desparafinizados em Xilol (três trocas de 5 minutos cada) à temperatura ambiente, passados em álcool com concentrações decrescentes (100%, 90%, 70%, 50%) e posteriormente lavados em água corrente por 5 minutos.

A recuperação antigênica foi realizada por calor utilizando-se o banhomaria ou a câmara de pressão (PASCAL) conforme protocolo e diluição padronizado para cada anticorpo (Tabela 3).

Anticorpo	Catálogo	Marca	Clone	Animal	Diluição	Recuperação
CRABP2	MAB5488	Chemicon	policlonal	camundongo	1/2000	Pascal/CT/pH6,0
FZD2	AB26396	Abcam	policlonal	coelho	1/2000	BM/EDTA- TRIS/pH9.0
GRK7	AP7731b	Abgent	policlonal	coelho	1/100	Pascal/CT/pH6,0
HDGF	AB58644	Abcam	26C4a	camundongo	1/100	Pascal/CT/pH6,0
IGF2	LS- C7512	Lifespan	policlonal	coelho	1/2000	Pascal/CT/pH6,0
TESK1	AP7820b	Abgent	policlonal	coelho	1/200	Pascal/CT/pH6,0
TIMP3	AB49670	Abcam	18D12b	camundongo	1/100	BM/EDTA/pH8,0
WNT5B	LS- A8730	Lifespan	policlonal	coelho	1/400	Pascal/CT/pH6,0

Tabela 3 - anticorpos selecionados para validação.

BM: banho-maria, CT: Citrado (ácido cítrico)

Após a recuperação antigênica, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (três trocas de 5 minutos cada), seguida de lavagem em água corrente e bloqueio de proteínas (Protein Block Serum-Free, DAKO) por 20 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida.

O anticorpo primário foi incubado por 2 horas em câmara úmida à temperatura ambiente. Após lavagens em PBS (três trocas de 5 minutos cada), as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário (*Advance HRP link, DAKO*) por 30 minutos à temperatura ambiente, seguido por três

lavagens de 5 minutos em PBS e incubação com o polímero (*Advance HRP Enzyme, DAKO*) por 30 minutos à temperatura ambiente.

A solução de Diaminobenzidina (*Liquid DAB* + *Substrate Chromogen System, DAKO*) foi utilizada para revelação da reação com incubação de 5 minutos, e contra-coloração com Hematoxilina de Harris (MERCK) por 2 minutos, com lavagem em água corrente, desidratação em álcool, passagem em xilol e montagem com filme (*Tissue-Tek Film, Sakura*).

As reações foram acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para cada anticorpo e dois controles negativos. O primeiro deles pelo não uso do anticorpo primário e o segundo através da retirada do anticorpo secundário.

As localizações esperadas das proteínas selecionadas estão descritas no Quadro 2.

Proteína	Localização
HDGF	citoplasma e núcleo
TIMP3	citoplasma, membrana e matriz extracelular
IGF2	citoplasma e matriz extracelular
WNT5B	citoplasma, membrana e matriz extracelular
FZD2	membrana
TESK1	citoplasma
GRK7	membrana
CRABP2	citoplasma, membrana e núcleo

Quadro 2 - Genes selecionados para validação por imunoistoquímica e localização esperada da proteína.

No TMA construído para o projeto, foram analisadas as amostras tumorais e as amostras de rins maduros. Devido à heterogeneidade da

morfologia renal, para o painel de rins fetais o rim inteiro foi cortado em uma lâmina e apenas a região cortical foi avaliada.

3.11 ANÁLISES MATEMÁTICAS E ESTATÍSTICAS

3.11.1 cDNA *Microarray*

A regulação dos genes pertencentes às vias de interesse do estudo foi avaliada durante o desenvolvimento embrionário do rim e nas amostras de TWs, ambas em relação ao rim diferenciado.

Para identificação dos genes diferencialmente expressos entre TW e RD, foi utilizado o teste t de *student* e foram considerados significativos aqueles que obtiveram pvalor < 0,05.

A análise dos aspectos funcionais dos genes diferencialmente expressos foi feita usando a ferramenta WebGestalt (ZHANG et al. 2005), e os genes foram anotados de acordo com os bancos de dados disponibilizados pela ferramenta e usados para identificação dos grupos relevantes. A representação dos processos biológicos, funções moleculares de localizações celulares foi avaliada usando o banco do *Gene Onthology Consorciun Anottation*, a distribuição dos genes nos cromossomos foi baseada nos bancos de dados de anotação do genoma UCSC e para os domínios protéicos foi usado o banco PFAM. Para todas as análises, o teste hipergeométrico selecionou o enriquecimento de determinada classe (processo biológico, função molecular ou componente celular), sendo significantes aquelas classes com pvalor <0,05 e com pelo menos dois genes representados.

Para identificação dos genes modulados durante a nefrogênese em camundongos, o comportamento dos genes foi avaliado nos quatro estágios da nefrogênese pelo grupo do Dr. Eduardo J. Neves (IME/USP). Para cada estágio de rim embrionário, os valores médios de expressão entre as replicatas biológicas e experimentais foram plotados em um gráfico para visualização da expressão de cada gene ao longo dos quatro estágios de diferenciação normal do rim.

Para clusterização hierárquica não supervisionada foi usada a correlação de Pearson e *complete linkage* que discrimina as amostras baseada no perfil de expressão. A confiabilidade dessa discriminação foi verificada pela técnica de *Bootstrap*. Essas análises foram feitas no programa TMEV versão 4.1.

3.11.2 RT-PCR Quantitativo

Os dados gerados pela técnica de qRT-PCR foram comparados entre grupos de amostras. Tanto para o grupo inicial, cujo cDNA foi sintetizado a partir de RNA amplificado, quanto para o grupo independente de amostras, os critérios para que um gene seja considerado diferencialmente expresso foram foi pvalor < 0,05 dado pelo teste t de *student* e *fold* de pelo menos 3 vezes. Esses critérios foram baseados no trabalho desenvolvido no laboratório já citado, que sugere usar uma diferença de expressão maior de 3 vezes para amostras amplificadas, aumentando o nível de concordância

com experimentos realizados com cDNA sintetizado a partir de RNA total (FERREIRA et al. 2009).

Para dois genes, *CRABP2* e *SHPK*, não houve amplificação das reações de qRT-PCR para os rins diferenciados. Ao se avaliar a curva de dissociação desses genes, foi observado um comportamento semelhante dessas amostras aos controles negativos. Como as reações foram acompanhadas por controles positivos, além de a amplificação dos normalizadores *GAPDH* e *ACTB* das amostras normais serem equivalentes às amostras tumorais, consideramos que esses genes não são expressos em um nível detectável por qRT-PCR. Apenas para efeito de cálculo, consideramos o maior valor de ciclo permitido pelo aparelho (Ct = 40).

Os gráficos foram construídos utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 54.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Também foi usada a correlação linear de Fisher para discriminar dois grupos de amostras baseando-se na expressão relativa de trios de genes.

3.11.3 Imunoistoquímica

A análise quantitativa se baseou na intensidade de marcação (Quadro 6) dada pelo ACIS III (*Automated Cellular Imaging System* (DAKO)), um sistema composto por um microscópio automático acoplado a uma câmera de escaneamento e a um computador. O programa ACIS permitiu selecionar apenas as áreas de células blastematosas do TW, e os glomérulos nos rins maduros.

62

Os resultados foram analisados em relação à intensidade da marcação da proteína nas diversas localizações (membrana, citoplasma e núcleo), parâmetros identificados pelo ACIS, e aos tipos de células marcadas. Assim, no que se refere à positividade das proteínas, primeiro uma análise verificou a correspondência da intensidade de marcação com a expressão do RNAm. Em seguida, para cada proteína e sua localização, um valor de intensidade limite foi estabelecido. O valor de intensidade máximo dado pelo ACIS III para as amostras visualmente negativas foi usado como valor limite para discriminar as amostras positivas e negativas (Tabela 4). Foram consideradas positivas aquelas amostras que além de apresentar valor de intensidade maior do que o valor limite estabelecido apresentou mais de 10% de células marcadas na área selecionada. Esses dados foram comparados aos resultados obtidos pelos dados de expressão de RNA

Adicionalmente, o perfil da expressão das proteínas foi caracterizada nos diferentes tipos celulares dos TWs e nos rins embrionários e diferenciados humanos.

Proteína	Localização	Intensidade		Proteína	Localização	Intensidade
CRABP2	Citoplasma	81	_	TIMP3	Citoplasma	70
	Núcleo	96			Membrana	69
CPK7	Citoplasma	85	WNT5B		Citoplasma	103
ORIG	Membrana	91			Membrana	88
IGF2	Citoplasma	75	_	FZD2	Membrana	73
HDGE	Citoplasma	80	_	TESK1	Citoplasma	68
IDGI	Núcleo	110	-			

Tabela 4 - Valores limites de intensidade.

4 **RESULTADOS**

4.1 CASUÍSTICA

4.1.1 Amostras tumorais

A maioria das amostras de TWs do Banco de Tumores do Hospital A.C. Camargo apresenta um alto índice de células necróticas, devido ao tratamento quimioterápico prévio à cirurgia, protocolo de tratamento seguido pelo GCBTTW. Dessa forma, a colaboração com o COG/NWTSG, que preconiza a cirurgia como primeira opção de tratamento permitiu a obtenção de amostras sem tratamento quimioterápico. De 30 amostras de tecido fresco congelado de TW compostas exclusiva ou predominantemente de componente blastematoso, 24 amostras foram selecionadas para microdissecção a *laser*.

Para representação da nefrogênese, 4 estágios de rins de embriões de camundongos foram usados para avaliação da expressão gênica.

4.1.2 Extração de RNA total e amplificação do RNA mensageiro das amostras tumorais

Após a extração do RNA total, a integridade foi avaliada através do equipamento *Bioanalyzer (Agilent*). Quanto às amostras microdissecadas a *laser*, os valores de RIN obtidos nas 24 amostras tumorais variaram de 5 a

8,5 e para as amostras de rins embrionários variaram de 5,0 a 8,4 (Tabela 5A e 5B).

Todas as amostras microdissecadas a *laser* de TW, RD e de rins embrionários foram amplificados como recomendado pelos respectivos *kits* de amplificação. A massa obtida após amplificação do RNA para amostras humanas variou de 60,83 a 132,52 µg, e para as amostras de rim embrionário variou de 0,19 a 69,81 µg.

As amostras utilizadas na validação independente dos dados, foram dissecadas manualmente e a extração do RNA total se deu através de TRizol, conforme as recomendações do fabricante. O RIN variou de 5,0 a 9,1 (Tabela 6).

Todas as amostras que obtiveram RIN< 5 foram excluídas do estudo.

	Número de células capturadas a		Avaliação	do RNA					
		laser		total p	elo	RNA ap	ós amplifica	ção	
Amostra	# lâminas usadas	# tiros (15µm)	tempo total	28S/18S	RIN	Concentração (µg/µL)	260/280	Massa total (µg)	
BC1 - 1				material	não dispo	onível			
BC1 - 2	1	1900	12'	1,5	5,9	1.843,31	2,66	60,83	
BC1 - 3	2	3600	20'	1,5	8,4	2.238,21	2,46	73,86	
BC1 - 4	1	1400	11'	0,6	5,7	823,17	2,68	27,16	
BC1 - 5	2	2400	12	1,1	6,8	3.285,53	2,35	98,57	
BC1 - 6	2	3900	17'	0,9	6,2	4.467,25	1,94	134,02	
BC1 - 7	4	2100	22'	2,1	6,8	2101,1	2,52	69,34	
BC1 - 8	2	2300	15'	1,4	8,0	4.427,32	2,08	132,82	
BC1 - 9	2	2600	12'	1,1	8,0	3.110,76	2,44	102,66	
BC1 - 10	2	2000	10'	1,2	6,8	4.317,81	2,05	129,53	
BC1 - 11				material	não dispo	onível			
BC1 - 12	2	2000	15'	1,2	8,3	4.029,04	2,2	120,87	
BC1 - 13	2	1600	10'	1,4	8,5	4.230,06	2,15	126,9	
BC1 - 14	1	2100	10'	1,0	7,8	3.717,71	2,32	111,53	
BC1 - 15	1	1900	10'	1,3	8,0	4.275,25	2,14	128,26	
BC1 - 16	2	1800	10'	0,2	5,0	2.502,18	2,39	75,07	
BC1 - 17	1	2100	10'	1,7	5,5	2.775,71	2,51	91,6	
BC1 - 18	1	2100	10'	0,8	6,3	3.018,44	2,49	90,55	
BC1 - 19	2	1700	10'	1,0	6,7	2.210,82	2,64	72,96	
BC1 - 20				material	não dispo	onível		······································	
BC1 - 21	3	2150	15'	1,4	6,5	4.198,77	2,09	125,96	
BC1 - 22	1	1100	20'	1,0	5,3	2.354,12	2,43	70,62	
BC1 - 23	2	1800	10'	1,4	7,2	1.966,6	2,3	64,9	
BC1 - 25	2	1900	10'	1,5	7,8	4.417,25	1,98	132,52	
BC1 - 27	2	1800	10'	0,9	7,1	2.720,72	2,52	81,62	
BC1 - 28	2	2000	10'	1,6	8,3	2.162,32	2,46	71,36	
BC1 - 29	1	2000	10'	1,3	7,3	3.023,97	2,35	99,79	
BC1 - 30				material	não dispo	onível			
MK02	2	1291	10'	0,4	5,1	1.363,7	2,83	40,91	
MK06	8	1411	10'	0,2	5,0	1.379,9	2,77	41,4	
MK12	3	1227	10'	0,6	5,3	741,62	2,61	22,25	
MK16	3	1300	10'	0,3	5,0	1.418,67	2,78	42,56	
FK2		nã	o aplicável			2.524,05	2,31	75,72	

Tabela **5A**. Tratamento das amostras tumorais e normais humanas desde a microdissecção a *laser*, RNA total e RNA amplificado.

