

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS MARCADORES DE  
RESPOSTA TERAPÊUTICA PARA O TUMOR DE  
WILMS ATRAVÉS DE MICROARRAY USANDO  
PLATAFORMA DE cDNA CONTENDO GENES  
PERTENCENTES À VIA DO ÁCIDO RETINÓICO**

**FÁBIO DE SIMONE PICCOLI**

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

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro**

**Co-orientadora: Dra. Beatriz de Camargo**

**São Paulo**

**2010**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Piccoli, Fábio De Simone

**Identificação de potenciais marcadores de resposta terapêutica para o tumor de wilms através de microarray usando plataforma de cDNA contendo genes pertencentes à via do ácido retinóico** / Fábio De Simone Piccoli -- São Paulo, 2010.

142p.

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. EVOLUÇÃO CLÍNICA. 3. ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA. 4. MICROARRAY. 5. ÁCIDO RETINÓICO 5. COMPONENTE BLASTEMATOSO

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico este estudo às crianças portadoras de tumor de Wilms, afinal, nada disto teria sentido se não fosse por elas.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Marina e Walter, e ao meu irmão Pedro, por todo o apoio, incentivo, respeito e, lógico, carinho sempre presentes.

Agradeço especialmente à Dra. Dirce, orientadora deste trabalho, não só por ter aceitado me orientar e por tê-lo feito com muita presença, disposição e com um contagiante entusiasmo mas, principalmente, por toda a paciência, respeito e compreensão com minha pouca disponibilidade.

Agradeço à Dra. Beatriz, minha co-orientadora, por ter acompanhado toda esta minha jornada com tumores de Wilms através do meu mestrado e doutorado, com idéias, sugestões, informações e todo o seu conhecimento em tumores de Wilms, sendo uma referência sempre acessível.

Faço um agradecimento muito especial à Mariana Maschietto, parceira de jornada com tumores de Wilms, pela imensurável ajuda em todos os sentidos, desde a parte experimental e analítica deste estudo até todo o suporte durante a redação da tese, sempre disponível mesmo que muito ocupada. Certamente teria sido muito mais difícil sem sua ajuda. Muito, muito obrigado!

Agradeço a todas as pessoas do Laboratório de Biologia Molecular do Câncer do Hospital A. C. Camargo, onde este estudo foi realizado, pela companhia e amizade durante todo este período e por toda ajuda com a realização deste trabalho, em especial àqueles mais diretamente envolvidos, a citar: Louise, pela ajuda em geral e em todos os passos do *microarray*, sobretudo com as hibridizações; Ellen, pela ajuda com as lâminas e imagens do *microarray*; Eloisa, pelo preparo das amostras de RNA; Bruna, pela ajuda com a padronização das reações de PCR e Mariana, por tudo e mais um pouco.

Ao departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo pela importante colaboração, em especial ao Dr. Fernando Augusto Soares, responsável pelo departamento, pela revisão e microdissecção manual das amostras tumorais, à Dra. Isabela Werneck pelas análises imunoistoquímicas e à Dra. Renata Couldri pelas microdissecções à *laser*.

Ao departamento de pediatria do Hospital A.C. Camargo por ter sido onde tudo começou a por continuar sendo um local de trabalho, amizade e aprendizado. Agradeço à Dra. Cecília, responsável pelo departamento, pelo suporte com as amostras utilizadas no *tissue-array*, seus dados clínicos e análises estatísticas.

À Dra. Helena Brentani, responsável pelo Laboratório de Biologia Computacional do Hospital A.C. Camargo, pela colaboração na idealização das plataformas de *microarray* e pelo controle de qualidade das hibridizações.

Ao Dr. Alex Fiorini de Carvalho pela confecção das plataformas e pelo suporte com o *microarray*.

Ao Dr. Paul Grundy (*Stollery Children's Hospital*, Canadá) e ao Dr. Jeffrey Dome (*St. Jude Children's Research Hospital*, EUA), em nome do *Children Oncology Group (COG)*, pelas amostras tumorais.

À Dra. Elizabeth J. Perlman (*Children's Memorial Hospital*, EUA) por nos disponibilizar seus resultados para que pudéssemos utilizar em nosso estudo.

À pós-graduação, em nome do Dr. Fernando Augusto Soares, pela qualidade e seriedade deste curso e um especial obrigado à Ana Maria Kuninari e também à Luciana Pitombeira e à Vanuza Rodrigues pelo suporte, simpatia e companhia durante todo este período, principalmente na fase de redação da tese.

À equipe da biblioteca, Suely Francisco, Francyne Pólen Gomes de Lima e Jefferson de Oliveira pela ajuda na obtenção dos artigos e pelo competente trabalho, em especial à Suely pela revisão final desta tese.

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

Ao Dr. Ricardo Renzo Brentani, diretor presidente da Fundação Antônio Prudente - Hospital A.C. Camargo, pelas excelentes condições de trabalho.

À FAPESP pelo financiamento deste estudo e correções sugeridas.

À Dra. Simone Sredni e ao Dr. Luiz Fernando Lopes, membros da banca de qualificação, pelas correções e sugestões durante o andamento deste projeto.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem ler e argüir este trabalho.

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

## RESUMO

Piccoli FS. **Identificação de potenciais marcadores de resposta terapêutica para o tumor de Wilms através de *microarray* usando plataforma de cDNA contendo genes pertencentes à Via do Ácido Retinóico.** São Paulo; 2010. [Tese de doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O tumor de Wilms (TW) é a neoplasia renal maligna mais freqüente na população pediátrica e apresenta atualmente, altos índices de cura mesmo para os casos de doença metastática, mostrando que estes tumores são, na maioria das vezes, sensíveis ao tratamento. Entretanto, cerca de 20% dos pacientes são refratários aos esquemas terapêuticos disponíveis, sendo a resistência quimioterápica a principal responsável pelas falhas terapêuticas. Neste sentido, os atuais protocolos terapêuticos têm sido desenhados com o objetivo de reduzir o tratamento e, com isso, os riscos de complicações secundárias para os pacientes que cursam com bom prognóstico, restringindo as terapias mais intensas ao pequeno grupo de maus respondedores. Para isto, a identificação de pacientes potencialmente bons e maus respondedores ao tratamento quimioterápico no momento do diagnóstico torna-se de grande importância por permitir uma estratificação destes indivíduos em grupos de risco de falha terapêutica e, com isso, o desenvolvimento de um tratamento mais individualizado. Dentre os tipos histológicos que compõem o TW, o componente blastematoso é o que melhor se aplica ao estudo da resposta terapêutica uma vez que é responsável pelo potencial invasivo destes tumores e pode ser tanto sensível quanto resistente à quimioterapia. No entanto, existem poucos estudos moleculares sobre a resposta terapêutica dos TW enfocando o componente blastematoso isoladamente. Estudos têm mostrado um importante envolvimento de genes relacionados ao processo de diferenciação celular e à sensibilidade ao Ácido Retinóico (AR) nos TW, o que aponta para uma possível utilização do AR no tratamento destes tumores. Desta maneira, este projeto teve como objetivo ampliar a busca por genes diferencialmente expressos em amostras de TW de componente blastematoso com

diferentes perfis de resposta terapêutica, dando ênfase ao perfil de expressão de genes envolvidos com o metabolismo do AR. Através da utilização de duas plataformas de *microarray* de cDNA, uma delas contendo genes pertencentes à via do AR, avaliamos a expressão de cerca de 6.400 genes dos quais 29 genes foram selecionados como diferencialmente expressos entre amostras de TW de componente blastematoso de evolução clínica favorável (EF) e desfavorável (ED). Dois genes (*TSPAN3* e *NCOA6*) foram comprovados, por RT-PCR em tempo real, como mais expressos nos TW EF em um grupo independente de amostras, sendo que uma análise da expressão conjunta de um trio incluindo estes genes conseguiu discriminar amostras de TW EF e ED com uma sensibilidade de 78% e especificidade de 100%. A avaliação da expressão protéica de alguns dos genes selecionados por imunistoquímica através de *tissue-microarray* mostrou uma associação significativa entre marcação negativa da proteína MCM2 em amostras de TW de componente blastematoso de pacientes com estádios III e IV e a não realização de QT pré-operatória nestes pacientes. Os resultados encontrados poderão contribuir para uma melhor compreensão de mecanismos envolvidos na resposta terapêutica dos TW e os genes selecionados são potenciais candidatos a marcadores moleculares de prognóstico, auxiliando, desta maneira, não só a identificação de pacientes bons e maus respondedores ao tratamento, como também o desenvolvimento de estratégias para uma abordagem terapêutica mais individualizada.

## SUMMARY

Piccoli FS. **[Identification of molecular markers as predictors of adverse outcome in Wilms' tumors using cDNA microarray platforms including Retinoic Acid related genes.]** São Paulo; 2010. [Tese de doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Wilms' Tumor (WT) is the most common renal cancer in children. Nowadays, with the current therapeutic approach, more than 80% of the cases can be cured, even with metastatic disease. However, the 20% of relapses remain a significant clinical challenge being chemotherapy (CT) resistance the principal problem. In this context, current clinical and molecular research is directed toward the identification of new prognostic factors for patient stratification according to the risk of relapse for a more individualized therapeutic approach, aiming therapy reduction and minimal risk of secondary effects for patients undergoing good prognosis and focusing the most severe treatment on poor responders. Among WT's cellular components, the blastemal component is the most suitable for therapeutic response studies. Although highly invasive, this component can be sensitive or resistant to CT being, in such cases, responsible for most therapeutic failures. Thus, the identification of differences in gene expression between relapsed (R) and non-relapsed (NR) blastemal WT may help the understanding of clinical behavior of these tumors. But there are no molecular studies focusing therapeutic response of isolated blastemal component. Recent findings shows the involvement of cellular differentiation and retinoic acid related genes in WT biology, pointing to the putative use of RA in the treatment of these tumors. The aim of this study was to look for differentiated expressed genes including RA related genes between R and NR blastemal WT. Using two cDNA microarray platforms including RA signaling pathway genes, we analyzed close to 6,400 genes, from which were selected 29 differentially expressed genes between R and NR blastemal WT. Two of them (*TSPAN3* and *NCOA6*) were confirmed by quantitative Real time PCR as up-regulated in NR WT in an



independent WT sample set. The combined expression of *TSPAN3*, *NCOA6* and a third selected gene (trio) was able to discriminate R and NR samples with a sensitivity of 77.8% and a specificity of 100%. The protein expression analysis of some of selected genes by immunohistochemistry using a tissue microarray showed a significant association between MCM2 negative staining in stage III and IV blastemal WT samples and no administration of pre-operative CT in these patients. These results can contribute for a better understanding of WT CT response and the selected genes are putative molecular markers of prognosis that can be used to identify R and NR patients for a more individualized therapy.

## LISTAS DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Modelo matemático para quantificação relativa em RT-PCR em tempo real proposto por Pfaffl	54
<b>Figura 2</b>	Exemplo da avaliação da integridade de algumas das amostras de RNA do Grupo Inicial	60
<b>Figura 3</b>	Exemplo da avaliação da integridade do RNA de 5 amostras aleatórias de TW com o uso do <i>Bioanalyzer</i>	64
<b>Figura 4</b>	Distribuição dos fragmentos de aRNA de 11 das 24 amostras de TW microdissecadas a <i>laser</i> em gel de agarose 1%	67
<b>Figura 5</b>	Representação da fluorescência de todos os genes de uma lâmina	69
<b>Figura 6</b>	Gráficos representativos da normalização de <i>Lowess</i> .	71
<b>Figura 7</b>	Correlação de <i>Pearson</i> da Amostra BC1 - 7	71
<b>Figura 8</b>	Genes validados experimentalmente por RT-PCR em tempo real, selecionados a partir da plataforma Universal 4.8K003	79
<b>Figura 9</b>	Resultado da validação biológica por RT-PCR em tempo real dos genes selecionados a partir da plataforma Universal 4.8K003	81
<b>Figura 10</b>	Gráfico representando a análise discriminatória do trio <i>NCOA6</i> , <i>TSPAN3</i> e <i>CDOI</i> para as amostras com e sem recaída tumoral	83
<b>Figura 11</b>	Marcação imunistoquímica para as proteínas MCM2 e NCOA6	84
<b>Figura 12</b>	Resultado da validação por RT-PCR em tempo real dos genes selecionados a partir da plataforma de Vias de Sinalização Celular	97

## LISTAS DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Estadiamento clínico simplificado do TW	6
<b>Tabela 2</b>	Esquema terapêutico para TW unilaterais segundo o protocolo SIOP 2001	15
<b>Tabela 3</b>	Esquema terapêutico para TW segundo NWTS-5	16
<b>Tabela 4</b>	Características clínicas e resultado da quantificação do RNA das 26 amostras do grupo inicial microdissecadas manualmente e da referência universal, antes e após a amplificação	61
<b>Tabela 5</b>	Características clínicas e resultado da quantificação do RNA das 57 das amostras de TW do grupo independente provenientes do banco de amostras do <i>COG</i>	62
<b>Tabela 6</b>	Características clínicas e resultado da quantificação do aRNA das 24 amostras de TW do grupo inicial microdissecadas a <i>laser</i>	66
<b>Tabela 7</b>	Valores normalizados para as amostras de TW revelando a replicabilidade experimental em relação à incorporação dos fluoróforos (alexa 555 e alexa 647) entre as lâminas controle e <i>swap</i> através de correlação de <i>Pearson</i>	72
<b>Tabela 8</b>	Lista dos 10 genes diferencialmente expressos selecionados entre as amostras de TW EF e ED, a partir da plataforma Universal 4.8K003, considerando $p \leq 0,01$ e $fold\ ED/EF \geq 1,5$ e $\leq -1,5$	73
<b>Tabela 9</b>	<i>Primers</i> dos genes selecionados a partir da Plataforma Universal 4.8K003 e tamanho do fragmento amplificado ( <i>amplicom</i> )	75

<b>Tabela 10</b>	Valores da eficiência dos <i>primers</i> e a concentração de <i>primer</i> escolhida para o cálculo da expressão gênica nas amostras de TW stadiamento clínico simplificado do TW	77
<b>Tabela 11</b>	Resultado da validação experimental da expressão dos genes selecionados entre amostras de TW de evolução favorável (EF) e desfavorável (ED) em valores de <i>p</i> e de <i>fold</i>	78
<b>Tabela 12</b>	Genes selecionados para validação biológica a partir de plataforma de <i>microarray</i> 4.8K003, com localização cromossômica e função resumida	79
<b>Tabela 13</b>	Resultado da validação biológica da expressão dos genes validados experimentalmente por RT PCR em tempo real entre amostras de TW EF e ED em valores de <i>p</i> e de <i>fold</i> (ED/EF), incluindo os valores de <i>fold</i> (ED/EF) encontrados a partir do <i>microarray</i> e da etapa de validação experimental	81
<b>Tabela 14</b>	Resultado da análise dos trios de genes em número e percentagem de acertos para o total de amostras avaliáveis para os três genes simultaneamente, considerando amostras com e sem recaída tumoral, separadamente e em conjunto	82
<b>Tabela 15</b>	Distribuição das amostras avaliadas para MCM2 e NCOA6 em relação às variáveis clínicas analisadas, em número de amostras	86
<b>Tabela 16</b>	Análise estatística da comparação da marcação de MCM2 por imunohistoquímica com a realização ou não de QT pré-operatória em amostras de 33 indivíduos portadores de TW de componente blastematoso de estádios III e IV avaliadas através de TMA.	87

<b>Tabela 17</b>	Distribuição das amostras de TW de componente blastematoso em relação à marcação imunohistoquímica para MCM2, realização de QT pré-operatória e ocorrência de recaída, em número e percentagem de amostras	88
<b>Tabela 18</b>	Valores normalizados para as amostras de TW revelando a replicabilidade experimental em relação à incorporação dos fluoróforos (Cy3 e Cy5) entre as lâminas controle e <i>swap</i> através de correlação de <i>Pearson</i>	91
<b>Tabela 19</b>	Lista dos 11 genes diferencialmente expressos pertencentes à via do Ácido Retinóico, selecionados entre as amostras de TW EF e ED, a partir da plataforma de vias de Sinalização Celular, considerando $p \leq 0,05$ e $fold\ ED/EF \geq 1,2$ e $\leq -1,2$	93
<b>Tabela 20</b>	<i>Primers</i> dos genes selecionados a partir da plataforma de vias de sinalização celular e tamanho do fragmento amplificado ( <i>amplicom</i> )	94
<b>Tabela 21</b>	Valores da eficiência dos <i>primers</i> e a concentração de <i>primer</i> escolhida para o cálculo da expressão gênica nas amostras de TW	95
<b>Tabela 22</b>	Resultados da etapa de validação por RT-PCR em tempo real em valores de $p$ e $fold\ ED/EF$ resultante das análises de RT-PCR em tempo real e <i>microarray</i> dos 7 genes selecionados a partir da plataforma de Vias de Sinalização Celular	97