	Número de	e células ca	pturadas	Avaliação	do RNA			
		a laser		total p	oelo	RNA ap	oós amplifio	cação
Amostra	# lâminas	# tiros	tempo	285/185	DIN	Concentração	260/280	Massa total
Amostra	usadas	(7,5µm)	total	203/103		(µg/µL)	200/200	(µg)
E15,5d B	4	211	10′	1,6	8,4	15,8	2,2	0,47
E15,5d D	4	810	10′	0,4	5,4	64,8	2,21	1,94
E15,5d F	4	830	10′	0,6	6,8	6,2	2,09	0,19
E15,5d G	3	700	10 <i>′</i>	0,8	6,6	551,1	2,57	16,53
E17,5d B	3	700	10 <i>′</i>	1,1	8,1	1.468,4	2,65	44,05
E17,5d C	3	716	10 <i>′</i>	1,3	7,5	1.488,9	2,59	44,67
E17,5d E	3	800	10 <i>′</i>	1,0	7,8	916,9	2,47	27,51
RN A	3	800	10 <i>′</i>	1,3	7,7	1.018,3	2.73	30,55
RN B	2	1000	10 <i>′</i>	1,3	8,6	2.326,85	24,85	69,81
RN C	3	1000	10´	1,2	8,5	193,67	1,99	5,81
RN D	3	920	10´	1,0	7,4	1.046,28	10,83	31,39
RN E	6	1290	10′	0,9	7,1	1.608,22	16,16	48,25
1Sem A	5	600	10´	0,8	7,2	1.884,9	2,46	56,55
1Sem B	3	440	10′	0,5	5,0	385,2	2,42	11,56
1Sem C	3	550	10′	0,7	5,1	1.772,6	2,42	53,18
1Sem D	4	730	10′	0,5	5,0	54,0	2,23	1,62
1Sem E	2	660	10′	1,5	7,7	2.173,8	2,43	65,21

Tabela **5B** - Tratamento das amostras de rins embrionários de camundongo desde a microdissecção a *laser*, RNA total e RNA amplificado.

_

ID Amostra	Razão 260/280	Concentra ção (ug/ul)	Razão 28/18S	RIN	ID Amostra	Razão 260/280	Concentra ção (ug/ul)	Razão 28/18S	RIN
P1124	1,95	2,689	2:1	8,2	P399	1,96	2,847	2:1	6,8
P4272	1,85	3,227	2:1	8,4	P002	1,91	2,91	2:1	6,4
P1068	1,79	3,467	2:1	8,7	P201	1,61	3,793	2:1	7,3
P1290	1,98	2,48	2:1	6,4	P1070	1,16	3,975	2:1	6,5
P2063	1,81	3,493	2:1	7,1	P1108	1,91	3,203	2:1	5,2
P2081	1,84	3,339	2:1	9,1	P4057	1,63	3,735	2:1	6,3
P1060	1,21	3,955	2:1	7,2	P1104	1,14	3,99	2:1	8,4
P1247	1,46	3,853	1:1	6,2	P4196	1,17	3,913	2:1	6,4
P4094	1,33	3,909	2:1	7,0	P277	1,07	3,994	2:1	8,5
P4181	1,6	3,739	2:1	7,5	P697	1,17	3,955	1:1	5,6
P1088	1,47	3,85	2:1	5,7	RD30	2,11	1,361	2:1	8,4
P2113	1,13	3,991	1:1	5,5	RD32	2,13	1,202	2:1	6,1
P4159	1,93	2,988	2:1	5,8	RD33	2,13	1,03	2:1	5,8
P1065	1,59	3,819	2:1	7,6	RD34	2,08	0,742	2:1	5,0
P1144	1,94	2,811	2:1	6,6	RD36	2,08	1,539	2:1	6,0
P2050	1,45	3,896	2:1	8,3	RD40	2,1	1,624	2:1	6,3
P178	1,63	3,668	1:1	5,7	RD42	2,05	0,418	2:1	5,8
P342	1,36	3,941	2:1	5,7	RD43	2,12	1,18	2:1	8,2
P001	2	2,128	2:1	6,8	RD44	2,12	0,989	2:1	7,5
P420	1,88	3,139	2:1	7,0	RD45	2,15	1,167	2:1	6,5
P095	1,23	3,967	2:1	8,2	RD46	2,12	1,474	2:1	5,7
P128	2	1,2	2:1	7,8	RD47	2,13	0,726	2:1	7,5
P219	1,96	2,855	2:1	7,2	RD48	2,12	1,294	2:1	8,1

Quadro 6 - Concentração e qualidade das 35 amostras utilizadas na validação independente do estudo.

Quinhentos nanogramas de RNA amplificado corado com brometo de etídeo foram avaliados em gel de agarose 1%. O perfil de amplificação deve conter uma maior concentração de RNA amplificado entre 300-700 pb, critério de qualidade previamente estabelecido no laboratório, umas vez que lâminas hibridadas com amostras dentro desse critério mostraram melhor qualidade (Figura 7). Aparentemente, existe uma tendência relacionando o valor de RIN com a quantidade de RNA amplificado final (Tabela 7).

RIN	Concentração média (µg/µL)
5,0 - 7,4	2,99
7,5 - 10	3,56

Tabela **7** - Relação entre RIN obtido pelas amostras e a média da concentração obtida após amplificação das amostras tumorais.

A amplificação das 8 réplicas da amostra referência foi satisfatória com média de razão 260/280 de 1,97, indicando boa pureza da amostra. A média de RNA amplificado recuperado foi de 2,52 µg/ul, sendo suficiente para realizar todos os experimentos de hibridação (Figura 7).



Legenda: A. amostras de TW e rim embrionário e B. amostra referência. M: marcador de 100bp (Invitrogen). 1-8: réplicas da amostra referência. A seta vermelha indica a banda de 600pb do marcador.

Figura 7 - Gel de agarose 1%. Visualização da concentração do RNA amplificado.

As oito réplicas do RNA amplificado da amostra referência foram unidas formando um *pool* com 800 µg totais, suficiente para todas as hibridações de TW e rins embrionários do projeto. Assim, 24 amostras de TW, 4 amostras de RD, um *pool* de rins fetais humanos e 3 amostras de cada um dos 4 estágios da nefrogênese foram usadas para os experimentos de hibridação.

4.2 CONSTRUÇÃO DA PLATAFORMA DE VIAS

A construção da plataforma de *microarray* foi concluída contendo 326 dos 403 (84%) genes das vias de transdução de sinal selecionadas, sendo 168 genes da via WNT, 97 genes da via PI3K, 71 genes do processo EMT (Tabela 8).

Tabela 8 - Representação de cDNAs por vias de sinalização imobilizados em lâmina de vidro.

	WNT	PI3K	EMT
Sequências ORESTES	119	82	51
Fragmentos de PCR	49	15	20
Sem representação	35	13	19
Total	203	110	98

Sequências ORESTES: fragmentos representados por ORESTES que atingiram os critérios descritos em material e métodos. Fragmentos de PCR: genes representados por fragmentos amplificados por PCR usando oligonucleotídeos específicos. Sem representação: genes que não tinham ORESTES dentro dos critérios no banco de ORESTES e para os quais não foi possível desenhar oligonucleotídeos dentro na região requerida ou que não foi possível amplificar.

Sequências de genes pertencentes a outros projetos, sendo 423 genes das vias do ácido retinóico, diferenciação neuronal e outros genes aleatórios representados por 645 ORESTES e 414 fragmentos originados pela técnica RASH, também foram imobilizados na lâmina além de 48 controles positivos (cDNA correspondente a um fragmento do *lambda fago Q gene*) e 496 controles negativos (112 representados por DMSO e 384 *blanks*), totalizando 2.352 pontos. Todas as sequências foram usadas para a normalização da lâmina. Entretanto apenas as sequências ortólogas foram considerados para a realização do projeto.

4.2.1 Pré-análises dos Experimentos de *Microarray* com a Plataforma Customizada

Para avaliar a qualidade das hibridações na lâmina customizada, 4 µg de RNA amplificado do *pool* de linhagens celulares humanas foi utilizado (Figura 8A, detalhe). A avaliação (pré-analise), normalmente aplicada nos experimentos de *microarray* indicou excelente de qualidade de hibridação.

Essa avaliação inclui uma normalização, que tem o objetivo de minimizar as variações sistemáticas introduzidas experimentalmente nas medidas da expressão gênica. No projeto como um todo, o método de regressão linear de *LOWESS* (*Locally Weighted Scatter-plot Smoothing*) foi usado para normalização das lâminas, com intervalos de 20%, ou seja, a análise de regressão foi realizada com 20% dos pontos ao redor de cada ponto em questão.

Para verificar a reprodutibilidade experimental, as lâminas controle e *swap* foram analisadas através da correlação de Pearson, que determina uma medida do grau de relacionamento linear, quando as amostras teste e referência não são similares. Essa medida varia de 0 a 1, sendo que 1 indica a melhor reprodutibilidade entre as lâminas controle e *swap*. Para uma lâmina ser considerada de boa qualidade, essa correlação deve ser superior a 80% após a normalização.



Legenda: A. Lâmina onde estão imobilizadas as sequências do estudo. B. MM Plot. Dados não normalizados (correlação de Pearson 69,13%) e normalizados (96,82%). Eixo X: lâmina controle: amostra teste Cy3/amostra referência Cy5, eixo y: lâmina *swap*: amostra referência Cy3/amostra teste Cy5. O gráfico mostra a dispersão de pontos representantes da relação entre os valores de intensidade para cada gene das lâminas controle e *swap*. C. Histograma: Gráficos representativos da normalização de Lowess, antes e após normalização, onde houve uma correção da distorção dos pontos.

Figura 8 – Avaliação da qualidade da lâmina customizada.

Considerando que a lâmina customizada passou pelos testes de qualidade e apresentou boa reprodutibilidade, seguiu-se a hibridação das amostras do estudo. As 24 amostras de TW, 4 amostras de RD e três replicatas de rins de camundongos representantes dos quatro estágios da nefrogênese (1, 2, 3 e 4) foram hibridadas, sendo que para o estágio 1, uma amostra foi hibridada.

Após os procedimentos de normalização, todas as replicatas apresentaram correlação de Pearson maior do que 80%, sendo, portanto, consideradas de boa qualidade (Tabela 9).

Tabela **9** - Correlação de Pearson e número de *spots* avaliáveis (do total de 1.856) das amostras utilizadas no estudo.

Amostra	Correlação de Pearson	<i>Spots</i> avaliáveis	Amostra	Correlação de Pearson	<i>Spots</i> avaliáveis
BC1-02	0,844	1.658	BC1-25	0,907	1.791
BC1-03	0,895	1.691	BC1-27	0,942	1.759
BC1-04	0,889	1.672	BC1-28	0,880	1.736
BC1-05	0,934	1.749	BC1-29	0,934	1.766
BC1-06	0,956	1.769	MK-02	0,776	1.639
BC1-07	0,912	1.674	MK-06	0,915	1.731
BC1-08	0,841	1.788	MK-12	0,796	1.759
BC1-09	0,887	1.750	MK-16	0,826	1.665
BC1-10	0,938	1.770	FK-02	0,942	1.771
BC1-12	0,825	1.587			
BC1-13	0,950	1.770	E15,5d-G	0,902	1.708
BC1-14	0,939	1.777	E17,5d-B	0,849	1.716
BC1-15	0,960	1.771	E17,5d-D	0,851	1.697
BC1-16	0,880	1.717	E17,5d-C	0,837	1.749
BC1-17	0,865	1.751	RN-A	0,747	1.679
BC1-18	0,730	1.759	RN-B	0,855	1.752
BC1-19	0,872	1.724	RN-E	0,870	1.742
BC1-21	0,908	1.759	1SEM-A	0,832	1.724
BC1-22	0,816	1.749	1SEM-E	0,883	1.690
BC1-23	0,883	1.733	1SEM-C	0,896	1.704

BC: Componente blastematoso. MK: rim diferenciado. FK: rim fetal. Estágio 1 (E15,5d), 2 (E17,5d), 3 (RN) e 4 (1 SEM).

O valor médio de correlação de Pearson para as hibridações intraespecíficas foi de 88,43% e para as hibridações inter-específicas foi de 85,22%. Também é possível observar que todas as amostras hibridadas tiveram mais de 90% dos *spots* avaliáveis com média de 93%, indicando alta reprodutibilidade dos experimentos nas duas condições.

4.3 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NOS TWS EM COMPARAÇÃO COM RINS DIFERENCIADOS

Em busca dos genes com expressão desregulada nos TWs, foi usada a comparação das amostras tumorais com as amostras de rins diferenciados (TWxRD). Dos 326 genes pertencentes às vias de transdução de sinal, 47 foram diferencialmente expressos (p<0,05), sendo 29 e 18 genes mais e menos expressos no TW. A diferença de expressão variou de - 3,42 para *EYA4* até 230,63 para *IGF*2 (Tabela 10).

Tabela **10** - Genes diferencialmente expressos (p<0,05). Os sinais negativos e positivos representam os genes mais expressos rim diferenciado e mais expressos no TW, respectivamente.

Clone	Genes	Fold	Clone	Genes	Fold
QV1-NN0229-444-a01	EYA4	-3,43	34073	PCTK2	1,55
CM1-CI0132-571-g05	TIMP3	-2,95	40030	FZD10	1,66
RC2-BN0074-016-a07	TBL1XR1	-2,76	34016	CARKL	1,77
MR4-NN1197-003-c03	OCRL	-2,48	QV4-CT0491-398-d01	WNT5B	1,8
MR0-BT0551-102-g07	CDC7	-1,93	CM1-LT0067-109-d10	SFRP2	1,85
RC2-BN0243-012-f12	HIPK1	-1,91	QV3-HT0544-139-e09	FZD2	1,98
RC1-HT0623-011-a09	VANGL2	-1,85	34125	IGF1R	2,01
MR2-CN0035-203-e07	CDS1	-1,76	MR2-NN1111-008-e07	LRP1	2,13
RC2-BN0243-015-d03	CDH6	-1,67	IL3-CT0214-052-H06	FZD4	2,25
MR0-HT0405-202-b04	FN3K	-1,6	MR0-SN0040-004-h06	CSNK2A1	2,45
MR0-HT0078-003-b09	PIP5K2C	-1,45	MR1-RT0029-001-g07	DMPK	2,49
MR3-HB0013-002-d06	DVL2	-1,41	34104	CRABP2	2,51
QV3-ET0171-494-e08	PIK3CD	-1,4	34134	FRZB	2,57
QV2-HT0540-362-e03	ITPR3	-1,39	34049	GRK7	2,9
40096	WNT3	-1,33	QV0-DT0048-124-h02	TESK1	3,11
MR0-SN0037-007-g07	FRAT2	-1,28	34092	TCF7L2	3,95
MR0-BN0070-011-d02	PIK3CA	-1,27	CM1-CI0134-551-h03	OFD1	4,06
33832	MAPK9	-1,2	QV2-NN0045-323-f08	RGS4	4,51
34140	COL5A1	1,16	RC2-BN0074-016-g08	PIK3C3	5,26
RC0-GN0276-031-g01	INPP5B	1,19	MR4-KT0047-001-d10	HDGF	5,36
34124	EYA3	1,22	34141	PPP2R1A	7,13
34106	LRP6	1,23	QV1-CT0417-313-c05	JUN	10,52
MR4-BT0358-012-h07	PIP5K2B	1,45	CM3-DT0004-090-f07	IGF2	230,63
MR1-HN0069-004-e02	PAX2	1,54			

Os 47 genes foram distribuídos nos cromossomos para avaliar a representatividade dos genes com maior e menor expressão nas regiões de ganho e perda cromossômica relatadas na literatura. A distribuição se mostrou relativamente homogênea, não revelando uma região cromossômica preferencial contendo genes com expressão alterada (Figura 9, Quadro 3).