## LISTAS DE ABREVIATURAS

<b>AR</b>	ácido-retinóico
<b>aRNA</b>	RNA amplificado
<b>ATRA</b>	ácido trans-retinóico
<b>BSA</b>	Do inglês, <i>bovine serum albumin</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CEPID</b>	Centro de Excelência em Pesquisa, Inovação e Difusão
<b>COG</b>	Do inglês, <i>Children Oncology Group</i>
<b>CONEP</b>	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
<b>CT</b>	Do inglês, <i>Cycle threshold</i>
<b>Cy3</b>	Do inglês, <i>Cyanine 3 dye</i>
<b>Cy5</b>	Do inglês, <i>Cyanine 5 dye</i>
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>dATP</b>	deoxiadenosina tri-fosfato
<b>dCTP</b>	deoxicitosina tri-fosfato
<b>dGTP</b>	deoxiguanidina tri-fosfato
<b>dTTP</b>	deoxitirosina tri-fosfato
<b>dUTP</b>	deoxiuracila tri-fosfato
<b>DEPC</b>	di-etil pirocarbonato
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucléico
<b>dNTP</b>	deoxinucleotídeos tri-fosfato
<b>ds-DNA</b>	DNA de fita dupla
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>E</b>	eficiência
<b>ED</b>	evolução favorável
<b>EDTA</b>	Do inglês, <i>Ethylene Diamine TetrAcetic Acid</i>
<b>EF</b>	evolução favorável
<b>EMT</b>	Do inglês, <i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>
<b>FAPESP</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

<b>FWT1</b>	Do inglês, <i>Familial Wilms Tumor 1</i>
<b>FWT2</b>	Do inglês, <i>Familial Wilms Tumor 2</i>
<b>GCBTTW</b>	Grupo Cooperativo Brasileiro para o Tratamento do Tumor de Wilms
<b>hs.</b>	horas
<b>Kb</b>	quilobase
<b>LLA</b>	Leucemia Linfocítica Aguda
<b>LOH</b>	Do inglês, <i>Lost of heterozigosity</i>
<b>LOI</b>	Do inglês, <i>Lost of imprinting</i>
<b>M</b>	molar
<b>M:F</b>	relação masculino - feminino
<b>mG</b>	miligrama
<b>min.</b>	minutos
<b>mL</b>	mililitro
<b>mM</b>	milimolar
<b>mMol/L</b>	milimol/litro
<b>Mol/L</b>	mol/litro
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>ng</b>	nanograma
<b>nM</b>	nanomolar
<b>NWTS</b>	Do inglês, <i>National Wilms Tumor Study</i>
<b>NWTSG</b>	Do inglês, <i>National Wilms Tumor Study Group</i>
<b>p/v</b>	relação peso/volume
<b>pb</b>	par de base
<b>PBS</b>	Do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	Do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>pmol/μL</b>	picomol/microlitro
<b>pmoles</b>	picomoles
<b>PMT</b>	Do inglês, <i>photomultiplier tube</i>
<b>q.s.p.</b>	quantidade suficiente para
<b>QT</b>	quimioterapia
<b>RIN</b>	Do inglês, <i>RNA integrity number</i>
<b>RN</b>	restos nefrogênicos
<b>RNA</b>	ácido ribonucléico

<b>RNIL</b>	restos nefrogênicos intra-lobares
<b>RNPL</b>	restos nefrogênicos peri-lobares
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>RT-PCR</b>	Do inglês, <i>Reverse Transcriptase PCR</i>
<b>SDS</b>	sulfato dodecil de sódio
<b>SIOP</b>	Do francês, <i>Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique</i>
<b>SSC</b>	solução salina de citrato de sódio
<b>ss-DNA</b>	DNA de fita simples
<b>T.A.</b>	temperatura ambiente
<b>TAE</b>	tris-ácido acético-EDTA
<b>TMA</b>	Do inglês, <i>tissue-microarray</i>
<b>TRIS</b>	Do inglês, <i>Trishydroxymethylaminomethane</i>
<b>TW</b>	tumor de Wilms
<b>U</b>	unidade
<b>UKCCSG</b>	Do inglês, <i>United Kingdom Children's Cancer Study Group</i>
<b>UTR</b>	Do inglês, <i>untranslated region</i>
<b>V</b>	volts
<b>v/v</b>	relação volume/volume
<b>µg</b>	micrograma
<b>µL</b>	microlitro
<b>µm</b>	micrometro
<b>µM</b>	micromolar



# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	O Tumor de Wilms	1
1.2	O Tratamento do Tumor de Wilms	8
1.3	Alterações Genéticas no Tumor de Wilms	17
1.4	Análise da Expressão Gênica	27
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>32</b>
3.1	Aspectos Éticos	32
3.2	Colaboração Internacional	32
3.3	Material Biológico	33
3.3.1	Amostras Tumoraes	33
3.3.2	Amostra Calibradora	35
3.4	Microdissecção Manual e a <i>laser</i>	35
3.5	Preparo das Amostras	37
3.5.1	Amostras Não Microdissecadas a <i>laser</i>	37
3.5.1.1	Extração do RNA	37
3.5.1.2	Amplificação do RNA	38
3.5.2	Amostras Microdissecadas a <i>laser</i>	39
3.5.2.1	Extração do RNA	39
3.5.2.2	Amplificação do RNA	39
3.6	Síntese de cDNA	40
3.7	<i>Microarray</i>	41
3.7.1	Descrição das Plataformas de cDNA	41
3.7.1.1	Plataforma Universal 4.8K003	41

3.7.1.2	Plataforma de Vias de Sinalização Celular	42
3.7.2	Marcação e Hibridização	43
3.7.2.1	Marcação Plataforma Universal 4.8K003	43
3.7.2.2	Marcação Plataforma de Vias de Sinalização Celular	45
3.7.2.3	Hibridização	45
3.7.3	Captura das Imagens e Quantificação do Sinal	46
3.7.4	Pré-Análise das Lâminas Hibridizadas	47
3.7.4.1	Análise da intensidade de fluorescência	48
3.7.4.2	Análise da correlação entre a lâmina controle e a lâmina <i>swap</i>	48
3.7.4.3	Normalização das lâminas	48
3.8	Seleção dos Genes Diferencialmente Expressos	49
3.9	RT-PCR em tempo real	49
3.10	Imunoistoquímica	55
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>58</b>
4.1	Obtenção e Preparo das Amostras Tumorais	58
4.1.1	Extração e Amplificação do RNA	60
4.1.1.1	Amostras Não Microdissecadas a <i>Laser</i>	60
4.1.1.2	Amostras Microdissecadas a <i>Laser</i>	64
4.2	Síntese de cDNA	67
4.3	<i>Microarray</i>	68
4.3.1	Plataforma Universal 4.8K003	68
4.3.2	Plataforma de Vias de Sinalização Celular	90
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>99</b>
5.1	Plataforma Universal 4.8K003	104
5.2	Plataforma de Vias de Sinalização Celular	117
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>125</b>
6.1	Plataforma Universal 4.8K003128	125
6.2	Plataforma de Vias de Sinalização Celular	126

**ANEXOS**

**Anexo 1** Aprovação do projeto deste estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital A.C. Camargo

**Anexo 2** Protocolo para a amplificação do mRNA.

**Anexo 3** Protocolo para a marcação do cDNA.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O TUMOR DE WILMS

O tumor de Wilms (TW) ou nefroblastoma é uma neoplasia maligna primária do rim que acomete cerca de sete em cada milhão de crianças com idade inferior a 15 anos (STILLER e PARKIN 1990; BIRCH e BRESLOW 1995; GRUNDY et al. 2002), correspondendo a 98% dos tumores renais malignos na infância (BOWN et al. 2002) e a cerca de 6% do total de neoplasias malignas nesta população (STILLER e PARKIN 1990; GREEN et al. 1996; LAI e TAY 1999; GRUNDY et al. 2002). Algumas diferenças podem ser observadas em sua distribuição mundial sendo ligeiramente mais frequente em populações de origem negra, com uma incidência superior a 10 / 1.000.000 casos para negros norte-americanos e nigerianos (STILLER e PARKIN 1990) enquanto que uma menor incidência é descrita para populações de origem asiática, com cerca de 3 / 1.000.000 casos (STILLER e PARKIN 1990; DUCORE et al. 2004; HUNG et al. 2004). O Brasil é apontado como um dos países com alta incidência mundial de TW, tendo como referência as cidades de Goiânia e São Paulo cuja incidência anual é de cerca de 7 casos por milhão de crianças (PARKIN et al. 1988; STILLER e PARKIN 1990; DE CAMARGO et al. 2010). Em cerca de 95% dos casos, os TW são unilaterais, acometendo geralmente ambos os sexos na mesma proporção. Mais de 70% dos casos são diagnosticados antes dos cinco anos de idade, com um pico de incidência no segundo ano (STILLER e PARKIN 1990) e com uma idade média ao diagnóstico menor para os meninos do

que para as meninas (41,5 e 46,9 meses, respectivamente) (GREEN et al. 1996; GRUNDY et al. 2002). Para as populações de origem asiática, sobretudo provenientes do leste da Ásia, outras diferenças quanto à sua distribuição podem também ser observadas. Além de mais raro nesta população, observa-se um predomínio da incidência de TW em meninos, com uma relação M:F de até 1,5:1 e em crianças mais jovens, onde até 42% dos casos ocorrem em crianças menores de 1 ano em comparação a cerca de 15% em outras populações (GRUNDY et al. 2002). Estas variações na incidência mundial do TW, mais relacionadas a fatores étnicos do que geográficos, apontam para um maior envolvimento de fatores genéticos do que ambientais na gênese do TW (PRITCHARD-JONES e HAWKINS 1997; FUKUZAWA et al. 2004).

Ainda que a grande maioria dos TW seja unilateral e de ocorrência esporádica, 5 a 10% são bilaterais e 1 a 2% apresentam história familiar de TW sugerindo uma origem germinativa (PRITCHARD-JONES e HAWKINS 1997; DOME e COPPES 2002; GRUNDY et al. 2002). Nestes casos, a idade de aparecimento do tumor é mais precoce, sendo de 29,5 e 32,6 meses para meninos e meninas, respectivamente (GREEN et al. 1996; GRUNDY et al. 2002) e estão mais frequentemente associados a malformações congênitas, principalmente do trato geniturinário e a síndromes genéticas. A associação com síndromes genéticas ocorre em cerca de 2% dos TW e estes casos podem ser agrupados em dois grupos principais: síndromes com e sem aumento do crescimento. Dentre as síndromes sem aumento do crescimento, as mais frequentes são; a síndrome de *WAGR*, caracterizada por TW, aniridia, malformações do trato geniturinário e retardo mental; e a síndrome de *Denys-Drash*, caracterizada por esclerose mesangial difusa com falência renal

precoce, disgenesia gonadal XY e risco aumentado de TW. Dasquelas com aumento do crescimento, a mais frequentemente associada aos TW é a *síndrome de Beckwith-Wiedemann*, caracterizada por um aumento do crescimento que pode variar de gigantismo a hemihipertrofia, visceromegalia, macroglossia, hiperglicemia hiperinsulinêmica e predisposição ao desenvolvimento de neoplasias embrionárias, dentre elas o TW (PRITCHARD-JONES e HAWKINS 1997; GRUNDY et al. 2002; STRONG 2003; KO e RITCHEY 2009). Outras síndromes menos frequentes também podem estar acompanhadas de TW, como as síndromes de *Perlman*, *Frasier*, *Sotos*, *Simpson-Golabi-Behemel* e *Bloom*. Anomalias isoladas como aniridia esporádica, hemihipertrofia e malformações geniturinárias podem também ser acompanhadas de TW sem, contudo, caracterizar uma síndrome. As anomalias geniturinárias estão presentes em 4,5 a 7,5% dos pacientes com TW unilateral e em 13,4% dos casos de tumor bilateral (WIENER et al. 1998).

O TW é uma neoplasia embrionária originada a partir de erros no processo de diferenciação celular em estágios precoces do desenvolvimento metanéfrico, na transição epitélio-mesênquima, durante a nefrogênese normal (LAI e TAY 1999; LI et al. 2002). É constituído por três tipos histológicos principais que mimetizam os diferentes estágios do desenvolvimento renal normal: blastema, epitélio e estroma ou mesênquima. O blastema é constituído por pequenas células redondas indiferenciadas, análogas às células primitivas do blastema metanéfrico dos embriões. Os elementos epiteliais se apresentam principalmente sob a forma de estruturas tubulares e glomerulares embrionárias, estruturas papilares e rosetas. Os elementos mesenquimais geralmente são constituídos de tecido fibroconjuntivo, sendo que derivados mesodérmicos como músculo liso, músculo estriado, tecido

adiposo, cartilagem ou osso, podem estar presentes. A distribuição destes três elementos histológicos no tumor é variável, todos podendo coexistir em um mesmo espécime tumoral (tumores mono, di ou trifásicos), sendo que qualquer um dos três elementos pode predominar (GREEN et al. 1996; LAI e TAY 1999; GRUNDY et al. 2002; LI et al. 2002). Além de diferenças estruturais, os componentes histológicos do TW apresentam diferentes comportamentos quanto à resposta terapêutica. Os componentes epitelial e estromal são pouco responsivos à quimioterapia, entretanto, costumam ser também pouco agressivos. Já, o componente blastematoso é caracterizado por ser altamente invasivo, frequentemente associado a estádios avançados da doença, porém costuma apresentar alta sensibilidade à quimioterapia (BECKWITH et al. 1996; WEIRICH et al. 2001).

Sinais de falhas na diferenciação das células renais podem ser observados através da presença dos denominados restos nefrogênicos (RN), que são focos de tecido nefroblástico indiferenciado remanescente (células nefrogênicas) que persistem indevidamente após a conclusão do processo normal de nefrogênese no período embrionário (BECKWITH et al. 1990). Por serem células embrionárias residuais pluripotentes, os RN podem permanecer dormentes, involuir, diferenciar ou sofrer influência de fatores de crescimento e proliferação originando tecidos neoplásicos benignos ou malignos. Os RN são considerados como lesões precursoras do TW sendo encontrados em 25 a 40% dos TW esporádicos unilaterais e em cerca de 100% dos TW bilaterais (BECKWITH et al. 1990; BECKWITH 1993; PRITCHARD-JONES e HAWKINS 1997; LAI e TAY 1999), enquanto que estão presentes em somente 1% dos rins não tumorais (GRUNDY et al. 2002). Podem estar localizados no interior do lobo renal, denominados RN intralobares (RNIL), ou

na periferia do lobo renal, denominados RN perilobares (RNPL). Sua localização no rim reflete o momento do processo de diferenciação celular em que a falha ocorreu e está relacionada à apresentação morfológica do tumor. Como durante o processo de nefrogênese a diferenciação das células renais acompanha a migração do broto ureteral, a presença de RNIL sugere falhas em fases iniciais do desenvolvimento renal, quando as células blastematosas estão preferencialmente induzidas à diferenciação para tecido de sustentação, estando mais associada a anomalias congênitas e a tumores predominantemente mesenquimais. Já, a presença de RNPL é sugestiva de distúrbios mais tardios no desenvolvimento renal, quando as células blastematosas indiferenciadas estão restritas a pequenas áreas proliferativas distribuídas pela periferia dos lobos renais e induzidas à diferenciação para tecidos epiteliais como glomérulos e túbulos renais estando, neste caso, mais associada a tumores blastematosos e epiteliais (PRITCHARD-JONES e HAWKINS 1997; LAI e TAY 1999; HENNIGAR et al. 2001; RAVENEL et al. 2001; GRUNDY et al. 2002; SCHUMACHER et al. 2003; FUKUZAWA e REEVE 2007).

O TW tem como principais fatores de prognóstico o padrão histológico e o estadiamento (WIENER et al. 1998; WEIRICH et al. 2001; KO e RITCHEY 2009) sendo estes, portanto, os fatores mais amplamente utilizados na identificação dos diferentes grupos de risco e assim, determinantes da terapia instituída. O estadiamento baseia-se na extensão da doença, sendo reconhecidos cinco estádios principais para os TW conforme exposto na Tabela 1.



**Tabela 1** - Estadiamento simplificado de TW.

<b>Estádio I</b>	Tumor restrito ao rim, completamente ressecado.
<b>Estádio II</b>	Tumor se estende além do rim, porém restrito à loja renal e completamente ressecado.
<b>Estádio III</b>	Tumor se estende além do rim, ressecção incompleta, implantes peritoneais. (restrito ao abdome)
<b>Estádio IV</b>	Qualquer um dos estádios anteriores (E I - III) com disseminação hematogênica / metástases à distância.
<b>Estádio V</b>	Tumor bilateral.

De acordo com este estadiamento, os estádios I e II correspondem a tumores com potencial de ressecção completa sem doença residual. Os tumores de estágio III correspondem àqueles com doença residual local, seja por ressecção incompleta do tumor, presença de implantes peritoneais, infiltração linfonodal regional ou pela presença de trombo tumoral aderido ou infiltrativo em vasculatura extra-renal. Os tumores de estágio IV são todos aqueles com disseminação hematogênica à distância detectada, independente da extensão local do tumor primário (GREEN et al. 1996; GRUNDY et al. 2002; PERLMAN 2005).