Legenda: A. Genes pouco expressos no TW. B. Genes super-expressos no TW.Figura 9 - Distribuição dos 47 genes nos 24 cromossomos.

Genes pouco expressos		Genes mais expressos				
1	CDC7, HIPL1, VANGL2, PIK3CD	1	INPP5B, EYA3, CRABP2, RGS4, HDGF, JUN			
3	TBL1XR1, PIK3CA	2	FRZB			
4	CDS1	3	GRK7			
5	CDH6, MAPK9	4	SFRP2			
6	EYA4, ITPR3	9	COL5A1, TESK1			
10	FRAT2	10	PAX2, TCF7L2			
12	PIP5K2C	11	FZD4, IGF2			
17	FN3K, DVL2, WNT3	12	LRP6, PCTK2, FZD10, WNT5B, LRP1			
22	ТІМР3	15	IGF1R			
Х	OCRL	17	PIP5K2B, SKPK, FZD2			
		18	PIK3C3			
		19	DMPK, PPP2R1A			
		20	CSNK2A1			
		Х	OFD1			

Quadro 3 - Distribuição dos 47 genes nos 24 cromossomos.

Com a finalidade de identificar os aspectos funcionais dos 47 genes, a representatividade foi avaliada segundo sua anotação nos processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares usando o *Gene Onthology Consorciun Anottation* (GO) através da ferramenta *WebGestalt*.

Essa análise identificou 2 processos biológicos foram superrepresentados: percepção (*EYA4*, *PAX2*, *EYA3*, *CDS1*, *TIMP3*, *GRK7*) e estabelecimento de polaridade de tecidos (*FZD2* e *VANGL2*).

Também foram encontradas 2 funções moleculares superrepresentadas: ligantes de heparina (*COL5A1* e *HDGF*) e ligantes de fator de crescimento tipo insulina (*IGF2* e *IGF1R*).

Quanto ao componente celular, apenas citoplasma foi superrepresentado (*ITPR3*, *CDS1*, *PPP2R1A*, *OCRL*, *PIK3C3*, *PIK3CA*, *PIK3CD*, *PIP5K2B*) (Figura 10).



Legenda: Gráfico direto acíclico representando apenas as categorias de Gene Onthology enriquecidas (vermelho) e suas origens não enriquecidas (preto) (p<0,05), com os respectivos genes em cada classe.

Figura 10 - Caracterização dos 47 genes diferencialmente expressos entre TW e RD quanto a processo biológico, função molecular e componente celular. Os domínios protéicos dos 47 genes foram avaliados usando o banco *Pfam Protein Domains*, também disponível pelo *WebGestalt*, nos quais foram observadas duas super-representações: Frizzled (*FZD2, FZD4, FZD10*) e PI3K C2 (*PIK3C3, PIK3CA, PIK3CD*) (p<0,05).

4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES ALTERADOS NO TW QUE RECAPITULAM OS PRIMEIROS ESTÁGIOS DA NEFROGÊNESE

Para identificar candidatos a serem os primeiros genes alterados nos TWs, foram selecionados aqueles que recapitulam o início da nefrogênese, uma vez que a desregulação da expressão destes genes pode estar envolvida com os eventos precoces responsáveis pelo surgimento do tumor.

A expressão dos 326 genes foi avaliada durante os diferentes estágios da nefrogênese em camundongos, representando a diferenciação das células do blastema metanéfrico até as células completamente diferenciadas nos rins. Pela avaliação visual de cada gráfico gerado, os genes foram classificados como apresentando expressão crescente, decrescente ou comportamento não definido. Dos 326 genes, 72, 64 e 190 apresentaram comportamento de expressão crescente, decrescente e de não definido, respectivamente, ao longo da diferenciação.

Em seguida, os genes que apresentaram tendência crescente e decrescente na diferenciação do blastema metanéfrico foram comparados com aqueles menos e mais expressos no TW em relação às células diferenciadas do rim, respectivamente (Figura 11).



Legenda: As setas apontando para cima e para baixo indicam os genes mais e menos expressos em células do componente blastematoso do TW em relação às células blastematosas do rim diferenciado.

Figura 11 - Representação do comportamento dos genes durante a nefrogênese e nos TWs.

Portanto, os 72 genes que apresentaram comportamento crescente durante a nefrogênese foram comparados com os 18 genes menos expressos no TW e os 64 genes que apresentaram comportamento decrescente durante a nefrogênese foram comparados com os 29 genes mais expressos no TW. Essa análise revelou 18 genes com expressão semelhante aos primeiros estágios de diferenciação do rim, sendo 7 menos expressos no TW e crescentes na nefrogênese e 11 mais expressos no TW e decrescentes na nefrogênese (Figuras 11 e 12).



Figura 12 - Comportamento dos 18 genes durante a nefrogênese.

A clusterização hierárquica não supervisionada baseada no padrão de expressão dos 18 genes foi capaz de agrupar as amostras de TW com os estágios mais iniciais do desenvolvimento do rim de camundongo (rins mais precoce e um intermediário) e o *pool* de rins fetais humanos, e discriminando essas amostras dos estágios mais tardios da nefrogênese de camundongo (rins intermediários e de recém-nascidos) e rins totalmente diferenciados de humanos e murinos (Figura 13).

Um dos aspectos identificado por essa clusterização é o agrupamento de amostras semelhantes de espécies diferentes seguindo os parâmetros biológicos esperados (Figura 13A), o que valida o modelo proposto nesse projeto para estudar TWs em humanos e a nefrogênese em camundongos. Um segundo aspecto indica que o padrão de expressão baseado nos 18 genes confirma que os TWs recapitulam os primeiros estágios do rim (Figura 13B), indicando que a alteração da expressão desse grupo de genes é um evento precoce para o surgimento do TW.



Pool de rins fetais humanos Rim de embrião murino mais precoce Rim de embrião murino de idade intermediária

Rins de camundongo recém-nascido Rins diferenciados murinos Rins diferenciados humanos

Legenda: A. As setas azuis e vermelhas indicam amostras humanas e de camundongo, respectivamente. B. As setas indicam a origem das amostras segundo a legenda de cores. Os valores nos braços do *cluster* indicam a porcentagem da forma mais frequente de clusterização.

Figura 13 - Clusterização hierárquica não supervisionada utilizando correlação de Pearson e *complete linkage*.

4.5 CONFIRMAÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS POR QRT-PCR

Visando avaliar o rigor dos resultados encontrados através da metodologia de *microarray*, os 18 genes co-regulados no TW e nos primeiros estágios da nefrogênese foram selecionados. Desses, *FZD2*, *FZD10* e *FRAT2* não foram avaliados por gRT-PCR por conter apenas um éxon. Além

desses, *CDH6*, *GRK7* e *MAPK9* foram excluídos da análise por não apresentarem amplificação do fragmento específico, apesar de vários pares de oligonucleotídeos terem sido testados. Assim, restaram 12 genes que foram avaliados quanto à expressão do RNAm por qRT-PCR.

De 12 genes, 9 (75%) foram concordantes entre as duas metodologias, indicando resultados bastante robustos. *CRABP2*, *HDGF*, *IGF2*, *PAX2*, *SHPK*, *TESK1* e *WNT5B* foram mais expressos no TW, e *HIPK1* e *TIMP3* foram menos expressos no TW (Tabela 11).

Tabela 11 - Genes selecionados para validação técnica com os valores de expressão dado por cDNA *microarray* (cDNA MA) e qRT-PCR.

		cDN	A MA	qRT-PCR		
Cenes	nefrogânese	Fold	teste t	Fold	teste t	
Genes	nenogenese	TWxRD	(pvalor)	TWxRD	(pvalor)	
CRABP2	decrescente	2,51	0,00	66,30	<0,01	
FRZB	decrescente	2,57	0,00	-9,51	<0,01	
HDGF	decrescente	5,36	0,04	4,16	0,01	
HIPK1	crescente	-1,91	0,00	-6,57	0,04	
IGF2	decrescente	230,63	0,04	84,04	<0,01	
ITPR3	crescente	-1,39	0,04	-1,65	0,12	
PAX2	decrescente	1,54	0,04	34,21	0,01	
PIK3CA	crescente	-1,27	0,02	-1,61	0,05	
SHPK	decrescente	1,77	0,03	18,89	<0,01	
TESK1	decrescente	3,11	0,00	4,61	0,04	
TIMP3	crescente	-2,95	0,01	-9,46	<0,01	
WNT5B	decrescente	1,80	0,05	78,58	0,01	

Apesar de ter atingido significância estatística, *PIK3CA* não foi considerado para a validação no grupo independente de amostras porque não atingiu uma diferença de expressão de pelo menos três vezes.

4.6 CONFIRMAÇÃO DA DIFERENÇA DE EXPRESSÃO DOS GENES CANDIDATOS POR RT-PCR QUANTITATIVO EM UM GRUPO INDEPENDENTE DE AMOSTRAS

Para verificar se os dados obtidos não são dependentes do grupo inicial de amostras sendo candidatos a estarem alterados na maioria dos TWs, 35 amostras de TW enriquecidas para o componente blastematoso e 13 amostras de rins diferenciados enriquecidas para a região do córtex renal foram usadas para validação independentes.

Os 9 genes validados no grupo inicial de amostras foram testados no grupo independente, dos quais, 5 (55,6%) foram concordantes seguindo os critérios do estudo, sendo *CRABP2*, *IGF2*, *PAX2* e *WNT5B* mais expressos e *TIMP3* menos expresso no TW (Tabela 12, Figura 14).

Та	bela	ı 1:	2 -	Compor	tamento	dos	genes	no	grupo	ind	lepend	lent	e d	е	amost	ras.
			_				90.00		9.00					-		

-	Fold TW x RM	pvalor	-	Fold TW x RM	pvalor
CRABP2	41.171,6	<0,01			
IGF2	15,6	<0,01	SHPK	9,6	0,20
HDGF	1,1	0,52	TESK1	1,6	0,13
HIPK1	-1,5	0,5	TIMP3	-9,0	<0,01
PAX2	32,8	<0,01	WNT5B	26,2	<0,01

HIPK1 apresentou a tendência correta de expressão e foi estatisticamente significativo. No entanto, não atingiu o critério de diferença de expressão de 3 vezes, sendo, portanto, não considerado um gene validado. Três genes (*HDGF*, *SHPK* e *TESK1*) não atingiram significância estatística para serem considerados diferencialmente expressos, entretanto

eles mostraram a mesma tendência de expressão do grupo inicial de amostras.





Figura 14 - Expressão relativa por qRT-PCR dos 9 validados no grupo inicial de amostras, comparando TW e RD no grupo independente de amostras.

Parte da não validação desses genes provavelmente se deve à heterogeneidade das amostras que foram dissecadas manualmente além de outras diferenças na manipulação. Essas amostras têm contaminação de células dos outros componentes do TW e da região medular do rim, o que pode influenciar os dados de expressão.

4.7 AVALIAÇÃO DA CORRESPONDÊNCIA DA EXPRESSÃO DE RNA MENSAGEIRO E PROTEÍNA

A análise quantitativa do ACIS é baseada na intensidade de marcação da proteína, um número originado da relação entre azul, marrom claro e marrom escuro. Para as amostras de TW e rins diferenciados, o valor de intensidade de cada proteína, foi considerado em todas as localizações, citoplasma, membrana e núcleo. Essa análise foi realizada porque, ao se medir o comportamento da expressão do RNA mensageiro, não é possível avaliar a localização celular da proteína que eventualmente será traduzida. Assim, os gráficos estariam reproduzindo o nível de expressão daquela proteína na célula, independente de sua localização.

Dessa forma, como no grupo inicial de amostras em que o padrão de expressão foi avaliado apenas nas células blastematosas, as áreas de componente blastematoso foram selecionadas pelo ACIS III, que avaliou a intensidade de marcação das proteínas.

Ao ser comparado com o grupo inicial de amostras, 5 das 8 proteínas (62,5%) foram concordantes com a expressão do RNAm: *CRABP2*, *GRK7*,

HDGF, *IGF*2 e *TESK*1. *WNT5B* e *FZD*2 não mostraram diferença quanto à intensidade de marcação e *TIMP3* revelou um resultado contrário, ou seja, esperava-se maior intensidade de marcação no rim normal, e não no TW (Figura 15).



Figura 15 - Intensidade de marcação nas amostras tumorais (TW), representadas pelo componente blastematoso, e nos rins maduros (RM), representados pelos glomérulos.
4.8 COMPARAÇÃO CONJUNTA DA EXPRESSÃO DOS GRUPOS INDEPENDENTES COM O GRUPO INICIAL DE AMOSTRAS

Os resultados de quantificação do RNA mensageiro e/ou da sua respectiva proteína nos grupos independentes foram comparados com o grupo inicial de amostras (Tabela 13).

	Grupo Inicial (TW)	Grupos Independentes (TW)		
Gene	qRT-PCR	qRT-PCR	IHQ	
CRABP2	↑	1	1	
HDGF	↑	não	↑	
HIPK1	\downarrow	\downarrow	NA	
IGF2	↑	↑	\uparrow	
PAX2	↑	↑	NA	
SHPK	↑	não	NA	
TESK1	↑	não	\uparrow	
TIMP3	\downarrow	\downarrow	não	
WNT5B	↑	↑	não	

Tabela **13** - Comparação da expressão por qRT-PCR e IHQ em TW x RM dos grupos independentes com o grupo inicial de amostras.

↑ mais expresso no TW. ↓ menos expresso no TW. Não: expressão discordante do grupo inicial. NA: não avaliado.

Os genes *CRABP2*, *HDGF*, *IGF2*, *TESK1*, *TIMP3* e *WNT5B* foram avaliados tanto por qRT-PCR quanto por IHQ, sendo que *CRABP2* e *IGF2* concordaram quanto ao nível de expressão em ambos os grupos independentes.

Tanto o grupo inicial de amostras quando a IHQ avaliaram a expressão dos genes especificamente no componente blastematoso enquanto que as amostras do grupo independente avaliadas por qRT-PCR

provavelmente apresentam contaminação de outros componentes já que foram dissecadas manualmente. Como consequência, a medida da expressão gênica pode ter sido influenciada pela expressão dos outros componentes. Esse pode ser um dos motivos para que *HDGF* e *TESK1* não terem sido validados por qRT-PCR, mas validados por IHQ nos grupos independentes.

4.9 CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA NAS CÉLULAS DO TWS E DURANTE A NEFROGÊNESE

Para cada proteína, um valor limite de intensidade foi estabelecido visualmente, abaixo do qual, as amostras foram consideradas negativas, e acima, positivas, levando-se em consideração a localização da proteína na célula. Esses valores foram comparados com o rim diferenciado, representado apenas pelas células glomerulares (Tabela 14), uma vez que as células tubulares de rins diferenciados e funcionais apresentam positividade inespecífica para diversas proteínas.

A expressão citoplasmática de CRABP2 foi observada em um momento muito específico nos rins embrionários: apenas nas células do mesênquima metanéfrico, quando estão se organizando em torno do tubo uretérico e antes de adotarem a morfologia epitelial. Nas células do blastema metanéfrico, que seria a fase seguinte da nefrogênese, até o rim estar completamente formado, com túbulos e glomérulos formados, CRABP2 é completamente negativa. Por outro lado, a quase totalidade dos componentes blastematosos de TW foi fortemente positiva em citoplasma (94,6%) e núcleo (93,5%). Para algumas amostras de TW, foi possível avaliar os componentes epitelial e estromal, que apresentaram positividade fraca ou foram negativos para CRABP2 (Figura 16).

WNT5B começa a ser encontrada na membrana das células do blastema metanéfrico que estão se organizando para formar a vesícula renal, e algumas células mantém a marcação de membrana até a completa diferenciação. É interessante notar que WNT5B parece ser expresso apenas na membrana apical das células. A maioria dos componentes blastematosos foi negativa em membrana para WNT5B (75,22%) e apresentou positividade fraca no citoplasma (93,3%) (Figura 17). Quando positivo, WNT5B foi expresso em toda a membrana celular, sem marcação preferencial na porção apical das células.

Todas as células do rim embrionário são positivas na membrana para FZD2, desde as células do mesênquima metanéfrico, o blastema em todas as suas etapas de diferenciação e os glomérulos. Dos componentes blastematosos, 65,10% foram negativos e 34,90% foram positivos para FZD2 (Figura 18).

WNT5B é uma proteína secretada que se liga à FZD2, uma proteína de membrana. Foi identificada marcação de membrana de FZD2 e WNT5B em células blastematosas do TW que começam a se aglomerar, uma ação prévia ao início da diferenciação celular, mantendo-se positivas no componente epitelial. O componente estromal foi negativo para ambas (Figuras 17 e 18).

Apesar de GRK7 ser sempre expressa em membrana e citoplasma de todos os estágios embrionários, a expressão foi muito mais forte nos estágios mais iniciais. Nos rins diferenciados, em parte dos glomérulos, não foi identificada a expressão citoplasmática de GRK7, e em uma proporção muito menor, não foi identificada a expressão de membrana. No entanto, a grande maioria dos túbulos foi positiva. Virtualmente, todos os componentes blastematosos avaliados foram fortemente positivos para GRK7, tanto em membrana quanto em citoplasma. Parte dos componentes estromais foi negativo e parte positivo, mas com positividade mais fraca. O componente epitelial revelou uma positividade muito mais fraca do que o componente blastematoso, tanto para citoplasma quanto para membrana (Figura 19).

A expressão de IGF2 foi avaliada no citoplasma e foi positiva em praticamente todos os estágios fetais, sendo que células mais indiferenciadas apresentaram positividade mais forte, que foi se perdendo conforme as células se diferenciaram. As células completamente diferenciadas dos rins maduros são negativas para IGF2. A maioria dos componentes blastematosos de TWs expressa *IGF2* (85,71%). Os componentes epitelial e estromal também são positivos para IGF2, sendo que a positividade para o componente estromal foi mais fraca (Figura 20).

A marcação citoplasmática de TESK1 foi encontrada em células tubulares mas não nas glomerulares dos rins embrionários mais precoces, presentes de forma mais forte nos túbulos e ausentes nos glomérulos dos rins diferenciados. As amostras de componente blastematoso foram, em sua maioria, positivas (96,49%). As células do componente epitelial foram

positivas e as células do componente estromal foram negativas para TESK1 (Figura 21).

A expressão citoplasmática de HDGF não variou, mas foi possível observar uma discreta diminuição da expressão nuclear durante a nefrogênese, sendo que poucas células são positivas nos glomérulos diferenciados para ambas as localizações. As células dos túbulos renais apresentam marcação citoplasmática e a maioria, marcação nuclear. Não houve diferença de marcação nas amostras de componente blastematoso para ambas as localizações. O componente epitelial se comportou como o respectivo componente blastematoso enquanto que o componente estromal foi completamente negativo (Figura 22).

TIMP3 foi avaliada em membrana e citoplasma. Nos rins fetais, a proteína só foi positiva na membrana das células. Essa marcação foi praticamente toda perdida na membrana dos glomérulos dos rins diferenciados. Enquanto que a maioria (87,10%) das amostras de componente blastematoso apresentou positividade em citoplasma, menos da metade (42,34%) foi positiva na membrana das células. O componente epitelial se comportou como o respectivo componente blastematoso e o componente estromal foi completa negativo para TIMP3 (Figura 23).

		RM - glomérulos		TW - blastema		Comportamento na
	-	negativo	positivo	negativo	positivo	nefrogênese
- CRABP2	citoplasma	18	0	6	107	expressão no
		(100%)		(5,31%)	(94,69%)	citoplasma de células
	nucleo	17	0	7	101	
		(100%)		(6,48%)	(93,52%)	
HDGF	citoplasma	12	0	62	56	expressão nuclear e
		(100%)		(52,54%)	(47,56%)	citoplasmática durante a
	núclos	18	2	59	52	diferenciação e nos rins
	nucleo	(90%)	(10%)	(53,15%)	(46,85%)	diferenciados
GRK7	citoplasma	11	9	1	105	
		(55%)	(45%)	(0,94%)	(99,06%)	expressão decrescente
	mombrono	2	20	1	116	durante a nefrogênese
	membrana	(9,09%)	(90,91%)	(0,86%)	(99,16%)	
- TIMP3	- 14 1	26	5	15	101	
	citopiasma	(83,87%)	(16,13%)	(12,90%)	(87,10%)	expressão decrescente
	mombrono	21	0	64	47	durante a nefrogênese
	memprana	(100%)		(57,66%)	(42,34%)	
WNT5B	citoplasma	10	0	112	8	expresso na porção
		(100%)		(93,33%)	(6,67%)	apical das células
	mombrono	12	8	85	28	durante a formação das
	memprana	(60%)	(40%)	(75,22%)	(24,78%)	estruturas do rim
						expressão nas
FZD2	membrana	3	13	69	37	membrana das células
		(18,75%)	(81,25%)	(65,10%%)	(34,90%)	durante a diferenciação
						e nos rins diferenciados
TESK1	citoplasma	20) 0	4	110	expressão decrescente
		(100%)		(3,51%)	(96,49%)	durante a nefrogênese
IGF2	citoplasma	10	0	16	96	expressão decrescente
		(100%)	0%)	(14,29%)	(85,71%)	durante a nefrogênese

Tabela **14** - Análise da imunoistoquímica das amostras de componente blastematoso de TW e dos rins maduros.

Os números indicam a quantidade de amostras em cada classe.



Legenda: A. rim de embrião e 13 semanas e B. de 19 semanas mostrando positividade citoplasmática de CRABP2 nas células em MET, em torno do broto uretérico. C. Detalhe do rim de embrião de 24 semanas com células em MET e o broto uretérico próximo da cápsula renal. D. Células do rim diferenciado são negativas para CRABP2. E. TW trifásico no qual as células blastematosas são positivas e as células estomais e epiteliais são negativas ou apresentam marcação fraca para CRABP2. F. detalhe de componente blastematoso exibindo positividade citoplasmática e nuclear. G. detalhe de componente epitelial e H. estromal, que são negativos para CRABP2.

Figura 16 - Marcação citoplasmática, nuclear e de membrana de CRABP2.



Legenda: A. Rim de embrião de 18 semanas e B. de 21 semanas, ambos apresentam positividade em todas as células, assim como no C. rim diferenciado, que apresenta postividade mais fraca. D. Componente blastematoso fortemente positivo. E. Marcação mais fraca em componente epitelial e F. em componente estromal, quando comparado com o componente blastematoso.

Figura 17 - Marcação citoplasmática e de membrana de GRK7.



Legenda: Embriões de A. 17 semanas, B. 21 semanas e C. 24 semanas indicando que a positividade de IGF2 vai se tornando mais fraca nas células oriundas do blastema metanérfico. D. IGF2 é negativo nos glomérulos renais e apresenta marcação inespecífica nos túbulos. E. TW exibindo componentes blastematoso e estromal. F. TW exibindo componentes blastematoso e ostromal. F. TW exibindo componentes blastematoso para IGF2.

Figura 18 - Marcação citoplasmática de IGF2.



Legenda: Embriões de A. 17 semanas, B. 21 semanas e C. 24 semanas indicando que a positividade de TESK1 vai se tornando mais fraca até quase negativa no rim de 24 semanas nas células oriundas do blastema metanérfico. D. TESK1 é negativo nos glomérulos renais e apresenta marcação inespecífica nos túbulos. E. TW representado pelos componentes blastematoso e epitalial, positivos para TESK1. F. TW representado pelos componentes blastematoso, positivo para TESK1, e estromal, negativo para TESK1.

Figura 19 - Marcação citoplasmática de TESK1.



Legenda: Rim de embrião de A. 13 e B. 19 semanas mostrando positividade citoplasmática fraca de células do blastema metanéfrico. C. Detalhe do rim de embrião de 21 semanas exibindo positividade apical na membrana das células no momento em que estão se organizando nas estruturas renais. Rim completamente diferenciado D. Negativo e E. Positivo para WNT5B na membrana dos glomérulos. F. Componente blastematoso negativo para WNT5B. G., G. e I. Componente blastematoso e estromal negativos. Componente epitelial positivo para WNT5B em toda a membrana da célula.

Figura 20 - Marcação citoplasmática e de membrana de WNT5B.



Legenda: Rim de embrião de AJ. 19 semanas (detalhe em AL) e AK. 21 semanas (detalhe em AM) mostrando positividade de membrana para FZD2. AN. Rim diferenciado exibindo glomérulos positivos e negativos para FZD2 em membrana, com marcação inespecífica nos túbulos renais. AO. Componente blastematoso negativo e AP. positivo para membrana. AQ. AR. e AS. Componente blastematoso e estromal negativos e componente epitelial positivo em toda a membrana celular.

Figura 21 - Marcação de membrana de FZD2.



Legenda: A. Rim de embrião de 17 semanas e B. 21 semanas, ambos mostrando positividade nuclear fraca para HDGF. C. Rim diferenciado indicando que poucas células gomerulares e a maioria das células tubulares são positivas para HDGF. D. Componente blastematoso positivo e E. negativo para marcação nuclear e positividade citoplasmática fraca de HDGF. O componente epitelial se comporta como o componente blastematoso da mesma amostra. F. Componente estromal é negativo para HDGF.

Figura 22 - Marcação citoplasmática e nuclear de HDGF.



Legenda: A. Rim de embrião de 17 semanas, B. Detalhe de rim de embrião de 21 semanas e C. Rim de embrião de 24 semanas, todos positivos para TIMP3 em citoplasma. D. Rim maduro com glomérulos negativos e túbulos positivos para TIMP3. E. Componente blastematoso negativo e F. positivo para TIMP3 no citoplasma. G. Componente epitelial positivo e componente estromal negativo para TIMP3.

Figura 23 - Marcação citoplasmática de TIMP3.

4.10 BUSCA DE MARCADORES DE RECAÍDA EM TW

As características clínicas disponíveis das amostras permitiram buscar genes que possam estar associados ao prognóstico dos pacientes.

Em busca de genes que possam ser testados como marcadores moleculares de predição da recaída tumoral em TWs, os 10 genes co-regulados que foram diferencialmente expressos com significância estatística no grupo inicial e testados no grupo independente de amostras, foram avaliados quanto à sua capacidade de discriminar as 12 amostras de TW que recaíram das 23 que não recaíram. *IGF2* foi capaz de discriminar as amostras (*fold*=-2,79 e p<0,01), além de *TESK1* que mostrou uma forte tendência nesse sentido (Figura 24).





Figura 24 - Expressão relativa por qRT-PCR dos genes, comparando os grupos de recaída (R) e não-recaída (NR).

Em busca de uma classificação mais robusta quanto ao prognóstico, as medidas relativas de expressão de *IGF2* e *TESK1* foram combinadas com os outro 8 genes (*PAX2*, *WNT5B*, *TIMP3*, *PIK3CA*, *HDGF*, *CRABP2*, *HIPK1* e *SHPK*) formando trios, que foram testados quanto à capacidade de discriminar os dois grupos de amostras (Tabela 15).

	Acertos NR	Acertos R	Total de acertos
IGF2, TESK1, TIMP3	9/14 (64.29%)	5/8 (62.50%)	14/22 (63.64%)
IGF2, TESK1, WNT5B	6/9 (66.67%)	6/7 (85.71%)	12/16 (75.00%)
IGF2, TESK1, CRABP2	7/10 (70.00%)	5/7 (71.43%)	12/17 (70.59%)
IGF2, TESK1, HDGF	11/14 (78.57%)	7/8 (87.50%)	18/22 (81.82%)
IGF2, TESK1, HIPK1	9/12 (75.00%)	6/8 (75.00%)	15/20 (75.00%)
IGF2, TESK1, PIK3CA	11/14 (78.57%)	6/7 (85.71%)	17/21 (80.95%)
IGF2, TESK1, SHPK	9/13 (69.23%)	5/7 (71.43%)	14/20 (70.00%)
IGF2, TESK1, PAX2	11/13 (84.62%)	7/8 (87.50%)	18/21 (85.71%)

Tabela **15** - Combinações de trios de genes.

Os oito trios formados tiveram um índice de acerto que variou de 63,64% a 85,71% do total de amostras.

Três trios apresentaram mais de 80% de acerto na predição das amostras. *IGF2*, *TESK1* e *HDGF* foi capaz de acertar 11 de 14 (78,57%) das amostras que não recaíram e 7 de 8 (87,50%) das amostras que recaíram com um total de acertos de 81,82%. *IGF2*, *TESK1* e *PIK3CA* foi capaz de acertar 11 de 14 (78,57%) das amostras que não recaíram e 6 de 7 (85,71%) das amostras que não recaíram e 6 de 7 (85,71%) das amostras que recaíram com um total de acertos de acertar 11 de 13 (84,62%) das amostras que não recaíram e 7 de 8 (87,50%) das amostras que recaíram com um total de acertos de 85,71% (Figura 25).

Esses dados indicam uma alta acurácia e especificidade dos genes para discriminar as amostras que vão recair das que não vão recair.