Do ponto de vista histológico, os TW são classificados em histologia favorável e desfavorável tendo como base a ausência ou presença de anaplasia, respectivamente. A anaplasia está presente em cerca de 5 a 10% dos casos de TW, com uma incidência menor em crianças com menos de 2 anos de idade (2%) e maior em crianças com mais de 5 anos de idade (13%) (KO e RITCHEY 2009) e é definida pela presença de células com núcleo com grande aumento de tamanho em relação às células adjacentes ( $\geq 3$  vezes), com várias figuras mitóticas multipolares (poliplóide) e com conteúdo aumentado de cromatina (hipercromasia). Dependendo de sua topografia, a anaplasia pode ser focal ou difusa. A anaplasia focal é caracterizada

pela presença de células anaplásicas confinadas a uma ou poucas regiões bem delimitadas dentro do tumor primário, não podendo ser encontradas em nenhum local fora do parênquima renal. Por outro lado, a anaplasia é considerada difusa quando é encontrada em mais de um local do tumor, quando está presente em qualquer local fora do parênquima renal ou quando é detectada por biópsia randômica (BECKWITH e PALMER 1978; BONADIO et al. 1985; ZUPPAN et al. 1988; BECKWITH et al. 1996; FARIA et al. 1996; GREEN et al. 1996; WIENER et al. 1998; GRUNDY et al. 2002; PERLMAN 2005). A presença de anaplasia é um importante fator de pior prognóstico por estar relacionada principalmente à resistência quimioterápica devido à sua associação com mutações no gene *TP53* (BARDEESY et al. 1995). No entanto, o valor prognóstico da anaplasia está mais relacionado à sua distribuição do que à sua presença. Isto se deve ao fato de que a anaplasia focal, por estar restrita ao parênquima renal, faz com que o prognóstico tumoral, nestes casos, seja determinado pela ressecabilidade do tumor, possuindo desta maneira, o mesmo valor prognóstico dos casos não anaplásicos (histologia favorável). Já, os casos com anaplasia difusa cursam com maiores índices de recaída e óbito independente do estadiamento (BECKWITH et al. 1996).

O uso da quimioterapia pré-operatória possibilitou o acesso aos efeitos da quimioterapia sobre as células tumorais permitindo a identificação de diferentes padrões de resposta clínica e histológica à quimioterapia e a utilização desta resposta como critério de classificação para os TW com importância prognóstica (VUJANIC et al. 2002). No entanto, esta classificação não é adotada por todos os grupos de tratamento de TW e será melhor discutida a seguir.

## 1.2 O TRATAMENTO DO TUMOR DE WILMS

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

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

---

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

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

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

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

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

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

Os resultados dos mais recentes ensaios clínicos finalizados pelo *NWTSG* (*NWTS-5*, 1995-2002) e pela *SIOP* (*SIOP 2001*, 1993-2001) demonstraram que

ambos os grupos atingiram índices de sobrevida bastante elevados, com uma sobrevida global em 4 anos de 95% (*NWTS-5*) e 90% (*SIOP 2001*) para tumores de estádios I a III e de 81% para ambos os grupos considerando os estádios I a IV (D'ANGIO 2003; DE KRAKER et al. 2004).

Uma vez atingidos índices de cura tão expressivos e considerando a toxicidade das drogas utilizadas, principalmente para os estádios mais avançados como as cardiopatias secundárias ao uso da doxorubicina e as sequelas da radioterapia como alterações de crescimento e desenvolvimento, infertilidade e disfunções obstétricas, além do risco de neoplasias secundárias, o que acaba por comprometer a sobrevida destes pacientes (GREEN et al. 1996; D'ANGIO 2003; COTTON et al. 2009), surge a preocupação com a exposição desnecessária de uma grande parte dos pacientes aos efeitos deletérios de um tratamento muitas vezes excessivo, ao passo que poderiam se beneficiar com uma terapia mais branda e com uma menor morbidade, sem aumentar os riscos de recidiva da doença. Para isto, torna-se de fundamental importância poder diferenciar, no momento do diagnóstico, os tumores mais sujeitos a falhas terapêuticas e que devem receber esquemas terapêuticos mais agressivos, daqueles tumores que podem receber uma terapia mínima necessária para manter os índices de cura.

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

terapêutica e ao risco de recaída a partir de características próprias de cada espécime tumoral, possibilitando assim o desenvolvimento de uma terapia mais individualizada (WIENER et al. 1998; BOCCON-GIBOD et al. 2000; PRITCHARD-JONES 2002; DE KRAKER et al. 2004).

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

fator de prognóstico acaba por ter um impacto restrito na sobrevida se levarmos em conta a totalidade dos casos de TW.

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

Tendo como base a resposta à QT pré-operatória, a *SIOP* propôs, em 1994, uma classificação para os tumores renais da infância (DELEMARRE et al. 1996), a partir da qual foi desenvolvido o estudo e ensaio clínico *SIOP-9* cujo objetivo era analisar os diferentes componentes histológicos do TW quanto aos efeitos da QT pré-operatória e sua implicação prognóstica. Através deste estudo (WEIRICH et al. 2001), foi possível observar que o componente blastematoso é, dentre os componentes histológicos do TW, o de maior impacto no prognóstico por ser o mais relacionado tanto à agressividade tumoral quanto à resistência quimioterápica (BECKWITH et al. 1996). A agressividade natural destes tumores pode ser observada por sua maior associação a estádios avançados. No entanto, na maioria dos casos, esta agressividade é compensada por uma alta sensibilidade à QT, observada pelos altos índices de necrose tumoral após a exposição à QT pré-operatória, o que parece ser responsável pelo ótimo prognóstico associado a estes tumores. Entretanto, em cerca de 10 a 20% dos casos, o componente blastematoso está presente e predominante no momento da cirurgia, indicando uma resistência natural à QT realizada na etapa pré-operatória, sendo estes os tumores que mais frequentemente



associam-se à recidiva. Por este motivo, os tumores deste tipo, caracterizados por uma associação entre agressividade e resistência quimioterápica, têm sido vistos, pela *SIOP*, como os de pior prognóstico dentre os demais subtipos (BECKWITH et al. 1996; WEIRICH et al. 2001; BECKWITH 2002; VUJANIC et al. 2002).

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

pré-operatória. Este grupo corresponde aos tumores aparentemente resistentes à QT recebendo, conseqüentemente, terapia pós-operatória agressiva com a inclusão de outros agentes quimioterápicos e da radioterapia (Tabela 2).

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

Fase Pré – operatória		Fase Pós – operatória				
Estadiamento	QT	Estadiamento local do tumor primário	QT	RxT		
Tumores não metastáticos (E I – III)	V + A 4 semanas	BR	Nenhuma	Não		
		E I	RI	V + A	Não	
			AR	V + A + D	Não	
		E II	BR	V + A	Não	
			RI	V + A (+ D)*	Não	
			AR	VP + C + D + CTX	Sim	
		E III	BR	V + A	Não	
			RI	V + A (+ D)*	Sim	
			AR	VP + C + D + CTX	Sim	
	Tumores metastáticos (E IV)	V + A + D 6 semanas	E I / II	RC	V + A + D	Não
				RP	VP + C + D + CTX	Não
			E III	RC	V + A + D	Sim
			RP	VP + C + D + CTX	Sim	
E I – III			AR	VP + C + D + CTX	Sim	

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

**Tabela 3** - Esquema terapêutico para TW segundo *NWTS-5*.

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

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

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

### 1.3 ALTERAÇÕES GENÉTICAS NO TUMOR DE WILMS

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

Algumas características presentes nos TW, como a existência de variações em sua distribuição populacional e etária, a presença de tumores uni e bilaterais e de casos com historia familiar e sua associação com diferentes anomalias congênitas e síndromes genéticas, foram de fundamental importância para a identificação das alterações genéticas relacionadas a estes tumores. A associação dos TW com a aniridia permitiu a detecção de uma região cromossômica comum a estas características que foi posteriormente identificada como sendo a região 11p, região esta deletada em cerca de 40% dos TW por perda de heterozigose (*LOH*) (GREEN et al. 1996; STRONG 2003; FUKUZAWA e REEVE 2007). Dois *locus* independentes em 11p se mostraram relacionados aos TW: 11p13 e 11p15.

A análise da região 11p13 em indivíduos com síndrome de *WAGR* levou à identificação do primeiro e principal gene relacionado à patogênese do TW, o gene *WT1*, e a deleção de 11p13 nestes pacientes permitiu a localização de outros genes localizados contigüamente nesta região como é o caso do gene *PAX6*, responsável pela aniridia presente nesta síndrome (DOME e COPPES 2002; GRUNDY et al.

2002). O gene *WT1*, geralmente considerado um gene supressor de tumor, codifica um fator de transcrição do tipo *zinc finger* e atua como regulador de transcrição durante a diferenciação renal regulando a transcrição de diversos outros genes. Sua expressão é necessária para a sobrevivência e diferenciação do blastema metanéfrico durante o desenvolvimento geniturinário e na interação com genes envolvidos na determinação sexual. Apesar de necessitar da perda funcional dos dois alelos para o desenvolvimento tumoral segundo a teoria de Knudson (KNUDSON 1971), sabe-se hoje que alterações específicas em apenas um dos alelos de *WT1* podem contribuir para um crescimento celular anormal, o que caracteriza nestes casos uma função oncogênica dominante negativa. Isto pode ser observado na síndrome de *Denys-Drash*, resultante de mutações pontuais disfuncionais em um único alelo de *WT1*, onde a proteína mutada exerce um efeito inibitório sobre a proteína selvagem resultando em um fenótipo mais severo em comparação ao da síndrome de *WAGR*. Alterações em *WT1*, sejam elas mutações pontuais ou deleções completas, são raras nos TW esporádicos estando principalmente associadas a síndromes predisponentes não só para TW, como as síndromes de *WAGR* e *Denys-Drash*, como também para outros tumores e mal-formações do trato geniturinário como é o caso do gonadoblastoma e do pseudo-hermafroditismo na síndrome de *Frasier* (DILLER et al. 1998; DOME e COPPES 2002), sustentando seu envolvimento no desenvolvimento geniturinário e no processo de diferenciação sexual (LAI e TAY 1999; GRUNDY et al. 2002). No entanto, ainda que grande parte dos TW apresentem *LOH* na região 11p, mutações ou deleções em *WT1* estão presentes em somente 10 a 20% dos TW, sendo mais frequentes em tumores de diferenciação

mesenquimal, evento este pouco significativo para os tumores de predomínio blastematoso (SCHUMACHER et al. 2003).

Por outro lado, alterações em 11p15 são muito mais frequentes nos TW esporádicos. Denominada de *locus* WT2, esta região foi identificada a partir da observação de que parte dos TW com *LOH* em 11p apresentavam envolvimento da região 11p15 e não 11p13, além do fato de ser este o *locus* responsável pela síndrome de *Beckwith-Wiedemann*, associada a um risco aumentado de TW. Esta é uma região de *imprinting* genômico, que é um mecanismo epigenético responsável pelo silenciamento de um dos alelos de um gene, paterno ou materno, resultando na expressão monoalélica parental preferencial deste gene. De uma série de genes com expressão parental preferencial localizados nesta região, três puderam ser relacionados aos TW: os genes *IGF2*, *H19* e *CDKN1C*. Os genes *IGF2* e *H19* têm expressão regulada por metilação e apresentam funções antagônicas. O gene *IGF2*, cuja expressão é proveniente do alelo paterno, codifica um fator de crescimento embrionário. A perda do mecanismo de *imprinting* (*LOI*) do alelo materno leva à expressão bialélica deste gene e o conseqüente aumento de sua expressão, frequentemente observado nos TW, é responsável por um maior estímulo da proliferação celular, mecanismo responsável pelo super-crescimento tecidual observado na síndrome de *Beckwith-Wiedemann* assim como nos casos de hemihipertrofia e pelo desenvolvimento tumoral nestes casos. A expressão de *IGF2* pelo alelo materno devido à *LOI* é responsável por uma hipermetilação de *H19*, que é um gene com função supressora de tumor normalmente expresso pelo alelo materno, levando à inibição de sua expressão (WIENER et al. 1998; DAO et al. 1999; LAI e TAY 1999; DOME e COPPES 2002; GRUNDY et al. 2002; STRONG 2003;

SATOH et al. 2006; FUKUZAWA e REEVE 2007; JELINIC e SHAW 2007). O gene *CDKN1C*, apesar de não ter sua expressão relacionada diretamente à expressão de *IGF2* e *H19*, é outro gene com função supressora de tumor normalmente expresso pelo alelo materno e que também tem sua expressão inibida com a *LOI* deste alelo (JELINIC e SHAW 2007).

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

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

estudo, YUAN et al. (2005) realizaram uma análise comparativa de *LOH* envolvendo todos os cromossomos (*Genome-wide analysis*) entre TW esporádicos e relacionados a síndromes. De um total de 62 TW esporádicos e 9 TW de pacientes portadores de síndrome de *WAGR* ou *Denys-Drash* foi observado que, em ambos os grupos de tumores, a região de perda alélica mais frequentemente encontrada foi 11p. No entanto, enquanto os tumores de pacientes com síndromes apresentaram *LOH* restrita a 11p13 (*locus* WT1) e sem *LOI*, os tumores esporádicos apresentaram diferentes regiões de *LOH* e *LOI* sendo 11p15 a mais frequente, seguida de 11q, 7p, 16q, 14q, 17p e 1p, além de uma região adicional em 4q não perviamente relacionada aos TW. Algumas das alterações encontradas puderam ser correlacionadas com o estágio da doença sendo que a *LOI* na região do gene *H19* (11p15.5) foi mais frequente em tumores de estádios iniciais enquanto que os tumores de estádios avançados (III e IV) apresentaram mais frequentemente *LOH* em 1p, 14q, 17p e principalmente 16q.

Grande parte das alterações citogenéticas encontradas nos TW tem se mostrado associadas ao seu prognóstico, como é o caso do ganho de material de 1q e das perdas alélicas de 1p, 7p, 11q, 16q e 22q, que parecem estar todas associadas a uma pior evolução clínica. A *LOH* das regiões 1p, presente em 10% dos TW e 16q, presente em 20% dos TW, estão associadas a um pior prognóstico relacionado principalmente à progressão e à recidiva tumoral (WIENER et al. 1998; BOWN et al. 2002; DOME e COPPES 2002; GRUNDY et al. 2002). Rearranjos estruturais levando ao ganho de material de 1q e conseqüentemente ao aumento da expressão de genes desta localização parecem estar associados a um maior risco de recaída tumoral (BOWN et al. 2002; WILLIAMS et al. 2004). Translocações levando à *LOH* de 7p têm sido observadas em TW sugerindo a presença de um provável gene



supressor de tumor nesta região, possivelmente o gene *PTH-B1* (VERNON et al. 2003), porém sem nenhuma correlação clínica evidenciada até o momento (DOME e COPPES 2002; GRUNDY et al. 2002). A *LOH* de 11q, presente em cerca de 9% dos TW, parece estar associada a tumores anaplásicos e à recorrência tumoral (KLAMT et al. 1998; BOWN et al. 2002). A perda de material de 22q está associada à anaplasia e conseqüentemente à falha terapêutica e à recidiva tumoral (BOWN et al. 2002; STOCK et al. 2002). Alguns outros genes já foram também relacionados aos TW como os genes *Pax-2*, *Pax-8*, *EIA*, *TP53* que, quando desregulados, podem participar da patogênese do TW principalmente por influência sobre a expressão de *WT1* (LAI e TAY 1999). Além destes, análises do nível de expressão de genes envolvidos com os processos de iniciação e progressão tumoral já identificaram em amostras de TW alterações em genes como *TRKB*, *VEGF*, *fas* e genes da família *INK4* de inibidores de quinases ciclina-dependentes, todos com importância prognóstica (DOME e COPPES 2002).

Algumas vias metabólicas também estão envolvidas com o desenvolvimento do TW, sendo a principal delas, a via de sinalização Wnt. A sinalização Wnt está relacionada à diferenciação, proliferação e sobrevivência celular e tem um papel crucial durante as fases iniciais do desenvolvimento renal normal, quando está ativa (MASCHIETTO et al. 2008; CORBIN et al. 2009; KIM et al. 2009), sendo posteriormente silenciada por *WT1* com a progressão do desenvolvimento renal (KIM et al. 2009). A persistência ou a reativação da sinalização Wnt está relacionada ao desenvolvimento de alguns TW. Como dito anteriormente, *WT1* atua como regulador de transcrição de diversos genes durante a diferenciação renal, regulando negativamente a via de sinalização Wnt através da inibição da expressão de genes

desta via, sendo esta considerada sua principal função supressora de tumor (KIM et al. 2009). Durante o processo normal de nefrogênese, *WT1* inibe a expressão de *CTNNB1*, gene que pertence à via de sinalização Wnt e que codifica a proteína  $\beta$ -catenina, para que ocorra o desenvolvimento normal do néfron. Nos TW com diferenciação mesenquimal, derivados de RNIL, são frequentes deleções ou mutações em *WT1* com perda de função do gene. Sem a inibição exercida por *WT1*, *CTNNB1* passa a ser expresso levando à ativação da via de sinalização Wnt o que por sua vez interfere na diferenciação e estimula a proliferação e a sobrevivência celular. A ausência de expressão de *WT1* parece ser um fator predisponente para a ocorrência de mutações em *CTNNB1* sendo que até 75% dos tumores com mutações em *WT1* também apresentam mutações em *CTNNB1* (FUKUZAWA et al. 2008, 2009; CORBIN et al. 2009; KIM et al. 2009).

Recentemente um novo gene, *WTX* (*Wilms Tumor Gene on the X chromosome* - FAM123B), foi descrito e relacionado aos TW (RIVERA et al. 2007). Localizado em Xq11.1, este gene atua como um supressor de tumor, porém com um padrão de expressão pouco comum, uma vez que necessita de somente um evento mutacional para ser inativado (cromossomo X no homem ou X ativo na mulher). Assim como *WT1*, *WTX* também é um antagonista da sinalização Wnt pois participa de um complexo protéico responsável pela degradação de *CTNNB1* (MAJOR et al. 2007; FUKUZAWA et al. 2009). Mutações levando à perda de função em *WTX*, apontadas como presentes em 7 a 30% dos TW, também possibilitam a ativação da sinalização Wnt, podendo ou não coincidir com mutações em *WT1* e *CTNNB1* (PEROTTI et al. 2008; RUTESHOUSER et al. 2008; FUKUZAWA et al. 2009; WEGERT et al. 2009).