Legenda: A. *IGF2*, *TESK1* e *HDGF*. B. *IGF2*, *TESK1* e *PIK3CA*. C. *IGF2*, *TESK1* e *PAX2*.Figura 25 - Trios de genes com mais de 80% de acertos totais.

5 DISCUSSÃO

Os tumores embrionários têm sua morfologia intimamente relacionada à diferenciação das células durante a organogênese, sugerindo que existe uma ligação entre os genes envolvidos com a diferenciação normal das células e a origem e progressão tumoral. Esses dados tornam os estudos da ligação entre esses tumores e a embriogênese uma ferramente de grande potencial para identificar alterações precoces importantes para o surgimento de uma neoplasia. Alguns estudos que se centraram na intersecção da embriogênese e da carcinogênese identificaram paralelos envolvendo genes e vias de sinalização celular comuns a ambos os processos (KHO et al. 2004; SCHÜLLER et al. 2006; MASCHIETTO et al. 2008).

Devido aos aspectos éticos que envolvem o estudo de embriões humanos, são necessárias análises comparativas dos tumores embrionários com dados da embriogênese de outros animais. Como não estão estabelecidos métodos para análise da expresssão gênica entre espécies, esse trabalho desenvolveu um modelo para analisar a expressão gênica em humanos e camundongos em uma plataforma customizada de *microarray*. O desenho experimental utilizado neste estudo, usando hibridações intra- e inter-específicas, permitiu a avaliação do TW, um tumor humano, sob o aspecto da diferenciação normal do rim em embriões de camundongos, evitando, assim, o uso de embriões humanos. O desenvolvimento do rim é um processo complexo cujas células apresentam duas origens: o mesênquima metanéfrico e os ductos renais (HASTIE 1994). A partir da indução dada pelo ducto uretérico, o mesênquima metanéfrico passa por uma série de processos morfogenéticos que resulta na transição mesênquima-epitélio para as células do blastema metanéfrico, e em seguida na diferenciação e formação dos glomérulos e túbulos dos rins (RIVERA e HABER 2005). Os TWs podem ser considerados uma falha dessa transição, resultando em tumores compostos por células semelhantes às células precursoras renais, o componente blastematoso, células estromais indiferenciadas e/ou ectópicas, o componente estromal, e estruturas epiteliais primitivas que lembram os túbulos e os corpos de "vírgula" e "S" do rim embrionário, o componente epitelial (SCHEDL 2007).

Além das semelhanças morfológicas, diversos estudos identificaram padrões de expressão nos TWs semelhantes aos de rins embrionários (LI et al. 2002; LI et al. 2005; MASCHIETTO et al. 2008). Consequentemente, o estudo dos TWs sob a perspectiva da diferenciação das células renais tornase uma ferramenta de grande potencial para a identificação de genes específicos e padrões de expressão gênica nos TWs que sejam comuns à organogênese do rim que possam ser avaliados como genes candidatos a estarem envolvidos na transformação das células renais em TWs.

Diversos genes foram previamente identificados com expressão semelhante durante o desenvolvimento do rim e nos TWs, como *IGF2* (SCOTT et al. 1985; HARUTA et al. 2008), *PAX2* (TAMIMI et al. 2006, 2008), *HGF* e seu receptor *MET* (VUONONVIRTA et al. 2008).

Um estudo anterior realizado no laboratório comparou o componente blastematoso de TW com rins fetais e maduros levando à identificação de uma assinatura de 25 genes modulados durante o desenvolvimento do rim e capaz de discriminar os rins fetais dos TW, que por sua vez estão discriminados dos rins maduros. Nessa assinatura foi identificada a superrepresentação da via de sinalização Wnt (MASCHIETTO et al. 2008).

A via de sinalização Wnt é composta por três braços, sendo o canônico, que envolve a β-catenina, o mais estudado, tanto na diferenciação normal das células quanto em tumores. Nesse braço, β-catenina e APC foram associados aos TWs e à nefrogênese normal. Mutações de β-catenina são encontradas em 10% dos TWs (ZHUANG et al. 2003) e sua localização nuclear é vista predominantemente no componente estromal (KOESTERS et al. 2003). A expressão nuclear de APC foi identificada nos TWs e é apenas observada nos rins embrionários mais precoces, passando a ser citoplasmática conforme as células renais se diferenciam (MASCHIETTO et al. 2008).

Um outro braço da via Wnt, o Wnt/Cálcio, também foi associado aos TWs através da diminuição da expressão de WNT5A em TWs em relação aos rins fetais (TAMIMI et al. 2008) e também através da ausência de *PLCG2* nos TWs, semelhante aos rins fetais, e presente nas células diferenciadas dos rins maduros (MASCHIETTO et al. 2008).

A via Wnt é uma das vias de transdução de sinal e interage com diversas outras vias de sinalização celular como PI3K, HedgeHog, MAPkinase, NOTCH, entre outras. Em uma revisão mais detalhada da interação

das vias de transdução de sinal, um estudo indicou as prováveis ligações entre WNT, PI3K e genes envolvidos com o processo MET/EMT (LARUE e BELACOSA 2005).

Devido à associação da via de sinalização celular Wnt com a diferenciação das células e os TWs, e à sua íntima ligação com os genes da via de sinalização celular PI3K e com os genes associados à MET/EMT, esse estudo buscou identificar genes dessas vias que sejam determinantes para o surgimento do TW. Para isso, sequências representantes de 326 genes pertencentes às vias e MET/EMT foram imobilizados em uma lâmina de vidro customizada, a qual permitiu a caracterização do padrão de expressão em amostras de TWs de humanos e de quatro estágios temporais da nefrogênese de camundongos.

Dos 326 genes, 47 foram diferenciamente expressos entre TW e RD, sendo 18 menos e 29 genes mais expressos (p<0,05). Como diversos trabalhos na literatura vêm tentando fazer associações de ganhos e perdas de regiões genômicas em TWs (YUAN et al. 2005; TAMIMI et al. 2007), a localização cromossômica dos genes mais e menos expressos foi verificada em busca de dados concordantes de amplificações ou deleções cromossômicas. Entretanto, nenhuma região foi preferencialmente representada pelos genes mais ou menos expressos.

Em busca dos aspectos funcionais envolvidos nos TWs, os processos biológicos, função molecular e componenente celular representados pelos 47 genes foram anotados. Um dos processos biológicos superrepresentados foi estabelecimento de polaridade de tecidos, representada

pelos genes *FZD2* e *VANGL2*. Esses dois genes fazem parte do braço de sinalização WNT/Cálcio. Dentre os genes pertencentes a esse braço, está o *PLCG2*, que mostramos previamente ser importante durante a nefrogênese e que aparentemente está envolvido com o surgimento do TW. O outro processo biológico super-representado, percepção sensorial, parece não ter uma relação direta com os TWs, mas a função dos genes classificados nessa categoria (*EYA4*, *PAX2*, *EYA3*, *CDS1*, *TIMP3*, *GRK7*) pode estar relacionada com a diferenciação e especialização das células renais.

Duas funções moleculares foram super-representadas: ligantes de fator de crescimento tipo insulina, representados por *IGF2* e *IGF1R*, dois genes que foram previamente associados aos TWs por outros trabalhos (NATRAJAN et al. 2006; BJORNSSON et al. 2007), e ligante de heparina representada por *COL5A1* e *HDGF*. As funções dos genes classificados nas categorias citadas serão discutidas mais adiante.

Dois domínios protéicos foram super-representados nos 47 genes. Frizzled, composto por uma família de receptores de membrana, cuja porção intracelular se acopla a proteínas G. As proteínas dessa família são essenciais durante o desenvolvimento como determinação do destino, adesão, polaridade, migração e proliferação celulares (MALBON 2004). Proteínas com domínio Frizzled são receptores da via de sinalização Wnt e estão envolvidas com a estabilidade de β-catenina e mobilização de Ca²⁺ intracelular (DANN et al. 2001).

O outro domínio, PI3K C2 pertence à família de enzimas fosfatidilinositol-3-quinases (PI3K), que são capazes de fosforilar a porção 3'

do anel de inositol de proteínas fosfatidilinositol (PtdIns) (LEEVERS et al. 1999). As PI3K interagem com receptores de insulina para regular a disponibilidade de glicose para diversos eventos de fosforilação, sendo importantes para a regulação da via de insulina na célula (KNIGHT et al. 2006).

O estudo comparativo do tumor embrionário com estágios do desenvolvimento do respectivo órgão tem como idéia a identificação de genes regulados durante o desenvolvimento do rim que estejam relacionados com os mecanismos envolvidos na formação do TW. Para tanto, esse estudo isolou apenas as células precursoras renais em todos os seus estágios de diferenciação na nefrogênese normal (do mesenquima metanéfrico até as células renais diferenciadas) e, baseado em um estudo prévio que identificou o componente blastematoso como o componente com expressão gênica global mais semelhante aos estágios iniciais do rim embrionário, apenas as células blastematosas dos TWs foram isoladas.

Nesse estudo, em busca de genes co-regulados nos TWs e durante a nefrogênese, os rins diferenciados, em humanos e em camundongos foram usados como um ponto comum para as comparações com os TWs e a nefrogênese normal, respectivamente. Genes menos e mais expressos nos TWs foram comparados aos genes que apresentaram alterações similares no primeiro em relação ao último estágio de rim embrionário. Essa comparação revelou 18 genes.

A clusterização hierárquica não supervisionada baseada no padrão de expressão dos 18 genes discriminou os TWs dos rins mais precoces, e

ambos dos rins diferenciados. Essa clusterização valida tanto a hipótese biológica, quanto o modelo proposto uma vez que amostras parecidas se agrupam juntas, independente da sua origem ser humana ou murina. Como são genes regulados durante a nefrogênese e alterados no TW em relação ao rim diferenciado, esses 18 genes devem ter um papel importante no surgimento do TW.

Alguns desses genes já haviam sido identificados como envolvidos nos dois processos como *IGF*2 (SCOTT et al. 1985; HARUTA et al. 2008), *PAX*2 (TAMIMI et al. 2008) e *CRABP*2 (GUPTA et al. 2008).

Esses 18 genes foram avaliados em grupos independentes de amostras de duas formas. A expressão do RNAm de 12 genes foi avaliada através de qRT-PCR no grupo inicial dos quais 9 genes (*CRABP2*, *HDGF*, *HIPK1*, *IGF2*, *PAX2*, *SHPK*, *TESK1*, *TIMP3* e *WNT5B*) confirmaram a expressão. Se critérios menos restritos fossem utilizados, desconsiderando o nível de diferença de expressão, *PIK3CA*, um gene que tem sido associado a diversas neoplasias malignas, também seria validado, aumentando a porcentagem de concordância dos dados de 75% para 83,3%. No entanto, um trabalho desenvolvido no laboratório estimou que existe uma variação na medida de expressão gênica relativa gerada por qRT-PCR (FERREIRA et al. 2009), e sugere usar diferença de expressão maior de 2,8 vezes para aumentar a chance de identificar genes com diferença real de expressão.

Os 9 genes validados foram avaliados no grupo independente de 35 amostras de TW e 13 amostras de RD por qRT-PCR, sendo que *CRABP2*, *IGF2*, *PAX2*, *TIMP3* e *WNT5B* foram confirmados. Além dos critérios

restritivos, pelo menos parte da não validação dos 4 genes restantes provavelmente se deve à manipulação das amostras, já que estes foram selecionados a partir de amostras microdissecadas a *laser* e a validação usou amostras enriquecidas para as células de interesse, retendo uma contaminação de outros tipos celulares que devem influenciar a expressão gênica.

CRABP2, IGF2, GRK7, TESK1, HDGF, WNT5B, FZD2 e *TIMP3* também foram avaliados através da expressão proteica por IHQ. Em um primeiro momento, essa análise levou em consideração a intensidade de marcação em 145 amostras de TW em relação a 20 amostras de rim diferenciado e alcançou um nível relativamente alto de concordância com a expressão do RNAm (66,7%). Por não apresentar uma quantificação exata da expressão proteica, o nível de concordância entre a expressão da proteína por a IHQ e do RNAm não é muito alto na literatura. Adicionalmente, existem mecanismos de regulação da transcrição e da tradução como *splicing* alternativo, microRNA, ubiquitinação, fosforilação, que podem diminuir a concordância entre o nível de expressão RNAm e de proteína.

Por outro lado, a localização da positividade das proteínas pode ser tão ou mais importante do que a quantidade, indicando que a caracterização do momento da expressão e da localização de cada proteína nas células do TW e nos estágios da nefrogênese é necessária.

Ao ser avaliada por RNAm, *HIPK1* foi encontrada mais expressa nos rins diferenciados do que nos TWs, e portanto, com uma expressão

crescente durante a nefrogênese. *HIPK1* (*Homeodomain interacting protein kinase* 1), localizado em 1p13.2, codifica para uma proteína que pertence à família de serina-treonina quiase, com a função de fosforilar e reprimir fatores de transcrição, proteínas modificadoras de cromatina, proteínas transdutora de sinal citoplasmáticas e de membrana (KONDO et al. 2003; LI et al. 2005; ISONO et al. 2006). A função de *HIPK1* overlapa com a função de *HIPK2* na regulação das proteínas tanto nas células em diferenciação quanto nas diferenciadas (ISONO et al. 2006). Experimentos funcionais de *HIPK1* indicam que este reprime a via de sinalização Wnt/β-catenina em células de rins embrionários. Esse mecanismo provavelmente se dá através regulação de proteínas *dishevelled*, que apresentam homeodomínios reconhecidos por *HIPK1* (LOUIE et al. 2009). Esses dados podem sugerir que a perda da expressão de *HIPK1* em TWs contribui, pelo menos em parte, com a manutenção da ativação via Wnt/β-catenina nas células.

PAX2 foi mais expresso nos TWs do que nos rins diferenciados e com expressão decrescente durante a nefrogênese ao nível de RNAm, o que está em acordo com os dados da literatura. *PAX2* (*Paired box gene 2*), localizado em 10q24, pertence a uma famíla de fatores de transcrição com domínio conservado *paired box* que se liga especificamente ao DNA (TREISMAN et al. 1991). Sua expressão foi encontrada nas estruturas epitelais dos rins embrionários e em TWs e parece ter um papel fundamental na MET do rim (ECCLES et al. 1992; DRESSLER e DOUGLASS 1992; DRESSLER 1996), sendo que a provável relação de *PAX2* com a MET se dá através da indução da expressão de *WT1* (DEHBI et al. 1996; PATEK et al.

2003). Mutações de *PAX*2 resultam em hipoplasia renal, mas não foram encontradas em TWs (TAMIMI et al. 2008).

CRABP2, IGF2, TIMP3 e WNT5B, além de terem sido analisados através da expressão do RNA mensageiro, também tiveram suas proteínas codificadas avaliadas.

O aumento da expressão de CRABP2 em TW em relação aos rins maduros foi confirmada tanto ao nível de RNAm guanto de proteína. Na nefrogênese, CRABP2 foi observada no citoplasma especificamente nas células que estavam passando pelo MET, ou seja, até o momento de as células se organizarem em uma vesícula próxima ao tubo uretérico. Quando essas células terminam a diferenciação e adotam a morfologia epitelial, CRABP2 é silenciado e assim permanece por toda a diferenciação celular e nas células renais diferenciadas. Já o componente blastematoso dos TWs, além de reter a expressão de CRABP2 no citoplasma, ganha a marcação nuclear. A marcação citoplasmática mostra que existe uma recapitulação do padrão de expressão de CRABP2 dos TWs, paralela à MET que ocorre durante nefrogênese. Já a marcação nuclear sugere que a proteína está exercendo uma função adicional nas células tumorais. CRABP2 (cellular retinoic acid binding protein 2), localizado em 1g21.3, é uma proteína que regula o acesso do ácido retinóico (vitamina A) ao núcleo da célula (SESSLER et al. 2005). A função de CRABP2 ainda não está clara. Em células epiteliais da pele parece estar associada com a regulação da proliferação e diferenciação através da via de sinalização Wnt/β-catenina (COLLINS e WATT 2008). Recentemente, CRABP2 foi descrito como mais

expresso em TWs (GUPTA et al. 2008), com tendência a ter maior expressão em tumores de estadios avançados (TAKAHASHI et al. 2002).

Em acordo com os dados da literatura, o aumento da expressão de IGF2 foi confirmado por RNAm e proteína nos TWs, em relação aos rins diferenciados. A proteína foi encontrada em mais de 80% das amostras de componente blastematoso de TW e em praticamente todos os estágios fetais, sendo que a marcação ficou mais fraca conforme as células se diferenciaram até serem negativas nos rins maduros. IGF2 (insulin-like growth factor 2) é uma proteína que age como fator de crescimento dependente de insulina e parece ter uma regulação autócrina da proliferação celular (CHAO et al. 2008). Está localizado em 11p15.5, uma região cromossômica regulada por imprinting genômico sendo que apenas o alelo paterno é expresso (DECHIARA et al. 1991). O aumento de expressão de IGF2 foi previamente envolvido em TW em relação aos rins diferenciados e com expressão semelhante a outros tecidos fetais, incluindo o rim (SCOTT et al. 1985; REEVE et al. 1985). Normalmente, o ganho de expressão de IGF2 é relacionado à perda de imprinting do alelo materno ou duplicação do alelo paterno nos tumores, o que não é observado em rins maduros adjacentes (PEDONE et al. 1994). Apesar desse aumento de expressão poder estar relacionado ao estágio de indiferenciação das células blastematosas, um estudo sugeriu que IGF2 pode estar envolvido com o processo de transformação das células renais (REEVE et al. 1985). Alterações de IGF2 foram descritas em quase 50% dos casos analisados por HARUTA el al. (2008).

IGF2 apresenta diversos domínios de ligação de WT1, o quel é um potente repressor de *IGF2 in vivo*. Assim, a super-expressão de *IGF2* em TW pode ser uma consequência da ausência anômala de expressão de *WT1*, sugerindo que esse gene regula negativamente a proliferação de células blastematosas limitando a expressão de *IGF2* nos rins fetais (DRUMMOND et al. 1992; HARUTA et al. 2008).

A expressão do RNAm de TIMP3 foi confirmada com menor expressão nos TWs em relação aos rins diferenciados. Já a expressão da proteína foi maior nos TWs. TIMP3 foi encontrado na membrana das células dos rins embrionários, sendo perdida nos glomérulos e mantendo-se citoplasmática nos túbulos dos rins diferenciados, sendo que essa marcação provavelmente é inespecífica. A maioria das amostras de componente blastematoso apresentou positividade citoplasmática e menos da metade foi positiva na membrana das células. TIMP3 (TIMP metallopeptidase inhibitor 3), localizado em 22q12.3, pertence a uma família de inibidores de metaloproteases de matriz extracelular. A expressão de TIMP3 parece ser regulada por apenas uma das isoformas WT1 (BAUDRY et al. 2002). Portanto, o aumento de expressão de TIMP3 observado nos rim pode ser relacionado ao status de diferenciação das células uma vez que foi proposto que esse gene pode ser um marcador de células dendríticas diferenciadas (OSMAN et al. 2002). TIMP3 também tem uma função independente de metaloproteinases porque codifica para um inibidor de angiogênese mediada por VEGF extremamente potente, e essa função está relacionada com o

bloqueio da ligação de VEGF ao seu receptor VEGFR2 inibindo a sinalização *downstream* (QI et al. 2003).

Ao se avaliar o RNAm, WNT5B foi mais expresso em TWs em relação aos rins diferenciados, mas não foi encontrada diferença na intensidade de marcação da proteína entre os dois grupos de amostras. Na nefrogênese, WNT5B tem a expressão restrita à membrana apical das células do blastema metanéfrico. Essa expressão se inicia no momento em que as células estão se organizando para formar as primeiras estruturas renais. Nesse momento, WNT5B é encontrado apenas na membrana celular apical dessas estruturas. Apesar de a maioria das amostras de componente blastematoso de TWs terem sido negativas para WNT5B, sugerimos que os dados de RNA mensageiro e proteína foram validados, já que a expressão protéica de WNT5B passa a ser obervada quando as células começam a se aglomerar. A detecção do RNAm provavelmente indica que uma sinalização da programação molecular para diferenciação da célula se iniciou. Como a expressão do RNAm é anterior à expressão da proteína, o comportamento decrescente identificado pelos experimentos de *microarray* deve indicar uma expressão momentânea do RNAm. Quando a proteína é traduzida e direcionada para a membrana, ela deve permanecer com uma função de manutenção da estrutura renal e a expressão do RNAm cessa. WNT5B (wingless-type MMTV integration site family - member 5B), localizado em 12p13.3, pertence à família de genes WNTs, com diversas funções durante o desenvolvimento como já descrito. Ainda não foi proposta uma função para WNT5B na literatura. Já se sabe que sua expressão está especificamente

associada à ativação da via de sinalização celular Wnt independente de βcatenina (HARDY et al. 2008

Além desses quatro genes avaliados ao nível de RNAm e proteína, mais quatro foram avaliados apenas em relação às proteínas.

Durante a nefrogênese, FZD2 é expressa em toda a membrana celular e algumas dessas células mantêm a positividade até a completa diferenciação. A maioria dos componentes blastematosos não expressou FZD2 apesar de uma porcentagem significativa (~35%) ser positiva.). A intensidade de marcação de FZD2 não foi diferente entre TW e rins diferenciados.

Nos tumores, FZD2 segue o mesmo padrão de marcação de WNT5B, ou seja, a partir do momento em que as células do compoenente blastematoso se aglomeram para formar as estruturas epiteliais do TW. Da mesma forma, consideramos que os dados de RNAm e proteína foram validados, uma vez que a expressão do RNAm é anterior à expressão da proteína. Para ambos os genes, sugerimos que quando a proteína é traduzida e direcionada para a membrana, ela deve permanecer com uma função de manutenção da estrutura renal e a expressão do RNA mensageiro pode ser mínima ou cessar. *FZD2 (frizzled homolog 2 (Drosophila))*, localizado em 17q21.1, pertence à família frizzled, cujas proteínas contém sete domínios transmembrana e são receptoras das proteínas de sinalização Wnt. Recentemente um estudo caracterizou o aumento da expressão de *FZD2* em rins fetais e em um enxerto de TW (METSUYANIM et al. 2009 Além de atuar na via Wnt/β-catenina (VERKAAR et al. 2009), FZD2 tem um papel importante na via Wnt/Cálcio (AHUMADA et al. 2006), sugerindo que FZD2 não é a proteína que define qual braço da via de sinalização celular Wnt sera ativado. Essa ativação pode ser dependente da protein ligante, como WNT5B, que ativa especificamenteo o braço via Wnt/Cálcio.

GRK7 apresentou positividade intensa em membrana e citoplasma no componente blastematoso dos TWs e nos rins embrionários, sendo que essa positividade fica mais fraca, mas ainda presente, nos rins maduros. *GRK7* (*G protein-coupled receptor kinase 7*), localizado em 3q21-q23, codifica para uma proteina ligante de nucleotídeo (proteína G)-acoplado a receptor quinase, uma subfamília da família das proteínas quinases serina-treonina. Os estudos publicados indicam que GRK7 é expressa especificamente nas células fotoreceptoras da retina (WEISS et al. 1998; CHEN et al. 2001; TACHIBANAKI et al. 2005; OSAWA et al. 2008). O mecanismo de controle da fosforilação e desfosforilação no resíduo Ser36 de *GRK7* é mediado pela via de sinalização PI3K (OSAWA et al 2008). Baseando-se na literatura, ainda não é possível sugerir um papel para a expressão dessa proteína em TWs.

A intensidade da marcação de TESK1 foi maior nos TW e nos primeiros estágios do rim fetal e negativa nos glomérulos dos rins maduros, sugerindo que a proteína possa estar exercendo um papel na organização do citoesqueleto das células do blastema metanéfrico. *TESK*1 (*testis-specific kinase* 1), localizado em 9p13, codifica para uma serina-treonina quinase

que fosforila cofilina, uma proteína ligante de actina capaz de estimular despolimerização e dissociação dos fragmentos de actina (BAMBURG et al. 1999; PANTALONI et al. 2001). Em cultura de células, o aumento de expressão de *TESK1* induz fosforilação de cofilina e reorganização de citoesqueleto, resultando em formação de adesão focal e fibras. Esses dados indicam que *TESK1* tem um papel crucial na reorganização do citoesqueleto de actina mediada por integrina e na movimentação celular (TSUMURA et al. 2005).

Da mesma forma que a expressão do RNA mensageiro nas amostras independentes, não foi observada variação da expressão protéica de HDGF entre TW e rins diferenciados ou mesmo durante a nefrogênese. Um trabalho que avaliou a expressão de HDGF durante o desenvolvimento de cérebro mostrou que também não houve alteração da expressão na diferenciação das células. No entanto, após o nascimento, ocorre uma diminuição da expressão protéica. Essa alteração da expressão foi identificada por western blot mas não por imunoistoquímica (ABOUZIED et al. 2004). HDGF (hepatoma-derived growth factor (high-mobility group protein 1-like)), localizado em 1q21-q23, codifica para uma proteina ligante de heparina que apresenta atividade mitogênica em fibroblastos (NAKAMURA et al. 1994). Apresenta um domínio PWWP, que parece se ligar ao DNA de forma não específica (LUKASIK et al. 2006).

Diversos trabalhos apontam para os precursores blastematosos ou metanéfricos renais como as células de origem dos TWs. A caracterização da localização das proteínas desreguladas nos TWs, em relação aos rins

diferenciados, e durante a embriogênese normal representada pelo painel de rins fetais humanos, juntamente com a morfologia caracteristicamente trifásica desses tumores, permite dizer que a célula que dá origem ao TW já sofreu os primeiros sinais indutores da diferenciação renal. Da mesma forma, o comportamento de alguns genes nos TWs como *CRABP2*, que é expresso nas células que sofreram sinalização para passar pela MET na nefrogênese, e também é expresso pelas células de componente blastematoso do TW, fortalece essa evidência.

Outros genes identificados nesse estudo com expressão semelhante nos TWs e no início da nefrogênese são *CDH6*, *FRAT2* e *FZD10*. *CDH6* é mais expresso nos TWs, codifica para uma caderina dependente de cálcio e com função na adesão célula-célula, sendo sua expressão necessária para o início do desenvolvimento do rim (KUBOTA et al. 2007). *FRAT2*, pouco expresso nos TWs, faz parte do complexo que envolve GSK3β cuja função é inibir a fosforilação de β-catenina previnindo sua degradação (YOST et al. 1998). *FZD10*, por homologia, tem uma função que se sobrepõe à função de *FZD2*, particularmente na via Wnt/CTNNB1, uma vez que o aumento de expressão de FZD10 foi relacionado com o aumento de expressão de βcatenina (TERASAKI et al. 2002).

Os genes selecionados com esses critérios restritos são candidatos a desempenharem um papel crucial durante a nefrogênese e nos primeiros eventos do surgimento do TW, sendo candidatos a marcadores moleculares. Alteração de expressão desses genes, em relação aos rins diferenciados, pode participar da interrupção da diferenciação das células do rim criando

uma condição permissiva para o aparecimento do tumor. Ao mesmo tempo, a desregulação desses genes provavelmente é um evento precoce na tumorigênese de Wilms, uma vez que apresentam o mesmo comportamento do início da nefrogênese.

Como consequência, estes genes devem estar presentes na maioria das células, assinalando-os como candidatos a alvos terapêuticos. Como esses genes são alterados no início da nefrogênese, sua desregulação deve estar presente na maioria das células tumorais, sendo candidatos ideais para serem explorados como alvos terapêuticos.

Em busca de marcadores moleculares preditivos da recaída em TW, os genes foram testados primeiro isoladamente para discriminação das amostras de recaída e não recaída, revelando *IGF2* como potencial marcador e *TESK1* mostrou uma tendência de discriminação. Nenhum dos genes foi previamente associado com o prognóstico de pacientes em tumores embrionários.

A expressão relativa de *IGF2* e *TESK1* nas amostras de TW que recaíram, em relação às amostras que não recaíram, apresentaram uma tendência de ser mais semelhante à expressão desses genes no rim maduro (Figura 26). Essa tendência poderia ser esperada já que o tecido com alto índice de proliferação é mais responsivo ao tratamento quimioterápico tradicional e, portanto, não sobrariam células tumorais viáveis para que ocorresse uma recaída tumoral.


Figura 26 - Tendência decrescente no nível de expressão medido por qRT-PCR nas amostras de TW que não recaíram (TW NR), TW que recaíram (TW R) e nos rins diferenciados (RM).

A combinação de *IGF2* e *TESK1* com os outros genes foi usada como uma tentativa de aumentar a robustez na discriminação das amostras. Três trios apresentaram mais de 80% de acerto na predição das amostras, de cujas combinações participaram os genes *HDGF*, *PIK3CA* e *PAX2*.

Recentemente, um trabalho publicou uma análise de hibridação genômica comparativa em TW relacionando a região onde *HDGF* está localizado, 1q21-q23, com a baixa resposta ao tratamento e à recaída tumoral (NATRAJAN et al. 2006). Adicionalmente, a expressão de HDGF foi relacionada à tumorigênese de diversos carcinomas e foi associado como um fator prognóstico independente de carcinomas hepatocelular (YOSHIDA et al. 2006), esofágico (YAMAMOTO et al. 2007), pâncreas (UYAMA et al. 2006), e na progressão da carcinogênese gástrica (MAO et al. 2008).