Tendo por base a relação entre a expressão destes genes, diversos estudos atuais têm demonstrado a existência de duas linhagens específicas de TW, apontando para uma origem distinta destes tumores. Tumores com diferenciação mesenquimal seriam originados em fases precoces no desenvolvimento renal a partir de uma célula precursora mesenquimal associada a RNIL, com ausência de expressão de *WT1* e com ativação da via de sinalização Wnt. Por outro lado, os tumores com predomínio dos componentes epitelial ou blastematoso seriam originados em fases mais tardias do desenvolvimento renal a partir de uma célula precursora nefrogênica mais diferenciada associada a RNPL, com expressão normal de *WT1*, sem ativação da via de sinalização Wnt e geralmente associados ao ganho de expressão de *IGF2* por *LOI* ou *LOH* (FUKUZAWA et al. 2008, 2009; RUTESHOUSER et al. 2008; CORBIN et al. 2009).

Outra via metabólica que tem sido relacionada aos TW pela identificação frequente de seus genes em diferentes estudos de expressão gênica com TW é a via do metabolismo do Ácido Retinóico (TAKAHASHI et al. 2002; ZIRN et al. 2005; MASCHIETTO et al. 2008). O Ácido Retinóico (AR), forma oxidada e ativa da vitamina A (retinol), é um potente indutor da diferenciação celular e da apoptose, exercendo um importante efeito inibitório sobre a proliferação e o crescimento celular. Tem sido utilizado, sob a forma de Ácido Trans-Retinóico (ATRA), no tratamento de diferentes neoplasias, sendo bastante utilizado na população pediátrica, principalmente no tratamento de leucemias e neuroblastomas (MEISTER et al. 1998; LEHMANN et al. 2002). Já foi demonstrado que a vitamina A exerce um papel fundamental no processo de diferenciação celular e morfogênese e que sua deficiência leva a malformações e ao desenvolvimento de neoplasias (DE LUCA

1991). Anormalidades no desenvolvimento do trato urogenital já foram observadas em ratos nascidos de mães com deficiência de vitamina A, assim como uma incidência aumentada de displasia renal, restos nefrogênicos, mutações em *WT1* e TW (LI K et al. 2005; LI et al. 2009). A expressão de genes pertencentes à via do metabolismo do AR, sobretudo de receptores de AR, pode conferir às células tumorais sensibilidade aos efeitos inibitórios da proliferação celular induzida pelo AR como já demonstrado para outros tumores (BUDHU e NOY 2002; MANOR et al. 2003). Desta maneira, é possível sugerir que o uso de análogos do AR poderia vir a ser uma alternativa terapêutica para os casos de TW resistentes às drogas usuais, uma vez que envolve uma droga de fácil acesso, cuja utilização já está bem estabelecida na população pediátrica. Já foi demonstrado por alguns autores que o tratamento com ATRA interfere na expressão de genes pertencentes à via do metabolismo do AR em linhagens celulares de TW (VINCENT et al. 1996; ZIRN et al. 2005) e inibe a proliferação de células blastematosas de TW (VINCENT et al. 1996). O uso de ATRA em crianças com TW recorrentes, refratários aos tratamentos convencionais, sem distinção dos sub-tipos histológicos, já foi proposto e realizado de forma experimental em combinação com o uso de interferon- $\alpha$  2a (INF-  $\alpha$  2a) através de um estudo fase I (ADAMSON et al. 1997) e II (ADAMSON et al. 2007). Esta combinação, no entanto, apesar de bem tolerada não mostrou efeitos terapêuticos nos pacientes envolvidos nos estudos.

Como é possível observar, o TW é um tumor com morfologia e comportamento clínico diversificado e bastante heterogêneo geneticamente. Porém, apesar do grande número de estudos envolvendo os TW e de grande parte das alterações citogenéticas relacionadas aos TW apresentarem alguma correlação com o

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

Por este motivo, são necessários estudos mais específicos, direcionados principalmente às alterações gênicas de cada componente tumoral que permitam distinguir, dentre os TW não anaplásicos, os tumores de melhor prognóstico daqueles de pior prognóstico para que seja possível uma maior individualização do tratamento.

## 1.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

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

O aumento de informações acerca da seqüência do genoma humano tem permitido o desenvolvimento de novas tecnologias para a análise da expressão gênica em larga escala como é o caso do *microarray* de cDNA. Os *microarrays* de cDNA (SCHENA et al. 1998) permitem a análise da expressão de milhares de genes expressos simultaneamente em um determinado tecido, gerando um perfil de expressão gênica deste tecido. Isto é realizado através da hibridização de moléculas de cDNA do tecido tumoral e/ou normal marcadas com corantes fluorescentes, com fragmentos de diferentes genes imobilizados em suportes como lâminas de vidro ou membranas de *nylon* e o nível de expressão de cada gene é determinado pela intensidade da fluorescência gerada (LOCKHART e WINZELER 2000).

Os *microarrays* de cDNA têm sido amplamente utilizados na busca por marcadores moleculares de diagnóstico, prognóstico ou alvos terapêuticos em

diversos tipos de neoplasias, incluindo os TW, pois permitem a análise da expressão de qualquer gene ou seqüência conhecida de cDNA possibilitando estudos comparativos e a avaliação de genes de interesse como marcadores moleculares já descritos e a representação de vias metabólicas.

Alguns estudos de *microarray* envolvendo TW já trouxeram informações de grande relevância para o conhecimento da biologia destes tumores. São exemplos, o estudo realizado por TAKAHASHI et al. (2003) que, analisando o perfil de expressão gênica através de *microarray* de cDNA de 70 tumores renais de diferentes tipos histológicos, incluindo TW, puderam identificar perfis específicos de expressão gênica para cada tipo histológico estudado, o que permitiu não só sugerir a existência de vias tumorigênicas distintas, como também identificar genes com importância diagnóstica, prognóstica e terapêutica para estes tumores. Em outro estudo, LI et al. (2002) identificaram 357 genes diferencialmente expressos entre TW e rim fetal e observaram que os TW apresentam ganho de expressão de genes correspondentes aos estágios mais iniciais e perda de expressão daqueles correspondentes aos estágios mais tardios do desenvolvimento renal, além de uma expressão significativa, nos TW, de genes codificadores de fatores de transcrição relacionados à sobrevivência e proliferação celular durante os estágios iniciais do desenvolvimento metanéfrico. Estes achados permitiram aos autores sugerir que os TW advém de uma falha na diferenciação celular durante a transição epitélio-mesênquima. Resultados semelhantes foram observados por MASCHIETTO et al. (2008) que, buscando associações moleculares entre TW e o processo de nefrogênese, analisaram o perfil de expressão gênica dos componentes celulares dos TW em comparação aos dados de expressão gênica de diferentes fases do desenvolvimento renal disponibilizados

por STUART et al. (2001), o que permitiu identificar que o componente blastematoso é o componente que compartilha maior similaridade com o padrão de expressão dos primeiros estágios da nefrogênese. Frente a estes achados foram então comparados os perfis de expressão gênica dos TW, representados apenas pelo componente blastematoso, com o de rins fetais e o de rins fetais com o de rins maduros, sendo identificado um grupo de genes comuns às duas comparações, interpretados como genes envolvidos nas fases iniciais do desenvolvimento renal possivelmente relacionados à iniciação do processo neoplásico, dentre os quais foi observada uma representação aumentada de genes pertencentes à via de sinalização Wnt. Outros estudos ainda, foram relevantes quanto às informações sobre o comportamento e o prognóstico dos TW como, por exemplo, o estudo realizado por WILLIAMS et al. (2004) que, buscando identificar padrões de expressão gênica preditivos de recaída tumoral, analisaram 27 TW de histologia favorável não submetidos à QT pré-operatória e puderam identificar um pequeno grupo de genes diferencialmente expressos entre tumores com e sem recaída, com uma participação importante de genes localizados em 1q, com potencial para predizer a evolução clínica de novas amostras. Por outro lado, ZIRN et al. (2006) analisaram a expressão gênica de 63 TW submetidos à QT pré-operatória com o objetivo de detectar genes associados ao grau de malignidade e a progressão tumoral e puderam identificar, além de diferenças no padrão de expressão entre TW com e sem recaída tumoral, genes associados à progressão tumoral e ainda, alterações na expressão de genes pertencentes à via do metabolismo do AR em tumores de estádios avançados, sugestivas de um comprometimento da regulação desta via nestes tumores.



No entanto, são poucas as informações disponíveis referentes à expressão gênica exclusivamente do componente blastematoso dos TW, sobretudo enfocando a resposta terapêutica e o envolvimento de vias de sinalização específicas como as vias Wnt e do AR. Desta maneira, tivemos o interesse em buscar genes diferencialmente expressos em um número representativo de amostras de componente blastematoso de TW e que apresentem diferentes perfis de resposta terapêutica, dando ênfase ao perfil de expressão de genes envolvidos com o metabolismo do AR.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Identificar genes diferencialmente expressos entre TW de componente blastematoso com evolução clínica favorável (EF) e desfavorável (ED) através da técnica de *microarray* de cDNA enfatizando genes relacionados ao metabolismo do AR.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.** Identificar genes diferencialmente expressos entre amostras de blastema de TW com EF e ED através de duas plataformas customizadas de *microarray* de cDNA, uma delas contendo genes relacionados ao metabolismo do AR;
- 2.** Validar a expressão diferencial dos genes selecionados em um grupo independente de amostras de blastema de TW com EF e ED, através da técnica de RT-PCR em tempo real;
- 3.** Avaliar a expressão das proteínas codificadas pelos genes selecionados e validados, quando houver anticorpo disponível comercialmente, em amostras de blastema de TW, utilizando a técnica de imunistoquímica através de *tissue microarray*.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 ASPECTOS ÉTICOS**

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital A. C. Camargo - Fundação Antônio Prudente em reunião realizada no dia 09/09/2008, com o título “Identificação de potenciais marcadores de resposta terapêutica para o tumor de Wilms através de microarray usando plataforma de cDNA contendo genes pertencentes à via do ácido retinóico”, sob o número 764/06, conforme documento em anexo (Anexo 1) após alterações efetuadas no título e conteúdo do projeto intitulado “Identificação de potenciais marcadores de quimiorresistência para o tumor de Wilms”, com registro na CONEP N° 526/2006, emitido em 22/05/2006.

Este estudo foi financiado com verba FAPESP, tanto no âmbito do projeto CEPID número 1998/14335-2, quanto através de bolsa concedida ao aluno e reserva técnica (processo N° 2005/05184-6).

#### **3.2 COLABORAÇÃO INTERNACIONAL**

Todas as amostras tumorais utilizadas nos experimentos de *microarray* de cDNA e RT-PCR em tempo real neste estudo foram obtidas através de uma colaboração estabelecida com o grupo de estudos de tumores pediátricos *Children Oncology Group (COG)*, através do *Renal Tumor Biology Committee*, coordenado

pelo Dr. Paul Grundy (*Stollery Children's Hospital* - Edmonton, AB, Canadá) e pelo Dr. Jeffrey Dome (*St. Jude Children's Research Hospital* - Memphis, TN, EUA). Esta colaboração foi estabelecida previamente à concepção deste estudo e teve como finalidade a obtenção de uma quantidade significativa de amostras de TW de componente blastematoso não expostas à QT para a utilização em diferentes estudos com TW, como o realizado por MASCHIETTO et al. (2008).

### **3.3 MATERIAL BIOLÓGICO**

#### **3.3.1 Amostras Tumorais**

Através da colaboração com o *COG* obtivemos um total de 90 amostras de tecido congelado de TW não anaplásicos, compostas exclusiva ou predominantemente pelo componente celular blastematoso, todas provenientes da ressecção tumoral de pacientes não submetidos à QT pré-operatória. Estas amostras foram obtidas em dois momentos distintos: num primeiro momento recebemos um grupo de 30 amostras, todas provenientes de pacientes que apresentavam estádios avançados da doença (III e IV) das quais 15 eram provenientes de pacientes que vieram a apresentar recaída tumoral após o tratamento quimioterápico, consideradas de evolução clínica desfavorável (ED) e, 15 de pacientes que não apresentaram recaída tumoral, consideradas de evolução clínica favorável (EF). Num segundo momento recebemos mais 60 amostras sendo, 40 de pacientes que também apresentavam estádios avançados da doença (III e IV) e não apresentaram recaída tumoral e, portanto, consideradas EF e, 20 de pacientes com tumores de estágio I a IV, ou seja, tumores unilaterais diagnosticados com doença localizada (estádios I e

II) ou avançada (estádios III e IV) e que vieram a apresentar recaída tumoral após o tratamento quimioterápico, consideradas ED. O critério utilizado para a caracterização da evolução clínica dos pacientes em favorável ou desfavorável se baseou na resposta ao tratamento quimioterápico efetuado considerando, para isto, a extensão da doença como fator determinante da necessidade de tratamento quimioterápico adjuvante à ressecção cirúrgica, o que inclui os tumores com doença disseminada (estádios III e IV) e aqueles inicialmente caracterizados como localizados (estádios I e II), porém que vieram a apresentar recaída da doença demonstrando a persistência de células tumorais resistentes ao tratamento após a ressecção do tumor primário. Como já mencionado anteriormente, todas as amostras são de histologia favorável, ou seja, sem anaplasia celular, uma vez que a presença de anaplasia está relacionada à resistência dos TW à QT.

As primeiras 30 amostras de TW foram utilizadas para a hibridização nas duas plataformas de *microarray* de cDNA e, portanto, para a seleção dos genes diferencialmente expressos sendo nomeadas de grupo inicial. Estas amostras foram utilizadas também para a confirmação, por RT-PCR em tempo real, do perfil de expressão destes genes observado nos experimentos de *microarray* de cDNA e que chamamos de validação experimental. As demais 60 amostras foram utilizadas unicamente para a validação, por RT-PCR em tempo real, da expressão diferencial dos genes selecionados a partir do *microarray* de cDNA e que tiveram seu perfil de expressão validado experimentalmente. Por este motivo, esta etapa foi chamada de validação biológica e este grupo de amostras de grupo independente. Todas as 90 amostras foram colhidas a fresco durante o ato cirúrgico, submetidas a congelamento rápido em nitrogênio líquido, armazenadas a  $-140^{\circ}\text{C}$  no banco de amostras do COG

e enviadas para a nossa instituição. Lâminas coradas por hematoxilina-eosina de todas as amostras foram revisadas por um patologista desta instituição para a confirmação do diagnóstico, da caracterização e distribuição dos componentes celulares, da ausência de anaplasia e para servir como guia para microdissecção manual, quando necessário.

### **3.3.2 Amostra Calibradora**

Um *pool* comercial (*Clontech* - *CAT# 6526-1*) de RNA poli-A de rins fetais normais provenientes de 17 fetos caucasianos de ambos os sexos, abortados espontaneamente com idades entre 16 e 32 semanas, foi utilizado como amostra calibradora para os experimentos de RT - PCR em tempo real.

## **3.4 MICRODISSECÇÃO MANUAL E A LASER**

Devido ao nosso interesse em estudar a expressão gênica do componente blastematoso dos TW, buscamos trabalhar com amostras tumorais com a mínima interferência possível de outros componentes celulares que podem estar presentes em uma amostra de TW. Apesar das amostras tumorais provenientes do *COG* serem compostas exclusiva ou predominantemente pelo componente celular blastematoso, todas aquelas que apresentavam áreas de necrose, calcificações ou de outros componentes celulares foram submetidas à microdissecção manual para serem enriquecidas com o componente blastematoso. As amostras microdissecadas manualmente foram utilizadas para hibridização com a Plataforma Universal 4.8K003, para a validação experimental e biológica por RT-PCR em tempo real dos

genes selecionados a partir desta plataforma e para a validação biológica dos genes selecionados a partir da Plataforma de Vias de Sinalização Celular. Para a hibridização com a Plataforma de Vias de Sinalização Celular, considerando a especificidade funcional dos genes que a compõe e por já dispormos de tecnologia para tal, utilizamos a microdissecção a *laser* para a captura individualizada de células blastematosas das amostras de TW com o intuito de obtermos um material tumoral ainda mais puro para a seleção gênica. Consequentemente, estas amostras também foram utilizadas para a validação experimental por RT-PCR em tempo real dos genes selecionados a partir desta plataforma.

A microdissecção a *laser* foi realizada com o uso de um microscópio invertido, ao qual é acoplada uma fonte de raio *laser* infravermelho de baixa potência e uma câmera ligada a um monitor e a um computador. A lâmina com o corte histológico é fixada ao carrossel do microscópio por sucção a vácuo. Entre a fonte de raio *laser* e o corte histológico fica posicionado um capuz revestido por filme termoplástico. Com o disparo, o feixe de raio *laser* incide sobre o capuz fazendo com que o filme termoplástico se expanda e alcance célula escolhida aderindo-se à ela. Quando o pulso cessa, o filme retrai levando consigo a célula aderida. Esta operação é repetida até que se obtenha a quantidade de células necessárias, o que depende do tipo de tecido e do estudo realizado. Ao final da operação, retira-se o capuz com as células aderidas à sua superfície e prossegue-se com a extração do RNA das células obtidas. Para este estudo, o diâmetro do feixe de raios *laser* foi ajustado para 15 $\mu$ m e o tempo de captura variou de 10 a 20 minutos, tempo este pré-estabelecido para a obtenção do RNA sem comprometimento de sua integridade.

## 3.5 PREPARO DAS AMOSTRAS

### 3.5.1 Amostras Não Microdissecadas a *laser*

#### 3.5.1.1 Extração do RNA

O RNA total das amostras tumorais que não necessitaram de microdissecção ou que foram microdissecadas manualmente foi isolado a partir do tecido congelado utilizando-se o método de extração por Trizol (*Trizol Reagent*<sup>®</sup> - *Invitrogen*) conforme as condições fornecidas pelo fabricante.

Após a extração, todos os RNAs foram quantificados e tiveram sua integridade avaliada. Os RNAs provenientes das primeiras 30 amostras de TW (grupo inicial) foram quantificados com o auxílio de um espectrofotômetro *GENEQUANT Pro* (*Amersham Pharmacia Biotech*) e para a verificação de sua integridade, 1µg de cada RNA foi dissolvido em um volume final de 5µL de água DEPC, acrescido de 5µL de Tampão Desnaturante (2X TAE – pH 7,4 [40mL de Tris 1Mol/L pH - 8,0; 1,142mL de Ácido Acético Glacial; 2mL de EDTA 0,5Mol/L pH - 8,0; água DEPC q.s.p. 1.000mL]; 7Mol/L de Uréia; 30% de Glicerol, 0,25% de Azul de Bromofenol, 0,25% de Xileno Cianol), incubado a 70°C por 10 minutos, acrescido de 1µg de Brometo de Etídio e submetido à eletroforese em gel de agarose 1% por 50 minutos a uma voltagem de 60V. Foram consideradas como íntegras as amostras de RNA que apresentaram uma relação entre as bandas 28S e 18S superior a 1. Devido à aquisição de novos equipamentos pelo laboratório no decorrer do estudo, foi utilizado um espectrofotômetro *Nanodrop ND-1000* (*NanoDrop Technologies*) para a quantificação do RNA proveniente das demais 60 amostras de TW (grupo independente). A verificação da integridade destas amostras foi realizada



através da análise de aproximadamente 800ng de cada RNA com o uso de um aparelho *Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies)* que verifica a relação entre as bandas 28S e 18S do RNA e atribui uma nota baseada na integridade do RNA total (*RNA Integrity Number - RIN*). Foram consideradas como íntegras as amostras de RNA que apresentaram uma relação entre as bandas 28S e 18S superior a 1 e/ou  $RIN > 5$  (0 - 10).

### **3.5.1.2 Amplificação do RNA**

Para os experimentos de cDNA *microarray* foi realizada a amplificação do mRNA das amostras utilizadas. Para as amostras não microdissecadas a *laser* isto foi realizado com a utilização de um protocolo já estabelecido e adaptado pelo nosso grupo, que tem sido utilizado em vários projetos em andamento e que se baseia na amplificação guiada pela T7-RNA polimerase e iniciador *Template Switch* (WANG et al. 2000; GOMES et al. 2003). Em resumo, o cDNA é sintetizado a partir do RNA total com a utilização de *primers* que ancoram na cauda poli-A dos RNA mensageiros e possuem sítio para T7-RNA polimerase. Para uma produção exponencial de RNA amplificado (aRNA) o RNA total é submetido a dois *rounds* de amplificação. O procedimento detalhado está apresentado no anexo 2.

A integridade das amostras de aRNA também foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio, já descrito na página anterior. O resultado esperado neste caso é que as amostras apresentem uma quantidade mínima de aRNA de 20µg e uma concentração preferencial de fragmentos de 300 a 700pb, critério de qualidade este previamente estabelecido por nosso grupo uma vez que indiretamente indica uma amplificação bem sucedida e

lâminas hibridizadas com amostras com estas características mostram-se de ótima qualidade.

### **3.5.2 Amostras Microdissecadas a *Laser***

#### **3.5.2.1 Extração do RNA**

A extração de RNA das amostras submetidas à microdissecção a *laser* foi realizada com a utilização do *kit PicoPure<sup>TM</sup> RNA Isolation KIT (ARCTURUS # KIT0204)*, conforme recomendações do fabricante.

#### **3.5.2.2 Amplificação do RNA**

A amplificação do mRNA neste caso foi realizada com a utilização do *kit RiboAmp<sup>TM</sup> RNA amplification – ARCTURUS # KIT0201* conforme recomendações do fabricante.

As amostras de aRNA provenientes de microdissecção a *laser* foram quantificadas com o auxílio de um espectrofotômetro *Nanodrop* e em seguida avaliadas através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio. Para isto, 500ng de aRNA foram adicionados a 5µL de tampão TAE com 7M de uréia e 3X *Loading Buffer* azul de bromofenol. O aRNA foi considerado de boa qualidade se apresentou uma maior concentração de fragmentos entre 500 e 1000pb, critério este previamente estabelecido por nosso grupo, uma vez que as plataformas hibridizadas com amostras com estas características mostram-se de melhor qualidade.

### 3.6 SÍNTESE DE CDNA

Para as reações de RT-PCR em tempo real, 2µg de RNA total de todas as amostras de TW (grupo inicial e independente) não microdissecadas a *laser* e do *pool* de rim fetal, além de 2µg de aRNA das amostras do grupo inicial microdissecadas a *laser* foram utilizados como molde para a síntese de cDNA através de transcrição reversa pela ação da enzima *Improm II Reverse Transcriptase (Promega)* e *primer oligo-dT (15)* conforme as condições fornecidas pelo fabricante. O cDNA sintetizado a partir de aRNA das amostras do grupo inicial microdissecadas a *laser* foram utilizadas unicamente para a etapa de validação experimental dos genes selecionados a partir da Plataforma de Vias de Sinalização Celular por terem sido estas as amostras utilizadas para a hibridização com esta plataforma.

A eficiência da reação de síntese de cDNA foi verificada pela amplificação positiva por PCR de um fragmento de 296pb do gene constitutivo *GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase – NM\_002046)* com a utilização dos *primers GAPDH-F (5'-CTGCACCACCAAGTGCTTA-3')* e *GAPDH-R (5'-CATGACGGCAGGTCAGGTC-3')*. Para isto foram utilizados 15ng de cDNA diluído (10X); 1X Tampão de Reação para *Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen)*; 2,0mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2mM de dNTPs; 0,2mM de cada *primer* e 1,0U de *Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen)* em um volume final de reação de 25µL, e as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial por 2 minutos a 95°C seguida de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, com uma fase final de extensão a 72°C por 7 minutos. Os fragmentos

resultantes da amplificação foram visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e coloração com prata.

### **3.7      *MICROARRAY***

#### **3.7.1    Descrição das Plataformas de cDNA**

##### **3.7.1.1 Plataforma Universal 4.8K003**

A denominada Plataforma Universal 4.8K003 é uma plataforma composta por seqüências de cDNA de ORESTES originárias do Projeto Genoma do Câncer (DE SOUZA et al. 2000; DIAS NETO et al. 2000; CAMARGO et al. 2001; BRENTANI et al. 2003) que foi produzida no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer sob a responsabilidade do Dr. Alex Fiorini e do Dr. Luiz Fernando Lima Reis. Para sua montagem foi utilizada uma lâmina de vidro dividida em 48 *sub-arrays*, onde estão imobilizadas 4.608 seqüências de cDNA correspondentes a diferentes genes humanos além de 192 controles positivos e negativos. Cada *sub-array* contém 100 *spots* sendo que cada *spot* corresponde a um ponto na lâmina de microarray, totalizando 4.800 pontos. As seqüências imobilizadas foram selecionadas segundo os seguintes critérios biológicos e físicos descritos por BRENTANI et al. (2005):

- Sequências ORESTES correspondentes a seqüências *full-length*.
- Sequências ORESTES com tamanho maior que 300pb.
- Uniformidade de tamanho e de conteúdo GC.

- Sequências ORESTES localizadas o mais próximo possível da extremidade 3', considerando-se a variabilidade da região 3' *UTR* devido ao sítio de poliadenilação alternativo.
- Não compartilhamento de sequências com identidade maior que 85% quando comparada com quaisquer fragmentos de 100pb do genoma humano.

### 3.7.1.2 Plataforma de Vias de Sinalização Celular

Uma plataforma de cDNA contendo sequências correspondentes a genes pertencentes a diferentes vias de transdução de sinal relacionadas aos processos de diferenciação, metabolização e sinalização celular foi construída por nosso grupo. Nesta plataforma, também de vidro, estão imobilizados 2.352 elementos, dentre eles, 1.794 cDNAs correspondentes a genes das vias do AR (150 genes), WNT (203 genes), PI3K (110 genes), processo de transição epitélio-mesênquima (*EMT*) (90 genes), dentre outras. O restante da lâmina corresponde a sequências de ORESTES com os mesmos critérios descritos para a Plataforma Universal 4.8K003, além de controles positivos e negativos. Esta lâmina também é dividida em 48 *sub-arrays* com 49 *spots* cada, onde estão imobilizados 3 controles negativos (ausência de material), 5 *blank spots* (DMSO) e 1 controle positivo de marcação (cDNA correspondente a um fragmento do *lambda fago Q gene*). Essa plataforma foi idealizada pelo nosso grupo para o projeto “Análise de expressão gênica de vários estágios de desenvolvimento do rim e fígado e suas implicações em tumores embrionários” (FAPESP nº 06/00054-0, coordenação: Dra. Dirce Maria Carraro) em colaboração com o Laboratório de Biologia Computacional do Hospital A.C. Camargo sob a responsabilidade da Dra. Helena Brentani e as lâminas foram

confeccionadas na *facility* de *microarray* da nossa instituição sob a responsabilidade do Dr. Alex Fiorini de Carvalho.

### **3.7.2 Marcação e Hibridização**

Foram utilizados para hibridização com as plataformas de cDNA os RNAs amplificados provenientes do primeiro grupo de 30 amostras de TW (grupo inicial), microdissecadas manualmente no caso da Plataforma Universal 4.8K003 e microdissecadas a *laser* no caso da Plataforma de Vias de Sinalização Celular. Todas as amostras foram hibridizadas juntamente com um RNA referência amplificado proveniente de um *pool* formado por quantidades equimolares de RNAs de 15 diferentes linhagens celulares humanas, cedido pelo grupo coordenado pelo Dr. Luiz Fernando Lima Reis da infra-estrutura de *microarray* dessa Instituição. Este *pool* é composto pelas seguintes linhagens: Daudi (linfoma de Burkitt), DLD-1 (adenocarcinoma de cólon), DU 145 (carcinoma de próstata), FaDU (carcinoma epidermóide de faringe), GM 637 (fibroblasto), H 146 (carcinoma de pulmão), H1080 (fibrossarcoma), HB4 $\alpha$  (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).

#### **3.7.2.1 Marcação Plataforma Universal 4.8K003**

Para a hibridização na Plataforma Universal 4.8K003, foi utilizado um protocolo de marcação indireta de cDNA usando amino allyl dUTP e fluoróforos alexa 555 e alexa 647 (alexa-flúor 555 e 647 - *Molecular Probes, Invitrogen*) (COX

e SINGER 2004). Em resumo, 10µg de aRNA da amostra teste ou referência foram misturados com 9µg de oligonucleotídeo *random primer dN6* (Amersham Pharmacia Biotech), completando-se o volume da reação com água DEPC para 7,2µL. Após incubação a 70°C por 10 minutos, foram adicionados 1X *first ImPromII™ strand buffer* (Promega), 6mMol/L de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mMol/L de dTTP e 0,5mMol/L dos demais desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP e dGTP) (Clontech), 20U de *RNasin* (*RNasin® Plus RNase Inhibitor*, Promega), 1,5µL de *ImProm-II™ reverse transcriptase* (Promega) e 0,3mMol/L de *5-3-aminoallyl-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate aa-dUTP* (Sigma). A reação foi mantida a 42° C por 2 horas. Após este período, a reação foi submetida a uma etapa para a degradação do RNA restante com a adição de 14mMol/L de EDTA e 0,42Mol/L de Hidróxido de Sódio e incubação a 70° C por 10 minutos, seguida de neutralização com a adição de 0,3Mol/L de Ácido Clorídrico.

Após precipitação da reação em 75% (v/v) de etanol acrescido de 0,086Mol/L de Acetato de Sódio (pH 4.5) e 20µg de glicogênio, a -20°C *overnight*, o *pellet* resultante foi solubilizado em 10µL de solução de Bicarbonato de Sódio a 0,1Mol/L (pH 9.0) para favorecer o acoplamento do fluoróforo e então fracionado igualmente em 2 tubos. A cada tubo foram acrescentados 5,0µL de um dos fluoróforos (alexa 555 ou alexa 647) previamente solubilizados em DMSO e deixados à temperatura ambiente protegidos da luz por 2 horas. A remoção dos fluoróforos não incorporados à reação foi realizada com a utilização do *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen), conforme as condições fornecidas pelo fabricante.

### 3.7.2.2 Marcação Plataforma de Vias de Sinalização Celular

A marcação indireta dos cDNAs das amostras para a hibridização na plataforma de Vias de Sinalização Celular foi feita com fluoróforos Cy3 e Cy5 (Amershan, EUA) e não com Alexa 555 e 647 como no caso da plataforma Universal 4.8K003 e o protocolo de marcação utilizado encontra-se em anexo (Anexo 3).

### 3.7.2.3 Hibridização

Para a hibridização, em ambas as plataformas, foi utilizado o sistema *dye-swap* que consiste na hibridização de uma mesma amostra duas vezes, usando a inversão de corantes. Essa inversão dos fluoróforos é realizada com a finalidade de minimizar erros decorrentes das propriedades específicas de cada fluoróforo (alexa 555 e alexa 647 / Cy3 e Cy5), por apresentarem eficiências de incorporação distintas na síntese de primeira fita do cDNA a partir do RNA.

As sondas de cDNA fita simples foram obtidas pela reação de transcrição reversa, utilizando aRNA submetido a 2 *rounds* de amplificação como molde. A hibridização foi feita utilizando 6µg de aRNA da amostra teste contra 4µg da amostra referência. Para a reação de hibridização, foram misturadas as duas reações de cDNAs marcadas com cada fluoróforo (alexa 555 e alexa 647 no caso da Plataforma Universal 4.8K003 / Cy3 e Cy5 no caso da Plataforma de Vias de Sinalização Celular) e purificadas. A esta mistura foram adicionados 4,0µg de *poly-A DNA* (Amersham Biosciences, EUA) e 2,0µg de *Cot-1 DNA* (Invitrogen, EUA). O volume foi reduzido para 12,5µL em *speed-vac* (Savant Speed Vac Concentrator) e seguiu-se com a adição de 5X SSC (*Sodium chloride 3,0 Mol/L; Trisodium citrate 0,3 Mol/L pH 7.0*); 0,1% (p/v) de SDS (*Dodecyl Sulfate Sodium Salt*); 50% (v/v) de



formamida deionizada; 5X solução *Denhardt's* [0,10% p/v de Ficol (*Ficoll 400*); 0,10% p/v de BSA (*bovine serum albumin*) e 0,10% p/v de Polivinilpirolidona] e 10µg de esperma de salmão. Esta reação foi mantida sob agitação a 45°C enquanto se procedia com a lavagem das lâminas com água Milli-Q, as quais tinham sido pré-hibridizadas a 42°C *overnight* em tampão contendo 5X SSC, 0,2% (p/v) SDS, 1% (p/v) BSA e solução 5X *Denhardt's*. O cDNA marcado foi então aquecido a 95°C por 5 minutos e, em seguida, aplicado às lâminas previamente acopladas à estação de hibridização (*Genomics Solutions*, EUA), que foram mantidas a 42°C por cerca de 20 horas (12 a 24 horas).

Após a hibridização, as lâminas foram lavadas uma vez com tampão 2X SSC por 15 minutos, duas vezes com tampão 0,1X SSC e 0,1% (p/v) SDS por 15 minutos e, por fim, duas vezes com tampão 0,1X SSC por 15 minutos, todos pré-aquecidos a 42°C e sob agitação, seguido por centrifugação das lâminas em tubo Falcon 50µL a 1.500 rpm por 2 minutos para secagem.

### 3.7.3 Captura das Imagens e Quantificação do Sinal

Os sinais gerados pela hibridização das amostras foram capturados com a utilização de um *scanner a laser* confocal com canal duplo, o *ScanArray Express* (*Perkin Elmer Life Sciences, Inc.*, EUA). Esse sistema tem dois *lasers* com comprimento de ondas diferentes, que estimulam especificamente cada um dos fluoróforos (alexa 555 / Cy3 ou alexa 647 / Cy5). Quando as moléculas são excitadas, emitem um sinal proporcional ao número de moléculas presentes que é captado pelo *scanner* e que, por sua vez, está diretamente relacionado à quantidade de RNA mensageiro nas amostras. A quantificação desse sinal ocorre devido à

conversão do comprimento de onda emitido pelos fluoróforos excitados em energia elétrica, produzindo um sinal mensurável. A leitura dos fluoróforos é feita separadamente e a composição da imagem é realizada pelo programa. Como a hibridização é competitiva, os valores de fluorescência obtidos revelam níveis relativos de expressão de cada transcrito na amostra-teste e na amostra-referência.

Foi considerado um valor de *PMT* (*photomultiplier tube*) de 60 para a amostra teste e de 50 para a amostra referência.

#### **3.7.4 Pré-Análise das Lâminas Hibridizadas**

Após a captura de sinal, os dados foram primeiramente submetidos à uma pré-análise para a verificação da qualidade das lâminas. Todas essas análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Computacional do Hospital A.C. Camargo sob a coordenação da Dra. Helena Brentani.

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

#### **3.7.4.1 Análise da intensidade de fluorescência**

Os valores de intensidade de fluorescência para cada gene foram avaliados através de medidas em escala logarítmica (*MA*, *Log X Log* e *BoxPlot*) após a subtração do sinal do *background*.