A baixa expressão de *PIK3CA* em TW em relação aos rins diferenciados foi descrita pela primeira vez e provavelmente está associado

com a resposta das células à insulina, uma vez que foi encontrado o aumento de expressão de *IGF*2 nesses tumores.

PIK3CA (phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide) codifica para uma proteína com uma subunidade catalítica que cataliza a fosforilação de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) para formar fosfatidilinositol 3,4,5-bifosfato (PIP3). PIP3 ativa a serina-treonina quinase AKT e outros efetores downstream para regular diversas funções celulares como proliferação, sobrevivência e migração (FRUMAN et al. 1998; VANHAESEBROECK et al. 2001). PIK3CA foi expressa em todas as células avaliadas (VANHAESEBROECK et al. 1997). Embriões de camundongo knockout para PIK3CA deixam de responder a fatores de crescimento (ZHAO et al. 2006), particularmente aqueles da via de sinalização da insulina (JIA et al. 2008) que envolve IGF2 e IGF1R. PIK3CA também é importante na diferenciação das células uma vez que fibroblastos de embriões de camundongo knockout para esse gene são incapazes de diferenciar para adipócitos (ZHAO et al. 2006). Alterações de PI3KCA foram associadas a diversos tipos de câncer através de amplificações, deleções e mutações missense. As mutações missense somáticas parecem contribuir com o atividade de PI3KCA e consequentemente, com aumento da а transformação celular em carcinomas (KARAKAS et al. 2006).

PAX2 é co-expresso com CnABP, cuja expressão foi relacionada com a promoção da proliferação e migração celulares (NGUYEN et al. 2009). Apesar de PAX2 ser um gene cujo aumento de expresão foi relacionado a

126

diversos carcinomas, não estão descritas associações com o prognóstico dos pacientes.

De forma geral, esse estudo buscou identificar genes cuja alteração na expressão possa estar associada com o surgimento do TW, usando uma abordagem no sentido de estabelecer um paralelo entre a nefrogênese e a tumorigênese de Wilms. *CRABP2*, *IGF2*, *WNT5B*, *PI3KCA* e *TIMP3* foram identificados como candidatos a estarem envolvidos com a interrupção do processo normal da nefrogênese, o que provavelmente leva a uma condição permissiva para o aparecimento do tumor.

6 CONCLUSÕES

- A plataforma construída nesse estudo foi validada como modelo para estudar o padrão de expressão gênica de TW em humanos e da nefrogênese em camundongos, uma vez que identificou um grupo de genes capaz de agrupar os primeiros estágios da nefrogênese em camundongos com o TW e discriminá-los dos rins moderadamente ou completamente diferenciados das 2 espécies.
- 2 Um grupo de 18 genes foi identificado, cujo nível de expressão dos primeiros estágios de diferenciação do rim foi recapitulado no TW, sendo, portanto, genes candidatos a estarem envolvidos com o aparecimento do tumor.
- 3 *CRABP2*, *IGF2*, *WNT5B*, *PI3KCA* e *TIMP3* tiveram a expressão do RNAm confirmada por qRT-PCR em um grupo independente de amostras.
- 4 A expressão das proteínas codificadas por *CRABP2*, *IGF2*, *GRK7*, *TESK1* e *HDGF* foi concordante com a expressão do RNAm e recapitula os primeiros estágios do desenvolvimento do rim pelo TW.

- 5 WNT5B, PI3KCA, FZD2, GRK7, TESK1 e TIMP3 foram identificados pela primeira vez nesse estudo como associados aos TWs e modulados durante nefrogênese.
- 6 Um trio de genes foi identificado, *IGF2, TESK1* e *PAX2,* cuja expressão combinada de RNAm foi capaz de discriminar amostras de blastema que apresentaram recidiva daquelas que não apresentaram.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. **EMBO J** 1997; 16:3797-804.

Abouzied MM, Baader SL, Dietz F, Kappler J, Gieselmann V, Franken S. Expression patterns and different subcellular localization of the growth factors HDGF (hepatoma-derived growth factor) and HRP-3 (HDGF-related protein-3) suggest functions in addition to their mitogenic activity. **Biochem J** 2004, 378:169-76.

Ahumada A, Slusarski, DC, Liu X, Moon RT, Malbon CC, Wang H. Signaling of rat frizzled-2 through phosphodiesterase and cyclic GMP. **Science** 2002; 298:2006-10.

Bamburg JR, McGough A, Ono S. Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. **Trends Cell Biol** 1999; 9:364-70.

Batlle E, Sancho E, Franci C, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. **Nat Cell Biol** 2000; 2:4-9.

Baudry D, Faussillon M, Cabanis MO, et al. Changes in WT1 splicing are associated with a specific gene expression profile in Wilms' tumour. **Oncogene** 2002; 21:5566-73.

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

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

Bjornsson HT, Brown LJ, Fallin MD, et al. Epigenetic specificity of loss of imprinting of the IGF2 gene in Wilms tumors. **J Natl Cancer Inst** 2007; 99:1270-3.

Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. **J Cell Sci** 2003; 116:499-511.

Boyer B, Valles AM, Tucker GC, Delouvee A, Thiery JP. Involvement of cell motility in tumor progression. **Symp Soc Exp Biol** 1993; 47:183-95.

Brader S, Eccles SA. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways in tumor progression, invasion and angiogenesis. **Tumori** 2004; 90:2-8.

Brennan KR, Brown AM. Wnt proteins in mammary development and cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2004; 9:119-31.

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

Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface. **J Cell Sci** 2006, 119(Pt 3):395-402.

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

Carrol RJ, Schneider H. A note on Levene's tests for equality of variances. **Letters** 1995, 3:191-4.

Chao W, D'Amore PA. IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease. **Cytokine Growth Factor Rev** 2008; 19:111-20.

Chen CK, Zhang K, Church-Kopish J, et al. Characterization of human GRK7 as a potential cone opsin kinase. **Mol Vis** 2001; 7:305-13.

Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. **Cell** 2006; 127:469-80.

Collins CA, Watt FM. Dynamic regulation of retinoic acid-binding proteins in developing, adult and neoplastic skin reveals roles for beta-catenin and Notch signalling. **Dev Biol** 2008; 324:55-67.

Comijn J, Berx G, Vermassen P, et al. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. **Mol Cell** 2001; 7:1267-78.

Dann CE, Hsieh JC, Rattner A, Sharma D, Nathans J, Leahy DJ. Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. **Nature** 2001; 412:86-90.

Davies JQ, de la Hall PM, Kaschula RO, et al. Hepatoblastoma--evolution of management and outcome and significance of histology of the resected tumor: a 31-year experience with 40 cases. **J Pediatr Surg** 2004; 39:1321-7.

De Calisto J, Araya C, Marchant L, Riaz CF, Mayor R. Essential role of noncanonical Wnt signalling in neural crest migration. **Development** 2005; 132:2587-97. DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. **Cell** 1991; 64:849-59.

Dehbi M, Ghahremani M, Lechner M, Dressler G, Pelletier J. The paired-box transcription factor, PAX2, positively modulates expression of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1). **Oncogene** 1996; 13:447-53.

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

Dejmek J, Säfholm A, Kamp Nielsen C, Andersson T, Leandersson K. Wnt-5a/Ca2+-induced NFAT activity is counteracted by Wnt-5a/Yes-Cdc42-casein kinase 1alpha signaling in human mammary epithelial cells. **Mol Cell Biol** 2006, 26:6024-36.

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

Dressler GR, Douglass EC. Pax-2 is a DNA-binding protein expressed in embryonic kidney and Wilms tumor. **Proc Natl Acad Sci USA** 1992; 89:1179-83.

Dressler GR. Pax-2, kidney development, and oncogenesis. **Med Pediatr Oncol** 1996; 27:440-4.

Drummond IA, Madden SL, Rohwer-Nutter P, Bell GI, Sukhatme VP, Rauscher FJ 3rd. Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1. **Science** 1992; 257:674-8.

Du SJ, Purcell SM, Christian JL, McGrew LL, Moon RT. Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in Xenopus embryos. **Mol Cell Biol** 1995; 15:2625-34.

Eccles MR, Wallis LJ, Fidler AE, Spurr NK, Goodfellow PJ, Reeve AE. Expression of the PAX2 gene in human fetal kidney and Wilms' tumor. **Cell Growth Differ** 1992; 3:279-89.

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

Ferreira EN, Maschietto M, Silva D, Brentani H, Carraro DM. Evaluation of quantitative RT-PCR using non amplified and amplified RNA. 2009. *In press*.

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.

Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. **Annu Rev Biochem** 1998; 67:481-507.

Fukuzawa R, Anaka MR, Weeks RJ, Morison IM, Reeve AE. Canonical WNT signaling determines lineage specificity in Wilms tumour. **Oncogene** 2009; 28:1063-75.

Garriock RJ, Krieg PA. Wnt11-R signaling regulates a calcium sensitive EMT event essential for dorsal fin development of Xenopus. **Dev Biol** 2007; 304:127-40.

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

Gessler M, König A, Arden K, et al. Infrequent mutation of the WT1 gene in 77 Wilms' Tumors. **Hum Mutat** 1994; 3:212-22.

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

Grieshammer U, Cebrián C, Ilagan R, Meyers E, Herzlinger D, Martin GR. FGF8 is required for cell survival at distinct stages of nephrogenesis and for regulation of gene expression in nascent nephrons. **Development** 2005; 132:3847-57.

Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, et al. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. **Cancer Res** 2003; 63:2172-8.

Gupta A, Kessler P, Rawwas J, Williams BR. Regulation of CRABP-II expression by MycN in Wilms tumor. **Exp Cell Res** 2008; 314:3663-8.

Hardy KM, Garriock RJ, Yatskievych TA, D'Agostino SL, Antin PB, Krieg PA. Non-canonical Wnt signaling through Wnt5a/b and a novel Wnt11 gene, Wnt11b, regulates cell migration during avian gastrulation. **Dev Biol** 2008; 320:391-401.

Haruta M, Arai Y, Sugawara W, et al. Duplication of paternal IGF2 or loss of maternal IGF2 imprinting occurs in half of Wilms tumors with various structural WT1 abnormalities. **Genes Chromosomes Cancer** 2008; 47:712-27.

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

He TC, Sparks AB, Rago C, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. **Science** 1998; 281:1509-12.

Hemavathy K, Ashraf SI, Ip YT. Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. **Gene** 2000; 257:1-12.

Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. **Cancer Sci** 2003; 94:575-81.

Huang CC, Gadd S, Breslow N, et al. Predicting relapse in favorable histology Wilms tumor using gene expression analysis: a report from the Renal Tumor Committee of the Children's Oncology Group. **Clin Cancer Res** 2009; 15:1770-8.

Huff V. Wilms tumor genetics: a new, UnX-pected twist to the story. **Cancer Cell** 2007; 11:105-7.

Iglesias DM, Hueber PA, Chu L, et al. Canonical WNT signaling during kidney development. **Am J Physiol Renal Physiol** 2007; 293:F494-500.

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

Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, et al. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. **Nature** 1999; 399:798-802.

Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K. Regulation of lymphoid enhancer factor 1/T-cell factor by mitogen-activated protein kinase-related Nemo-like kinase-dependent phosphorylation in Wnt/beta-catenin signaling. **Mol Cell Biol** 2003; 23:1379-89.

Isono K, Nemoto K, Li Y, et al. Overlapping roles for homeodomaininteracting protein kinases hipk1 and hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals. **Mol Cell Biol** 2006; 26:2758-71.

Itäranta P, Chi L, Seppänen T, et al. Wnt-4 signaling is involved in the control of smooth muscle cell fate via Bmp-4 in the medullary stroma of the developing kidney. **Dev Biol** 2006; 293:473-83.

Jawhari AU, Farthing MJ, Pignatelli M. The E-cadherin/epidermal growth factor receptor interaction: a hypothesis of reciprocal and reversible control of intercellular adhesion and cell proliferation. **J Pathol** 1999; 187:155-7.

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

Jia S, Liu Z, Zhang S, et al. Essential roles of PI(3)K-p110beta in cell growth, metabolism and tumorigenesis. **Nature** 2008; 454:776-9.

Kang Y, Massagué J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. **Cell** 2004; 118:277-9.

Karakas B, Bachman KE, Park BH. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. **Br J Cancer** 2006; 94:455-9.

Karner CM, Chirumamilla R, Aoki S, Igarashi P, Wallingford JB, Carroll TJ. Wnt9b signaling regulates planar cell polarity and kidney tubule morphogenesis. **Nat Genet** 2009; 41:793-9.

Kestler HA, Kühl M. From individual Wnt pathways towards a Wnt signaling network. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 2008; 363:1333-47.

Kho AT, Zhao Q, Cai Z, et al. Conserved mechanisms across development and tumorigenesis revealed by a mouse development perspective of human cancers. **Genes Dev** 2004; 18:629-40.

Kimelman D. Mesoderm induction: from caps to chips. **Nat Rev Genet** 2006, 7:360-72.

Kimelman D, Xu W. beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. **Oncogene** 2006, 25:7482-91.

Kinoshita N, lioka H, Miyakoshi A, Ueno N. PKC delta is essential for Dishevelled function in a noncanonical Wnt pathway that regulates Xenopus convergent extension movements. **Genes Dev** 2003; 17:1663-76.

Kispert A, Vainio S, McMahon AP. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. **Development** 1998; 125:4225-34.

Knight ZA, Gonzalez B, Feldman ME, et al. "A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling". **Cell** 2006; 125:733-47.

Kobayashi A, Kwan KM, Carroll TJ, McMahon AP, Mendelsohn CL, Behringer RR. Distinct and sequential tissue specific activities of the LIMclass homeobox gene Lim1 for tubular morphogenesis during kidney development. **Development** 2005; 132:2809-23.

Koesters R, von Knebel Doeberitz M. The Wnt signaling pathway in solid childhood tumors. **Cancer Lett** 2003; 198:123-38.

Kondo S, Lu Y, Debbas M, Lin AW, et al. Characterization of cells and genetargeted mice deficient for the p53-binding kinase homeodomain-interacting protein kinase 1 (HIPK1). **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:5431-6.

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

Kremenevskaja N, von Wasielewski R, Rao AS, Schöfl C, Andersson T, Brabant G. Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma. **Oncogene** 2005; 24:2144-54.

Kubota F, Murakami T, Mogi K, Yorifuji H. Cadherin-6 is required for zebrafish nephrogenesis during early development. **Int J Dev Biol** 2007; 51:123-9.

Kühl M. The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. **Front Biosci** 2004; 9:967-74.