#### **3.7.4.2 Análise da correlação entre a lâmina controle e a lâmina *swap***

A correlação entre a lâmina controle e a lâmina *swap*, considerando a eficiência de incorporação dos fluoróforos, foi avaliada através de uma correlação de *Pearson*, que determina uma medida do grau de correlação linear entre duas variáveis aleatórias e é representada por um gráfico do tipo *MM Plot*. Para que uma lâmina seja considerada de boa qualidade esta correlação tem que ser superior a 80% após a normalização.

#### **3.7.4.3 Normalização das lâminas**

O objetivo desta normalização é minimizar a interferência de variações sistemáticas introduzidas experimentalmente nas medidas de quantificação da expressão gênica para que as diferenças biológicas possam ser distinguidas com menos artefatos. Nesse projeto a normalização foi realizada com a utilização do método de regressão linear de *Locally Weighted Scatter-plot Smoothing (LOWESS)*, representado em um *scatter plot* ou em um histograma. Para o cálculo do *LOWESS* são utilizados intervalos pré-definidos no eixo horizontal do gráfico que variam de 0 a 100%. Nesse projeto foi utilizado um intervalo de 20%, ou seja, a análise de regressão foi realizada com 20% dos pontos ao redor do ponto em questão.

### 3.8 SELEÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

As lâminas que apresentaram uma qualidade satisfatória em todos os itens da pré-análise foram utilizadas para a seleção de genes diferencialmente expressos.

O primeiro passo foi estabelecer a média do nível de expressão de cada gene para cada amostra entre as lâminas controle e *swap*. Só então é que foram comparados os níveis de expressão dos genes entre as amostras EF e ED.

Os valores relativos normalizados de cada gene foram comparados entre os dois grupos de amostras e submetidos ao teste t de *Student* permutado para determinar o valor de  $p$  para a expressão de cada gene individualmente nas diferentes classes analisadas (amostras EF *versus* amostras ED). Foram considerados como diferencialmente expressos aqueles genes que apresentaram um valor de  $p \leq 0,01$  para a Plataforma Universal 4.8K003 e  $p \leq 0,05$  para a Plataforma de Vias de Sinalização Celular, uma vez que o número de genes representados nesta última é menor. Dos genes diferencialmente expressos, foram selecionados para posterior validação da expressão gênica diferencial por RT-PCR em tempo real somente aqueles que apresentaram uma diferença de expressão entre as duas classes (*fold* ED/EF)  $\geq 1,5$  ou  $\leq -1,5$  e  $\geq 1,2$  ou  $\leq -1,2$  para as plataformas Universal 4.8K003 e de Vias de Sinalização Celular, respectivamente.

### 3.9 RT-PCR EM TEMPO REAL

A técnica de RT-PCR em tempo real foi utilizada para a validação da expressão diferencial dos genes selecionados a partir das duas plataformas de

*microarray* entre as amostras de TW com EF e ED e, portanto, realizada em duas etapas. Foi realizada uma etapa de validação experimental, na qual todos os genes selecionados como diferencialmente expressos por *microarray* tiveram seu nível de expressão verificado por RT-PCR em tempo real nas próprias 30 amostras de TW usadas na hibridização (grupo inicial), tendo como objetivo confirmar o perfil de expressão destes genes entre os dois grupos de amostras de TW através de duas técnicas distintas (*microarray* x RT-PCR). Os genes cujo perfil de expressão entre os dois grupos de amostras foi concordante pelas duas técnicas, com significância estatística, foram então submetidos a uma validação biológica na qual sua expressão foi verificada nas demais 60 amostras (grupo independente) com o intuito de confirmar se o perfil de expressão encontrado se manteve em um maior número de amostras com as mesmas características clínicas.

A quantificação por RT-PCR em tempo real é caracterizada pelo monitoramento contínuo, durante o processo de amplificação, da fluorescência emitida por um fluoróforo durante a síntese das moléculas de DNA. Para a quantificação da expressão gênica, neste caso, foi utilizado o sistema de detecção de fluorescência *SYBR® Green* caracterizado pela utilização de uma molécula fluorescente denominada *SYBR® Green I* (*Applied Biosystems*, EUA) que se intercala à dupla fita de DNA durante a amplificação do fragmento gênico, e emite fluorescência. Conforme são geradas novas moléculas de dupla fita a cada ciclo da reação, o nível de fluorescência emitida aumenta gradualmente permitindo a quantificação da expressão gênica de modo que, quanto mais precocemente a fluorescência emitida for detectada, maior é o nível de expressão do transcrito analisado. Pares de iniciadores (*primers*) 5' – 3' foram desenhados para cada um dos

genes selecionados. Para cada gene, o *primer* localizado mais a 5' (*primer forward*) e o *primer* localizado mais a 3' (*primer reverse*) foram desenhados não no mesmo *exon*, mas em *exons* subsequentes com a finalidade de evitar amplificação inespecífica a partir de uma possível presença de DNA genômico nas amostras. Cada par de *primers* foi inicialmente testado através da amplificação de seu fragmento por PCR comum a partir de 10ng do cDNA referência (*pool* de rins fetais), com a utilização de 1X Tampão de Reação para *Platinum Taq DNA Polymerase* (*Invitrogen*); 2,0mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2mM de dNTPs; 0,25mM de cada *primer* e 1,0U de *Platinum Taq DNA Polymerase* (*Invitrogen*) em um volume final de reação de 20μL e as mesmas condições de amplificação: desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C seguida de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, com uma fase final de extensão a 72°C por 7 minutos. Os fragmentos resultantes foram visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e coloração com prata.

Em seguida, para cada um dos genes, foram testadas por RT-PCR em tempo real três diferentes concentrações finais de *primers* com o objetivo de determinar a menor quantidade de *primer* suficiente para amplificar todo o cDNA disponível, ou seja, a menor concentração a partir da qual um acréscimo na quantidade de *primers* não acarreta uma maior quantidade de produto amplificado detectado, resultando em uma maior quantidade de fluorescência liberada. As concentrações testadas de cada *primer* foram 200, 400 e 800nM. A reação de amplificação foi realizada a partir de 10ng de cDNA da amostra referência, em duplicata, em presença de 2X *SYBR® Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*), 200, 400 e 800nM (0,001μL x [final]) de cada *primer* 10μM para um volume final de 20μL, com o uso de um

termociclador *ABI Prism® 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems)* e as seguintes condições de amplificação, sugeridas pelo fornecedor: fase inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos seguida por 40 ciclos de amplificação a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a conclusão do processo de amplificação, foi incluída uma etapa de 20 minutos de duração na qual há um aumento gradual da temperatura de 60°C para 95°C a 0,2°C por segundo resultando na desnaturação de todo o produto amplificado com a liberação contínua e gradual da fluorescência, a partir da qual se obtém uma curva de dissociação, utilizada para confirmação da especificidade da amplificação.

Após a determinação das concentrações dos *primers*, foi verificada a eficiência desses *primers* em diferentes condições de amplificação através de uma cinética de amplificação usando diferentes concentrações de cDNA. Isto foi realizado através da construção de uma curva padrão utilizando 5 diferentes concentrações de cDNA (50ng, 20ng, 8ng, 3,2ng e 1,28ng) obtidas por uma diluição seriada de 2,5 vezes do cDNA referência (*pool* de rins fetais) calculada a partir da concentração de RNA total desta amostra, testadas em duplicata. As condições de amplificação usadas foram as mesmas descritas acima e o cálculo da eficiência de amplificação foi feito para cada gene através da fórmula  $[E = 10^{(-1/\text{slope})}]$ , conforme recomendação do manual da *Applied Biosystems*, onde *slope* corresponde ao coeficiente angular da equação da reta da curva padrão.

Uma vez concluídas as padronizações descritas acima para cada gene, todos os genes selecionados e os genes constitutivos foram então amplificados a partir de 10ng de cDNA de cada uma das amostras de TW e da amostra referência (*pool* de rins fetais normais), em duplicata, em placas de 96 wells - *MicroAmp® Optical*

(Applied Biosystems), em presença de 2X SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 200, 400 ou 800nM (0,001µL x [final]) de cada *primer* 10µM (dependendo do gene analisado) para um volume final de 20µL, com o uso de um termociclador ABI Prism® 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) e as seguintes condições de amplificação: 95°C por 10 minutos seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto e uma fase final de 20 minutos, com aumento gradual de temperatura de 60°C para 95°C a 0,2°C por segundo. A mensuração da fluorescência liberada durante a amplificação das amostras é apresentado em valores de CT (*Threshold Cycle* ou ciclo limite) que corresponde ao número do ciclo da reação em que a fluorescência gerada atingiu um limite acima da fluorescência de fundo (LIVAK e SCHMITTGEN 2001). As duplicatas que apresentaram valores de CT com desvio padrão acima de 0,6 foram desconsideradas.

Um gene normalizador (controle endógeno) foi utilizado para corrigir variações nas quantidades iniciais de cDNA. Este gene normalizador foi selecionado dentre genes constitutivos habitualmente utilizados para este fim, com a utilização da ferramenta *GeNorm* (VANDESOMPELE et al. 2002) disponível *online* (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>), que calcula quais destes genes testados apresentam as menores variações de expressão entre as amostras testadas. Quatro diferentes genes constitutivos [*GAPDH* (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) (NM\_002046.2), *ACTB* (*Actin, beta*) (NM\_001101.2), *BCR* (*Breakpoint cluster region*) (NM\_004327) e *huPO* (*Large ribosomal protein*) (NM\_001002)] foram testados como normalizadores.

A expressão diferencial dos genes alvo foi determinada pelo método de quantificação relativa em relação ao gene normalizador selecionado. Para o cálculo



da medida relativa de expressão foi utilizado o modelo matemático proposto por PFAFFL (2001) que analisa individualmente as eficiências de amplificação de cada gene ( $E$ ) e leva em consideração a eficiência de amplificação de cada par de *primers* (Figura 1). Uma amostra não tumoral calibradora (*pool* de RNA de rins fetais normais) foi utilizada como controle interno (amostra referência), analisada em triplicata em cada reação de RT-PCR em tempo real. Nesta equação, **E alvo** corresponde à eficiência de amplificação dos *primers* específicos para o gene alvo, **E endógeno** corresponde à eficiência de amplificação dos *primers* específicos para o gene endógeno,  $\Delta C_T$  **alvo** corresponde à diferença entre o  $C_T$  do gene alvo obtido para a amostra em análise e o  $C_T$  do gene alvo obtido para a amostra referência e,  $\Delta C_T$  **endógeno** corresponde à diferença entre o  $C_T$  do gene endógeno obtido para a amostra em análise e o  $C_T$  do gene endógeno obtido para a amostra referência.

$$\text{Expressão relativa} = \frac{(E_{\text{alvo}} + 1)^{\Delta C_T \text{ alvo}}}{(E_{\text{endógeno}} + 1)^{\Delta C_T \text{ endógeno}}}$$

**Figura 1** - Modelo matemático para quantificação relativa em RT-PCR em tempo real proposto por PFAFFL (2001).

O cálculo da expressão gênica diferencial foi realizado a partir da razão entre as médias dos valores de expressão, normalizados pelo gene endógeno, das amostras de TW com recaída (ED) pela média dos respectivos valores das amostras de TW sem recaída (EF). Foi avaliada a significância estatística destes resultados utilizando-se o teste *T Student* ( $p$ ) não-pareado através do programa computacional *GraphPad Prism version 4.0* (*GraphPad Software Inc., San Diego, CA*), sendo considerados

como significativos valores de  $p \leq 0,05$ . Além da significância estatística dos valores de expressão gênica encontrados, foi verificado também o perfil de expressão destes genes entre os dois grupos de amostras (ED e EF) através da relação entre a expressão de cada gene nas amostras ED e EF (*fold* ED/EF) e se este perfil corresponde ao encontrado pelo *microarray*.

Todos os genes que atenderam a estes critérios e, portanto, considerados validados, foram submetidos a uma análise em grupos de três (trios de genes), com base no perfil de expressão entre as amostras ED e EF de cada um deles, com a finalidade de verificar a capacidade destes genes, em conjunto, de discriminar corretamente as amostras de TW com e sem recaída tumoral, ou seja, buscamos combinações de 3 genes cujo perfil de expressão encontrado (se mais ou menos expresso) entre as amostras ED e EF foi compatível com o *status* de recaída e não recaída do maior número de amostras possível. Para isto utilizamos a análise discriminatória linear de *Fisher*.

### **3.10 IMUNOISTOQUÍMICA**

Esta etapa foi planejada para a verificação, através de imunoistoquímica, da expressão das proteínas codificadas por todos os genes selecionados a partir das duas plataformas de *microarray* que foram confirmados como diferencialmente expressos entre TW EF e ED (validados biologicamente) e que possuem anticorpo disponível comercialmente.

Para isto foram utilizadas lâminas de um *tissue-microarray* (TMA) previamente preparado contendo 163 amostras de TW incluídas em parafina,

provenientes do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo, obtidas de um total de 123 pacientes admitidos neste hospital no período de 1979 a 2003 e, portanto, tratados a partir de protocolos terapêuticos distintos. Estas amostras englobam tumores dos três componentes celulares, de todos os estádios, submetidas ou não à quimioterapia pré-operatória e com diferentes respostas à quimioterapia instituída (com e sem recaída tumoral). Dentre elas existem 86 amostras independentes de componente blastematoso de TW representadas sendo, 25 de Estádio I, 22 de Estádio II, 29 de estágio III, 8 de estágio IV e 2 de estágio V. Esta análise teve o objetivo possibilitar uma avaliação complementar da expressão de alguns dos genes validados em um terceiro grupo de amostras do componente blastematoso de TW, através de uma técnica de fácil aplicabilidade clínica (imunoistoquímica), já em uso em nosso serviço para estudos relacionados à identificação de marcadores moleculares.

Para a realização das reações de imunoistoquímica, lâminas de TMA de 5µm foram primeiramente desparafinizadas através de duas lavagens em Xilol, hidratadas com lavagens sucessivas em Etanol 100%, 95%, 70% e em água e submetidas à fervura sob pressão em solução tampão Citrato 10mM para recuperação antigênica. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena do tecido foi feito com Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% seguido de lavagem em água e PBS por 5 minutos. As lâminas foram então incubadas com os anticorpos primários de interesse diluídos por 18 horas a 4°C em câmara úmida, seguido de incubação com anticorpo secundário biotilado e com o complexo Streptavidina-Peroxidase biotilada, por 30 minutos a 37°C cada. Em seguida as lâminas foram incubadas em solução de Diaminobenzidina (DAB), DMSO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e PBS por 5 minutos a 37°C para revelação do cromógeno,

contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavadas em água e em solução de Hidróxido de Amônio 0,5%, desidratadas em Etanol e Xilol e, por fim, montadas.

Após a incubação das lâminas com os anticorpos específicos, foram avaliadas a presença ou ausência de marcação, a intensidade da marcação quando positiva, a localização celular desta marcação (se nuclear ou citoplasmática) e, por fim, a correlação desta marcação com as seguintes variáveis clínicas das amostras avaliadas disponíveis em nosso banco de dados: sexo, idade, estágio da doença, realização de QT pré-operatória, presença de recaída e ocorrência de óbito. Para a avaliação da positividade da marcação foi estabelecido o seguinte critério: até 10% de células marcadas como marcação ausente, entre 10 e 50% de células marcadas como marcação fraca e, mais de 50% de células marcadas como marcação forte. A análise comparativa foi realizada através do cálculo do teste de Chi-quadrado de *Pearson* com a utilização do *software* de estatística SPSS versão 17.0.2 e, como parâmetro de significância, foi estabelecido o valor de  $p \leq 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS TUMORAIS

Conforme mencionado anteriormente, foram obtidas 90 amostras de tecido fresco congelado de TW compostas exclusiva ou predominantemente pelo componente celular blastematoso provenientes do banco de amostras do *COG*. Devido à raridade dos TW e pelo fato de que no Brasil a grande maioria das instituições terapêuticas segue o protocolo proposto pela *SIOP*, que adota a realização de QT pré-operatória, raramente são encontradas amostras tumorais que não tenham sido previamente expostas ao tratamento quimioterápico e, portanto, que não tenham sofrido uma possível interferência da QT pré-operatória na expressão de seus genes. Por este fato, visando retratar com mais fidelidade as características naturais de um tumor ao diagnóstico, estabelecemos esta colaboração com o *COG* com a finalidade de obter amostras sem tratamento quimioterápico, uma vez que este grupo preconiza a cirurgia como primeira intervenção terapêutica. Desta colaboração obtivemos inicialmente 30 amostras e posteriormente mais 60 amostras de tecido fresco congelado de TW provenientes de pacientes não submetidos à quimioterapia pré-operatória sendo que, parte destas amostras são oriundas de pacientes que apresentaram recaída tumoral após o tratamento quimioterápico e foram consideradas de evolução clínica desfavorável (ED) e outra parte, de pacientes que não apresentaram recaída tumoral apesar de possuírem doença disseminada (estádios III e IV) sendo, por este motivo consideradas de evolução clínica favorável (EF). A opção

pela utilização somente de amostras de estádios avançados para a caracterização de evolução favorável teve o intuito de garantir que tumores potencialmente resistentes à quimioterapia, porém limitados ao rim (estádios I e II), que possam ter sido completamente ressecados cirurgicamente (com ausência de doença residual após a cirurgia) e, por este motivo, não terem apresentado recaída tumoral após o tratamento quimioterápico, pudessem ser erroneamente considerados como sensíveis à quimioterapia e interpretados como EF. A aquisição do segundo grupo de 60 amostras teve a finalidade de aumentar o poder estatístico da validação dos genes selecionados através da confirmação da expressão diferencial destes genes em um maior número de amostras de TW e que também pudessem representar as situações de melhor e pior evolução clínica. As características clínicas das amostras de TW estão expostas nas Tabelas 4, 5 e 6.

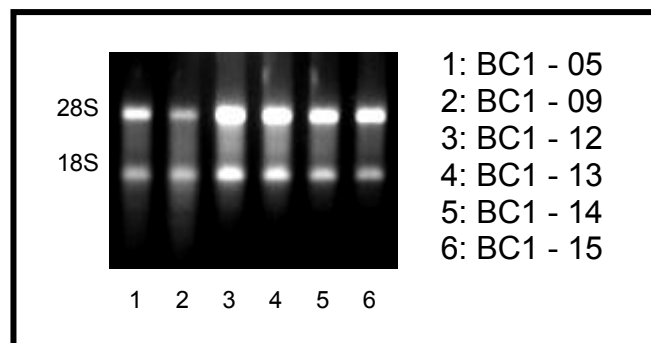
Todas as amostras foram revisadas pelo Dr. Fernando Augusto Soares, responsável pelo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo. Do grupo inicial, quatro amostras foram excluídas sendo uma (BC1-11) por falta de tecido tumoral viável e as outras três (BC1-3, 6 e 16) por não apresentarem células blastematosas passíveis de separação dos outros componentes celulares por microdissecção manual. As demais 26 amostras (13 com recaída tumoral e 13 sem recaída tumoral) foram todas submetidas à microdissecção manual para posterior hibridização. Do grupo independente, duas amostras (P125 e P1021) foram excluídas por conterem quantidade insuficiente de tecido tumoral viável em meio à grande quantidade de material necrótico e somente cinco das 58 amostras restantes precisaram ser submetidas à microdissecção manual para seguirem no estudo.

#### 4.1.1 Extração e Amplificação do RNA

##### 4.1.1.1 Amostras Não Microdissecadas a Laser

O RNA total das 84 amostras oriundas dos dois grupos de amostras (26 do grupo inicial e 58 do grupo independente) foi isolado utilizando-se o método de extração por Trizol (*Trizol Reagent*<sup>®</sup> - Invitrogen).

Do grupo inicial, todas as amostras apresentaram concentrações de RNA satisfatórias e, quando avaliadas quanto à sua integridade através de eletroforese em gel de agarose, todas apresentaram bandas nítidas correspondentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S, com uma relação entre elas superior a 1 sendo, portanto, consideradas como de boa qualidade (Figura 2). As 26 amostras foram submetidas a dois *rounds* de amplificação e apresentaram, ao final deste processo, um perfil de amplificação adequado, ou seja, com a maior concentração de aRNA entre 300 e 700pb (Tabela 4).



**Figura 2** - Exemplo da avaliação da integridade de algumas das amostras de RNA do grupo inicial.

**Tabela 4** – Características clínicas e resultado da quantificação do RNA das 26 amostras do grupo inicial microdissecadas manualmente e da referência universal, antes e após a amplificação.

Amostra	Estádio	Recaída	Pré Amplificação			Pós Amplificação		
			OD260/ OD280	[ ] final ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	Massa total ( $\mu\text{g}$ )	OD260/ OD280	[ ] final ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	Massa total ( $\mu\text{g}$ )
BC1-1	III	Sim	1,890	0,688	13,76	2,097	5,720	114,4
BC1-2	III	Sim	1,869	2,452	49,04	2,049	4,344	86,88
BC1-4	III	Sim	1,739	1,148	11,48	1,827	5,672	113,44
BC1-5	III	Sim	2,138	7,200	144,0	1,878	4,672	93,44
BC1-7	III	Sim	1,851	4,768	95,36	2,045	6,152	123,04
BC1-8	III	Sim	1,828	2,216	44,32	1,846	7,264	145,28
BC1-9	III	Sim	2,139	3,456	69,12	1,845	5,712	114,24
BC1-10	III	Não	1,834	2,612	52,24	2,101	6,672	133,44
BC1-12	III	Não	2,129	6,064	121,28	1,850	8,412	168,24
BC1-13	III	Não	2,148	5,120	102,4	1,837	6,864	137,28
BC1-14	III	Não	2,144	3,524	70,48	1,863	5,872	117,44
BC1-15	III	Não	2,103	3,280	65,6	1,825	6,992	139,84
BC1-17	III	Não	1,819	2,052	41,04	1,827	7,104	142,08
BC1-18	III	Não	2,119	6,120	122,4	1,820	7,192	143,84
BC1-19	IV	Sim	2,080	4,392	97,84	1,872	6,560	131,2
BC1-20	IV	Sim	1,846	3,108	62,16	2,098	6,480	129,6
BC1-21	IV	Sim	1,863	0,708	21,24	2,086	7,024	140,48
BC1-22	IV	Sim	2,102	2,472	49,44	1,853	6,568	131,36
BC1-23	IV	Sim	1,833	5,896	117,92	1,827	7,512	150,24
BC1-24	IV	Sim	2,044	2,052	41,04	1,911	6,008	120,16
BC1-25	IV	Não	2,114	3,272	65,44	2,056	6,208	124,16
BC1-26	IV	Não	1,949	0,764	15,28	1,903	5,800	116
BC1-27	IV	Não	1,825	3,176	63,52	1,835	6,488	129,76
BC1-28	IV	Não	1,829	5,472	109,44	1,829	7,592	151,84
BC1-29	IV	Não	1,810	5,648	112,96	1,865	7,072	141,44
BC1-30	IV	Não	2,036	1,132	22,64	2,048	6,160	123,2
Ref.				1,8		1,970	4,224	299,9

Ref.: referência universal; OD260: leitura da absorbância de luz de ácidos nucleicos a um comprimento de onda de 260nm; OD280: leitura da absorbância de luz de proteínas a um comprimento de onda de 280nm; OD260/OD280: relação entre as leituras das absorbâncias de luz de ácidos nucleicos e proteínas, onde OD260/OD280 = 2,0 corresponde a uma amostra com 100% de ácido nucleico, livre de contaminação por proteína. Este valor deve estar entre 1,8 e 2,0; [ ]: concentração final;  $\mu\text{g}$ : micrograma;  $\mu\text{L}$ : microlitro.

Das 58 amostras do grupo independente, 57 apresentaram concentrações de RNA satisfatórias (Tabela 5). Uma amostra (P173) apresentou uma quantidade final de RNA insuficiente para a utilização neste estudo (0,35 $\mu\text{g}$ ) sendo, por este motivo,



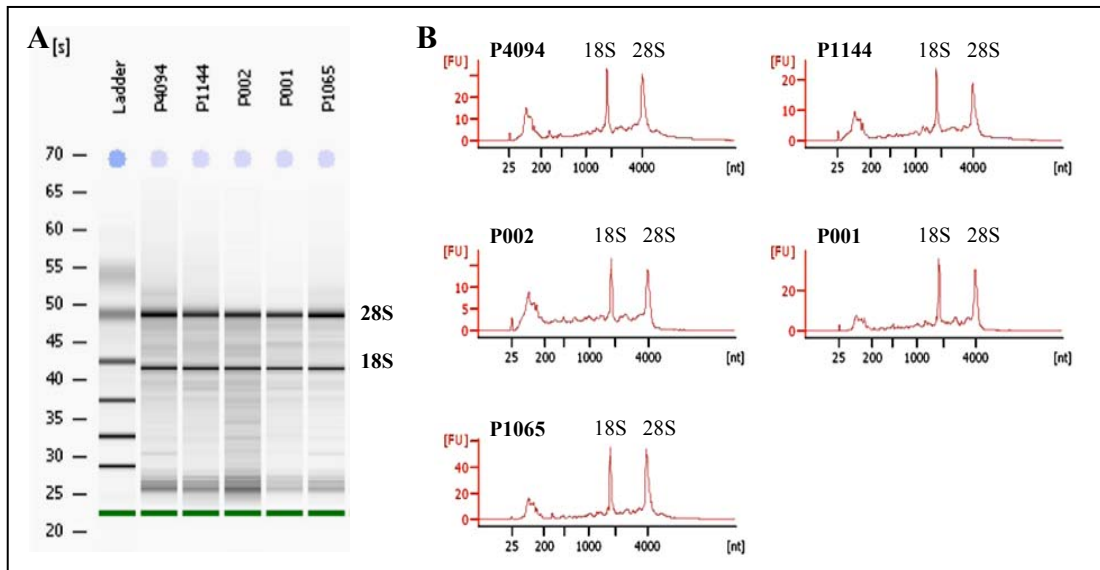
eliminada. As 57 amostras de RNA restantes foram avaliadas quanto à sua integridade com o uso do *Bioanalyzer*. Todas apresentaram picos nítidos correspondentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S, porém somente 35 delas apresentaram *RIN* > 5 e foram consideradas de boa qualidade (Figura 3).

**Tabela 5** – Características clínicas e resultado da quantificação do RNA das 57 das amostras de TW do grupo independente provenientes do banco de amostras do *COG*.

Amostra	Estádio	Recaída	Microdissecção Manual	OD260/OD280	[ ] final (µg/µL)	28S:18S	Integridade (valor <i>RIN</i> )
P001	III	Não	Sim	2,00	2,128	2:1	6,80
P002	III	Sim	Não	1,91	2,910	2:1	6,40
P031	IV	Não	Não	1,33	3,915	0:0	N/A
P032	III	Não	Não	1,69	3,622	0,5:1	2,70
P095	III	Não	Não	1,23	3,967	2:1	8,20
P117	IV	Sim	Não	1,80	3,480	0:0	2,50
P128	III	Sim	Não	2,00	1,200	2:1	7,80
P178	IV	Não	Não	1,63	3,668	1:1	5,70
P201	III	Sim	Não	1,61	3,793	2:1	7,30
P219	III	Sim	Não	1,96	2,855	2:1	7,20
P246	III	Não	Não	1,88	3,144	0,5:1	3,10
P277	II	Sim	Não	1,07	3,994	2:1	8,50
P321	IV	Não	Não	1,07	3,968	0:0	2,40
P329	IV	Não	Não	1,84	1,532	0:0	2,40
P341	II	Sim	Não	1,83	2,927	0:0	N/A
P342	IV	Sim	Não	1,36	3,941	2:1	5,70
P353	III	Não	Não	1,94	0,597	2:1	4,20
P396	IV	Sim	Não	1,72	3,660	2:1	3,70
P399	III	Não	Não	1,96	2,847	2:1	6,80
P411	I	Sim	Não	1,81	3,413	1:1	3,70
P420	III	Sim	Não	1,88	3,139	2:1	7,00
P472	IV	Não	Sim	1,95	2,424	0:0	2,30
P495	III	Sim	Não	1,28	3,920	2:1	6,00
P497	II	Sim	Não	1,04	3,995	0:0	N/A
P526	II	Sim	Não	1,89	0,813	0:0	2,40
P575	IV	Não	Não	1,97	1,472	0:0	2,20
P697	II	Sim	Não	1,17	3,955	1:1	5,60
P970	III	Sim	Sim	1,95	1,086	1:1	N/A
P1060	IV	Não	Não	1,21	3,955	2:1	7,20
P1065	III	Não	Não	1,59	3,819	2:1	7,60

P1068	IV	Não	Não	1,79	3,467	2:1	8,70
P1070	IV	Não	Não	1,16	3,975	2:1	6,50
P1088	III	Não	Não	1,47	3,850	2:1	5,70
P1099	III	Não	Sim	1,98	1,840	1:1	3,20
P1104	I	Sim	Não	1,14	3,990	2:1	8,40
P1108	II	Sim	Não	1,91	3,203	2:1	5,20
P1110	IV	Não	Sim	1,98	1,463	2:1	4,50
P1124	III	Não	Não	1,95	2,689	2:1	8,20
P1144	IV	Não	Não	1,94	2,811	2:1	6,60
P1232	III	Sim	Não	1,42	3,858	0:0	N/A
P1247	IV	Não	Não	1,46	3,853	1:1	6,20
P1290	III	Não	Não	1,98	2,480	2:1	6,40
P2050	III	Não	Não	1,45	3,896	2:1	8,30
P2063	III	Não	Não	1,81	3,493	2:1	7,10
P2081	III	Não	Não	1,84	3,339	2:1	9,10
P2113	IV	Não	Não	1,13	3,991	1:1	5,50
P2182	III	Não	Não	1,92	0,895	0:0	2,50
P4057	III	Sim	Não	1,63	3,735	2:1	6,30
P4094	III	Não	Não	1,33	3,909	2:1	7,00
P4135	IV	Não	Não	1,08	3,948	1:1	4,80
P4159	III	Não	Não	1,93	2,988	2:1	5,80
P4181	III	Não	Não	1,60	3,739	2:1	7,50
P4196	IV	Não	Não	1,17	3,913	2:1	6,40
P4272	III	Não	Não	1,85	3,227	2:1	8,40
P4305	III	Não	Não	1,96	2,907	1:1	3,80
P6000	III	Não	Não	1,83	3,376	0,5:1	3,10
P6011	III	Sim	Não	2,01	1,686	2:1	4,20

N/A: Não avaliável; *RIN*: *RNA integrity number*; OD260/OD280: relação entre as leituras das absorvâncias de luz de ácidos nucleicos e proteínas, onde OD260/OD280 = 2,0 corresponde a uma amostra com 100% de ácido nucleico, livre de contaminação por proteína. Este valor deve estar entre 1,8 e 2,0; 28S:18S: relação entre as bandas 28S e 18S; [ ]: concentração final; µg: micrograma; µL: microlitro.



**Figura 3** – Exemplo da avaliação da integridade do RNA de 5 amostras aleatórias de TW com o uso do *Bioanalyzer*. O programa gera duas imagens, uma correspondente a um gel de agarose (A) que mostra as bandas 28 e 18S, permitindo uma avaliação visual da integridade e a outra, referente a um eletroesferograma (B) 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).

#### 4.1.1.2 Amostras Microdissecadas a *Laser*

Na ocasião da hibridização das amostras com a Plataforma de Vias de Sinalização Celular, 24 das 30 amostras de TW do grupo inicial haviam sido submetidas à microdissecção a *laser* para o isolamento do componente blastematoso para serem utilizadas em outro projeto, também em andamento em nosso laboratório. Devido à disponibilidade e pureza deste material, optamos por utilizar estas amostras microdissecadas a *laser* para a hibridização na Plataforma de Vias de Sinalização Celular. Conseqüentemente, elas também foram utilizadas para a validação experimental por RT-PCR em tempo real dos genes selecionados a partir desta plataforma. A microdissecção destas amostras foi realizada pela patologista Dra. Renata Couldri, com a utilização do aparelho *Pixcell Laser Capture Microdissection System* (*Arcturus Systems for Microgenomics*), pertencente ao Departamento de

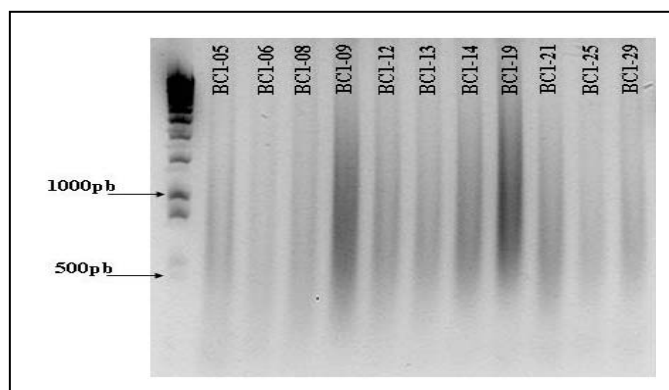
Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo. O ajuste do diâmetro do feixe de raios *laser* para 15µm permitiu coletar de uma a duas células por disparo. Das seis amostras que não foram microdissecadas a *laser*, uma (BC1-11) já havia sido previamente descartada na microdissecção manual por falta de tecido tumoral viável como exposto anteriormente e as outras cinco (BC1-1, 20, 24, 26 e 30) foram excluídas por não apresentarem material tumoral restante para microdissecção a *laser*. As amostras BC1-3, 6 e 16, à princípio excluídas por não apresentarem células blastematosas passíveis de separação dos demais componentes celulares por microdissecção manual, puderam ser utilizadas neste momento, uma vez que a microdissecção a *laser* permitiu o isolamento das células blastematosas.

O RNA destas 24 amostras (12 com recaída e 12 sem recaída) foi isolado com a utilização do kit *PicoPure<sup>TM</sup> RNA Isolation KIT (ARCTURUS # KIT0204)* e em seguida submetido a dois *rounds* de amplificação com a utilização do kit *RiboAmp<sup>TM</sup> RNA amplification (ARCTURUS # KIT0201)*. As quantidades obtidas de RNA após a amplificação foram bastante satisfatórias (Tabela 6). A avaliação por eletroforese do RNA amplificado (aRNA) revelou um perfil de amplificação adequado, com uma concentração preferencial de fragmentos de 500 a 1000pb (Figura 4).

**Tabela 6** - Características clínicas e resultado da quantificação do aRNA das 24 amostras de TW do grupo inicial microdissecadas a *laser*.