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

Kuure S, Popsueva A, Jakobson M, Sainio K, Sariola H. Glycogen synthase kinase-3 inactivation and stabilization of beta-catenin induce nephron differentiation in isolated mouse and rat kidney mesenchymes. **J Am Soc Nephrol** 2007; 18:1130-9.

Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. **Oncogene** 2005; 24:7443-54.

Leevers SJ, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. **Curr Opin Cell Biol** 1999; 11:219-25.

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

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

Li CM, Kim CE, Margolin AA, et al. CTNNB1 mutations and overexpression of Wnt/beta-catenin target genes in WT1-mutant Wilms' tumors. **Am J Pathol** 2004; 165:1943-53.

Li W, Kessler P, Williams BR. Transcript profiling of Wilms tumors reveals connections to kidney morphogenesis and expression patterns associated with anaplasia. **Oncogene** 2005; 24:457-68.

Liang H, Chen Q, Coles AH et al. Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. **Cancer Cell** 2003; 4:349-60.

Lin Y, Liu A, Zhang S, et al. Induction of ureter branching as a response to Wnt-2b signaling during early kidney organogenesis. **Dev Dyn** 2001; 222:26-39.

Little J. **Epidemiology of childhood cancer**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization; 1999. Introduction; p.1-9. (IARC Scientific Publications n^o 149).

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2-\Delta\Delta$ CT method. **Methods** 2001; 25:402-8.

Liu C, Li Y, Semenov M et al. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. **Cell** 2002, 108:837-47.

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

Louie SH, Yang XY, Conrad WH, et al. Modulation of the beta-catenin signaling pathway by the dishevelled- associated protein Hipk1. **PLoS One** 2009; 4:e4310.

Lukasik SM, Cierpicki T, Borloz M, Grembecka J, Everett A, Bushweller JH. High resolution structure of the HDGF PWWP domain: a potential DNA binding domain. **Protein Sci** 2006; 15:314-23.

Maciel EO, Carvalhal GF, Silva VD, Batista EL Jr, Garicochea B. Increased tissue factor expression and poor nephroblastoma prognosis. **J Urol** 2009; 182:1594-9.

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.

Major MB, Camp ND, Berndt JD, et al. Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. **Science** 2007; 316:1043-6.

Makalowski W, Zhang J, Boguski MS. Comparative analysis of 1196 orthologous mouse and human full-length mRNA and protein sequences. **Genome Res** 1996; 6:846-57.

Malbon CC. Frizzleds: new members of the superfamily of G-protein-coupled receptors. **Front Biosci** 2004; 9:1048-58.

Mao J, Xu Z, Fang Y, Wang H, Xu J, Ye J, Zheng S, Zhu Y. Hepatomaderived growth factor involved in the carcinogenesis of gastric epithelial cells through promotion of cell proliferation by Erk1/2 activation. **Cancer Sci** 2008; 99:2120-7.

Martín-Blanco E. Regulation of cell differentiation by the Drosophila Jun kinase cascade. **Curr Opin Genet Dev** 1997; 7:666-71.

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

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.

Matsui T, Raya A, Kawakami Y, et al. Noncanonical Wnt signaling regulates midline convergence of organ primordia during zebrafish development. **Genes Dev** 2005; 19:164-75.

Metsuyanim S, Harari-Steinberg O, Buzhor E, et al. Expression of stem cell markers in the human fetal kidney. **PLoS One** 2009 21; 4:e6709.

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

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Câncer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade**. Rio de Janeiro: INCA, 2008.

Miyoshi Y, Iwao K, Nawa G, Yoshikawa H, Ochi T, Nakamura Y. Frequent mutations in the beta-catenin gene in desmoid tumors from patients without familial adenomatous polyposis. **Oncol Res** 1998; 10:591-4.

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

Morin PJ. beta-catenin signaling and cancer. **Bioessays** 1999, 21:1021-30.

Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. **Biotechniques** 1998; 24:954-8, 60, 2.

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

Muller T, Bain G, Wang X, Papkoff J. Regulation of epithelial cell migration and tumor formation by beta-catenin signaling. **Exp Cell Res** 2002; 280:119-33.

Nakamura H, Izumoto Y, Kambe H, et al. Molecular cloning of complementary DNA for a novel human hepatoma-derived growth factor. Its homology with high mobility group-1 protein. **J Biol Chem** 1994; 269:25143-9.

Natrajan R, Reis-Filho JS, Little SE, et al. Blastemal expression of type I insulin-like growth factor receptor in Wilms' tumors is driven by increased copy number and correlates with relapse. **Cancer Res** 2006; 66:11148-55.

Nguyen AH, Béland M, Gaitan Y, Bouchard M. Calcineurin a-binding protein, a novel modulator of the calcineurin-nuclear factor of activated T-cell signaling pathway, is overexpressed in wilms' tumors and promotes cell migration. **Mol Cancer Res** 2009; 7:821-31.

Noselli S, Agnès F. Roles of the JNK signaling pathway in Drosophila morphogenesis. **Curr Opin Genet Dev** 1999; 9:466-72.

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

Nyengaard JR, Bendtsen TF. Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. **Anat Rec** 1992; 232:194-201.

Ogawa O, Eccles MR, Szeto J, et al. Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. **Nature** 1993; 362:749-51.

Osawa S, Jo R, Weiss ER. Phosphorylation of GRK7 by PKA in cone photoreceptor cells is regulated by light. **J Neurochem** 2008; 107:1314-24.

Osman M, Tortorella M, Londei M, Quaratino S. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases define the migratory characteristics of human monocyte-derived dendritic cells. **Immunology** 2002; 105:73-82.

Ouko L, Ziegler TR, Gu LH, Eisenberg LM, Yang VW. Wnt11 signaling promotes proliferation, transformation, and migration of IEC6 intestinal epithelial cells. **J Biol Chem** 2004; 279:26707-15.

Pantaloni D, Le Clainche C, Carlier MF. Mechanism of actin-based motility. **Science** 2001; 292:1502-6. Erratum in: **Science** 2001; 292:2012.

Park JS, Valerius MT, McMahon AP. Wnt/beta-catenin signaling regulates nephron induction during mouse kidney development. **Development** 2007; 134:2533-9.

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

Patek CE, Fleming S, Miles CG, et al. Murine Denys-Drash syndrome: evidence of podocyte de-differentiation and systemic mediation of glomerulosclerosis. **Hum Mol Genet** 2003; 12:2379-94.

Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. **Science** 2000; 287:1606-9.

Pedone PV, Tirabosco R, Cavazzana AO, et al. Mono- and bi-allelic expression of insulin-like growth factor II gene in human muscle tumors. **Hum Mol Genet** 1994; 3:1117-21.

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

Perotti D, Gamba B, Sardella M, et al. Functional inactivation of the WTX gene is not a frequent event in Wilms' tumors. **Oncogene** 2008; 27:4625-32.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res** 2001; 29:e45.

Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. An LDL-receptorrelated protein mediates Wnt signalling in mice. **Nature** 2000; 407:535-8. Plisov S, Tsang M, Shi G, et al. Cited1 is a bifunctional transcriptional cofactor that regulates early nephronic patterning. **J Am Soc Nephrol** 2005; 16:1632-44.

Qi JH, Ebrahem Q, Moore N, et al. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. **Nat Med** 2003; 9:407-15.

Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, et al. Relaxation of imprinted genes in human cancer. **Nature** 1993; 362:749-51.

Reeve AE; Eccles MR, Wilkins RJ, Bell GI, Millow LJ. Expression of insulinlike growth factor-II transcripts in Wilms' tumour. **Nature** 1985; 317:258-60.

Rivera MN, Haber DA. Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:699-712.

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

Rivera MN, Kim WJ, Wells J, et al. The tumor suppressor WTX shuttles to the nucleus and modulates WT1 activity. **Proc Natl Acad Sci USA** 2009; 106:8338-43.

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.

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

Saxén L, Sariola H. Early organogenesis of the kidney. **Pediatr Nephrol** 1987; 1:385-92.

Schedl A. Renal abnormalities and their developmental origin. **Nat Rev Genet** 2007; 8:791-802.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Mol Biol** 2006; 7:3.

Schüller U, Kho AT, Zhao Q, Ma Q, Rowitch DH. Cerebellar 'transcriptome' reveals cell-type and stage-specific expression during postnatal development and tumorigenesis. **Mol Cell Neurosci** 2006; 33:247-59.

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

Scott J, Cowell J, Robertson ME et al. Insulin-like growth factor-II gene expression in Wilms' tumour and embryonic tissues. **Nature** 1985, 317:260-2.

Seifert JR, Mlodzik M. Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. **Nat Rev Genet** 2007; 8:126-38.

Sessler RJ, Noy N. A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II. **Mol Cell** 2005; 18:343-53.

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

Shook D, Keller R. Mechanisms, mechanics and function of epithelialmesenchymal transitions in early development. **Mech Dev** 2003; 120:1351-83. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. **Cancer Res** 1998; 58:1130-4.

Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. **Nature** 1994; 372:679-83.

Strutt D. Frizzled signalling and cell polarisation in Drosophila and vertebrates. **Development** 2003; 130:4501-13.

Stuart RO, Bush KT, Nigam, SK. Changes in global gene expression patterns during development and maturation of the rat kidney. **Proc Natl Aca Sci USA** 2001; 98:5649-54.

Tachibanaki S, Arinobu D, Shimauchi-Matsukawa Y, Tsushima S, Kawamura S. Highly effective phosphorylation by G protein-coupled receptor kinase 7 of light-activated visual pigment in cones. **Proc Natl Acad Sci USA** 2005; 102:9329-34.

Takada R, Satomi Y, Kurata T, et al. Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. **Dev Cell** 2006; 11:791-801.

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

Tamai K, Semenov M, Kato Y, et al. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. **Nature** 2000; 407:530-5.

Tamimi Y, Dietrich K, Stone K, Grundy P. Paired box genes, *PAX-2* and *PAX-8*, are not frequently mutated in Wilms tumor. **Mutat Res** 2006; 601:46-50.

Tamimi Y, Ziebart K, Desaulniers N, Dietrich K, Grundy P. Identification of a minimal region of loss on the short arm of chromosome 1 in Wilms tumor. **Genes Chromosomes Cancer** 2007; 46:327-35.

Tamimi Y, Ekuere U, Laughton N, Grundy P. WNT5A is regulated by PAX2 and may be involved in blastemal predominant Wilms tumorigenesis. **Neoplasia** 2008; 10:1470-80.

Terasaki H, Saitoh T, Shiokawa K, Katoh M. Frizzled-10, up-regulated in primary colorectal cancer, is a positive regulator of the WNT - beta-catenin - TCF signaling pathway. **Int J Mol Med** 2002; 9:107-12.

Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. **Nature** 1999; 398:422-6.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. **Curr Opin Cell Biol** 2003; 15:740-6.

Thiery JP, Chopin D. Epithelial cell plasticity in development and tumor progression. **Cancer Metastasis Rev** 1999; 18:31-42.

Thiery JP, Morgan M. Breast cancer progression with a Twist. **Nat Med** 2004, 10:777-8.

Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. **J Cell Biol** 2003; 162:899-908.

Torban E, Dziarmaga A, Iglesias D et al. PAX2 activates WNT4 expression during mammalian kidney development. **J Biol Chem** 2006; 281:12705-12.

Treisman J, Harris E, Desplan C. The paired box encodes a second DNAbinding domain in the paired homeo domain protein. **Genes Dev** 1991; 5:594-604. Tsumura Y, Toshima J, Leeksma OC, Ohashi K, Mizuno K. Sprouty-4 negatively regulates cell spreading by inhibiting the kinase activity of testicular protein kinase. **Biochem J** 2005; 387:627-37.

Tu X, Joeng KS, Nakayama KI et al. Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKCdelta activation promotes bone formation. **Dev Cell** 2007; 12:113-27.

Ungar AR, Kelly GM, Moon RT. Wnt4 affects morphogenesis when misexpressed in the zebrafish embryo. **Mech Dev** 1995; 52:153-64.

Uyama H, Tomita Y, Nakamura H, et al. Hepatoma-derived growth factor is a novel prognostic factor for patients with pancreatic cancer. **Clin Cancer Res** 2006; 12:6043-8.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of realtime quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol** 2002; 18:RESEARCH0034.

Vanhaesebroeck B, Welham MJ, Kotani K, et al. P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997, 94(9):4330-5.

Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Ahmadi K, et al. Synthesis and function of 3phosphorylated inositol lipids. **Annu Rev Biochem** 2001; 70:535-602.

Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. **Dev Cell** 2003; 5:367-77.

Verkaar F, van Rosmalen JW, Smits JF, Blankesteijn WM, Zaman GJ. Stably overexpressed human Frizzled-2 signals through the beta-catenin pathway and does not activate Ca2+-mobilization in Human Embryonic Kidney 293 cells. **Cell Signal** 2009; 21:22-33.

Vuononvirta R, Sebire NJ, Dallosso AR et al. Perilobar nephrogenic rests are nonobligate molecular genetic precursor lesions of insulin-like growth factor-II-associated Wilms tumors. **Clin Cancer Res** 2008; 14:7635-44.

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

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

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

Weiss ER, Raman D, Shirakawa S, et al. The cloning of GRK7, a candidate cone opsin kinase, from cone- and rod-dominant mammalian retinas. **Mol Vis** 1998; 8:4:27.

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

Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. **Annu Rev Cell Dev Biol** 1998; 14:59-88.

Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, et al. Expression level of hepatomaderived growth factor correlates with tumor recurrence of esophageal carcinoma. **Ann Surg Oncol** 2007; 14:2141-9.

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

Yook JI, Li XY, Ota I, Fearon ER, Weiss SJ. Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. **J Biol Chem** 2005; 280:11740-8.

Yoshida K, Tomita Y, Okuda Y, et al. Hepatoma-derived growth factor is a novel prognostic factor for hepatocellular carcinoma. **Ann Surg Oncol** 2006; 13:159-67.

Yost C, Farr GH 3rd, Pierce SB, Ferkey DM, Chen MM, Kimelman D. GBP, an inhibitor of GSK-3, is implicated in Xenopus development and oncogenesis. **Cell** 1998; 93:1031-41.

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

Yuan E, Li CM, Yamashiro DJ, et al. Genomic profiling maps loss of heterozygosity and defines the timing and stage dependence of epigenetic and genetic events in Wilms' tumors. **Mol Cancer Res** 2005; 3:493-502.

Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. **Nucleic Acids Res** 2005; 33:W741-8.

Zhao JJ, Cheng H, Jia S, et al. The p110alpha isoform of PI3K is essential for proper growth factor signaling and oncogenic transformation. **Proc Natl Acad Sci USA** 2006; 103:16296-300.

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, Hartmann O, Samans B, et al. Expression profiling of Wilms tumors reveals new candidate genes for different clinical parameters. **Int J Cancer** 2006; 118:1954-62.