Amostra	Estádio	Recaída	OD260/OD280	[ ] final (µg/µL)	Massa total (µg)
BC1-02	III	Sim	2,66	1,843	60,83
BC1-03	III	Sim	2,46	2,238	73,86
BC1-04	III	Sim	2,68	0,823	27,16
BC1-05	III	Sim	2,35	3,285	98,57
BC1-06	III	Sim	1,94	4,467	134,02
BC1-07	III	Sim	2,52	2,101	69,34
BC1-08	III	Sim	2,08	4,427	132,82
BC1-09	III	Sim	2,44	3,110	102,66
BC1-10	III	Não	2,05	4,317	129,53
BC1-12	III	Não	2,2	4,029	120,87
BC1-13	III	Não	2,15	4,230	126,90
BC1-14	III	Não	2,32	3,717	111,53
BC1-15	III	Não	2,14	4,275	128,26
BC1-16	III	Não	2,39	2,502	75,07
BC1-17	III	Não	2,51	2,775	91,60
BC1-18	III	Não	2,49	3,018	90,55
BC1-19	IV	Sim	2,64	2,210	72,96
BC1-21	IV	Sim	2,09	4,198	125,96
BC1-22	IV	Sim	2,43	2,354	70,62
BC1-23	IV	Sim	2,3	1,966	64,90
BC1-25	IV	Não	1,98	4,417	132,52
BC1-27	IV	Não	2,52	2,720	81,62
BC1-28	IV	Não	2,46	2,162	71,36
BC1-29	IV	Não	2,35	3,023	99,79

OD260/OD280: relação entre as leituras das absorvâncias de luz de ácidos nucléicos e proteínas, onde OD260/OD280 = 2,0 corresponde a uma amostra com 100% de ácido nucléico, livre de contaminação por proteína. Este valor deve estar entre 1,8 e 2,0; [ ]: concentração final; µg: micrograma; µL: microlitro.



**Figura 4** - Distribuição dos fragmentos de aRNA de 11 das 24 amostras de TW microdissecadas a *laser* em gel de agarose 1%. Marcador de 1Kb (*Invitrogen*). pb: pares de base

## 4.2 SÍNTESE DE cDNA

Para as reações de RT-PCR em tempo real, as amostras de TW obtidas por microdissecção manual foram submetidas à síntese de cDNA a partir de 2 $\mu$ g de RNA total, resultando num total de 26 amostras do grupo inicial utilizadas para a validação experimental dos genes selecionados a partir da Plataforma Universal 4.8K003 e 57 amostras do grupo independente utilizadas para a validação biológica a partir de ambas as plataformas. Para a validação biológica dos genes selecionados a partir da Plataforma de Vias de Sinalização Celular, o cDNA foi sintetizado a partir das 24 amostras obtidas por microdissecção a *laser*. A amplificação do fragmento do gene *GAPDH* foi positiva para todas as amostras, incluindo o *pool* de rim fetal, revelando uma síntese eficiente de cDNA.

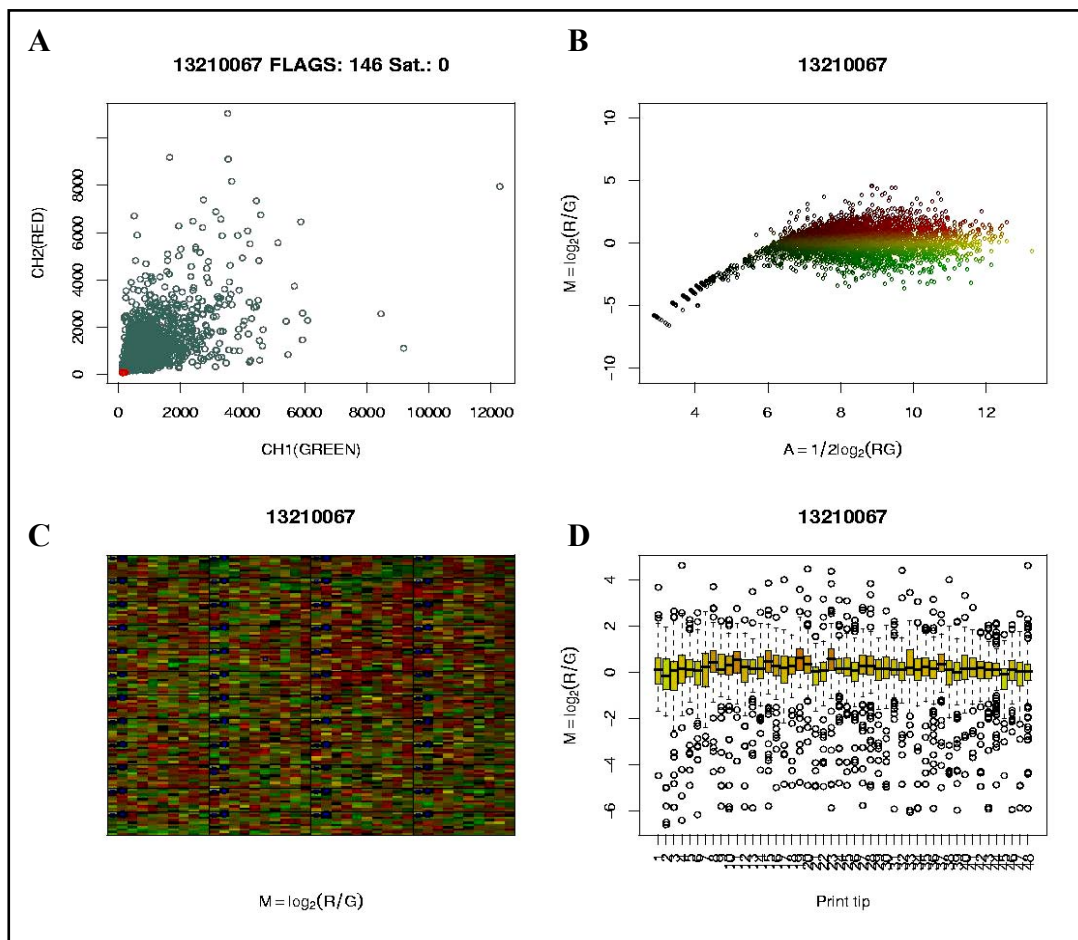
### 4.3 *MICROARRAY*

Pelo fato do processo de seleção de genes diferencialmente expressos ter sido realizado através de duas plataformas distintas de microarray de *cDNA* e a partir de dois grupos independentes de amostras (com e sem microdissecção a *laser*), os resultados referentes às hibridizações, às pré-análises e às análises matemáticas e estatísticas para a identificação dos genes diferencialmente expressos, serão apresentados separadamente para cada uma das plataformas para uma melhor compreensão.

#### 4.3.1 **Plataforma Universal 4.8K003**

Vinte e seis amostras de TW não microdissecadas a *laser* (13 com recaída e 13 sem recaída tumoral) e a amostra referência foram marcadas com alexa 555 e com alexa 647, totalizando 54 amostras.

Após os passos de marcação, hibridização e captura de sinal, os dados foram submetidos às denominadas pré-análises para a verificação da qualidade das lâminas. O primeiro passo foi a medição dos valores de intensidade de fluorescência para cada gene, após a subtração de sinal do *background*. Os gráficos (*MA*, *Log X Log* e *BoxPlot*) abaixo mostram as intensidades dos fluoróforos (alexa 555 e alexa 647) de uma mesma lâmina, sem nenhum tipo de normalização dos dados (Figura 5).



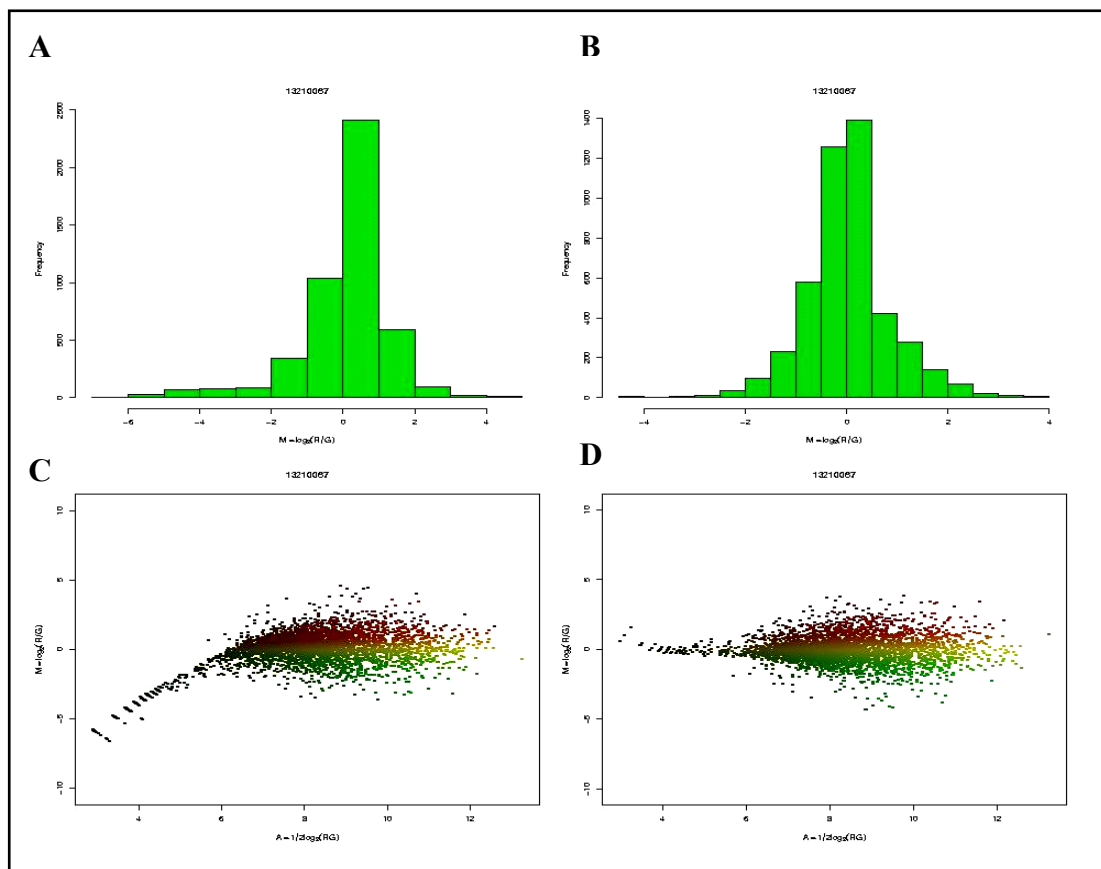
**Figura 5** - Representação da fluorescência de todos os genes de uma lâmina. **A**: Relação da intensidade bruta dos fluoróforos (alexa 555/alexa 647) de uma lâmina. Os pontos em vermelho foram retirados da análise, calculados pelo quantil local. **B**: Gráfico representando a razão (alexa 555/alexa 647) no eixo y e a intensidade em escala logarítmica no eixo x. Os pontos em azul/cinza representam os *spots* que apresentaram sinal menor que o sinal do *background*. **C**: Gráfico representativo da lâmina. Pontos em azul representam genes que foram excluídos pelo programa *Scannarray* ou manualmente. **D**: Representação da dispersão de pontos de cada *sub-array* (1 *sub-array* contém 100 *spots*). O bloco verde representa a concentração da maior parte dos pontos, segundo a razão de intensidade. A linha é a mediana calculada levando em consideração apenas os pontos do bloco verde.

Com o objetivo de minimizar a interferência de artefatos experimentais na análise quantitativa das diferenças biológicas entre as amostras, foi realizada a normalização com a utilização do método de regressão linear de *Lowess*, considerando um intervalo de 20% (Figura 6). Foi possível observar que, após a normalização (Figura 6, itens B e D), a maior parte dos pontos foi trazida para

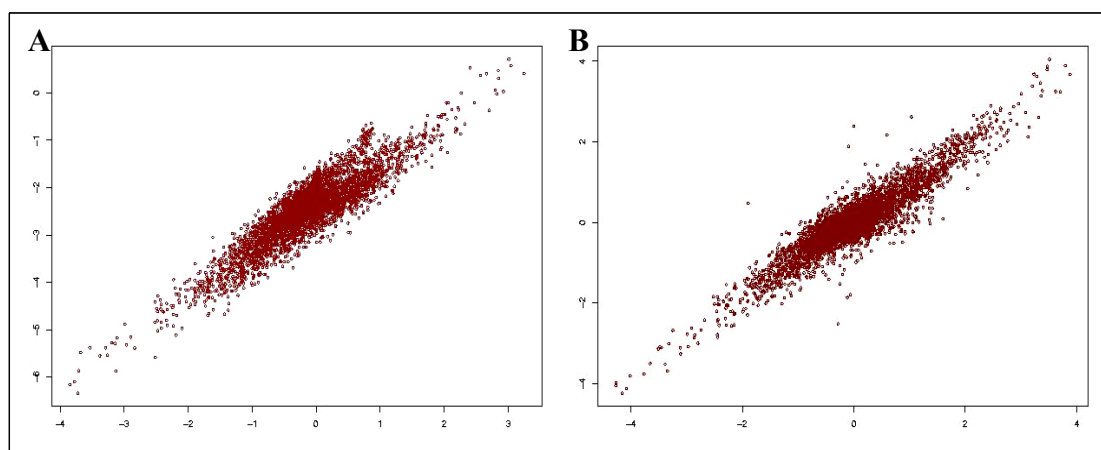


próximo de zero, indicando que não há diferença de expressão entre a amostra-teste e a amostra-referência para a maior parte dos genes, o que é esperado.

Em seguida foi analisada a eficiência de incorporação dos fluoróforos (alexa 555 e alexa 647) entre as lâminas controle e *swap* com inversão dos fluoróforos (réplicas), através de uma correlação de *Pearson* (Figura 7). Esta análise se fez necessária neste estudo uma vez que o padrão geral de expressão gênica entre as amostras referência e as amostras teste não apresentam grande similaridade. Para todas as amostras a correlação de *Pearson* entre as lâminas controle e *swap*, após a normalização, foi superior a 80% (Tabela 7).



**Figura 6** – Gráficos representativos da normalização de *Lowess*. O histograma (A e B) mostra a distribuição da medida relativa dos dados da amostra BC1 – 7 em relação à sua referência. Os itens C e D mostram a distribuição dessa medida segundo a intensidade de fluorescência. A e C: representação dos dados antes de serem normalizados. B e D: representação dos dados normalizados, onde houve uma correção da distorção dos pontos.



**Figura 7** - Correlação de *Pearson* da Amostra BC1 - 7. Cada eixo do gráfico (*MM Plot*) representa uma das lâminas (controle e *swap*) e a Figura obtida é uma dispersão de pontos, sendo que cada ponto corresponde à relação entre os valores de intensidade das lâminas controle e swap para um determinado gene. **Eixo x**: lâmina controle amostra-teste (alexa 555) / amostra-referência (alexa 647); **eixo y**: lâmina swap amostra-referência (alexa 555) / amostra-teste (alexa 647). **A**: Dados não normalizados (correlação de *Pearson* = 90,16%). **B**: Dados normalizados (correlação de *Pearson* = 92,28%).

**Tabela 7** - Valores normalizados para as amostras de TW revelando a replicabilidade experimental em relação à incorporação dos fluoróforos (Alexa 555 e alexa 647) entre as lâminas controle e *swap* através de correlação de *Pearson*.

<b>Amostra</b>	<b>Correlação de <i>Pearson</i></b>
BC1 - 1	0,9101
BC1 - 2	0,9395
BC1 - 3	NR
BC1 - 4	0,8498
BC1 - 5	0,8644
BC1 - 6	NR
BC1 - 7	0,9228
BC1 - 8	0,8819
BC1 - 9	0,8224
BC1 - 10	0,8493
BC1 - 11	NR
BC1 - 12	0,9258
BC1 - 13	0,9054
BC1 - 14	0,8762
BC1 - 15	0,9099
BC1 - 16	NR
BC1 - 17	0,9024
BC1 - 18	0,9179
BC1 - 19	0,8980
BC1 - 20	0,8889
BC1 - 21	0,9070
BC1 - 22	0,8908
BC1 - 23	0,8656
BC1 - 24	0,9280
BC1 - 25	0,8850
BC1 - 26	0,9307
BC1 - 27	0,9199
BC1 - 28	0,9000
BC1 - 29	0,9219
BC1 - 30	0,9357

NR: não realizado

Quando comparados os níveis de expressão das 4.608 sequências de cDNA desta plataforma, sessenta e nove apresentaram diferença de expressão entre as amostras EF e ED com valor de  $p \leq 0,01$  sendo, portanto, consideradas como diferencialmente expressas. A relação entre a expressão destas sequências (*fold*) encontrada nas duas populações gênicas avaliadas (ED/EF) variou de -2,0 a 1,7. Esta variação pouco representativa na expressão gênica entre essas duas populações era esperada uma vez que envolvem amostras com características biológicas muito semelhantes, ou seja, todas são compostas por células de TW e de um mesmo componente celular (componente blastematoso). Ao estabelecermos como corte uma diferença de expressão mínima de 1,5 vezes ( $fold \geq 1,5$  e  $\leq -1,5$ ), pudemos selecionar 10 genes (Tabela 8). Os genes selecionados foram: *TSPAN3*, *HOXA11*, *ARPC5*, *MAP1B*, *KNTC1*, *MPP2*, *MCM2*, *RGS16*, *CDO1* e *NCOA6*.

**Tabela 8** - Lista dos 10 genes diferencialmente expressos selecionados entre as amostras de TW EF e ED, a partir da plataforma Universal 4.8K003, considerando  $p \leq 0,01$  e  $fold$  ED/EF  $\geq 1,5$  e  $\leq -1,5$ . *Fold* ED/EF < 1 corresponde às amostras com maior expressão nos TW EF em relação aos TW ED.

Gene	Gene ID	Localização	<i>Fold</i> ED/EF	<i>p</i>
<i>TSPAN3</i>	NM_005724	15q24.3	-1,5	0
<i>HOXA11</i>	NM_005523	7p15-p14	-2,0	0,001
<i>ARPC5</i>	NM_005717	1q25.3	1,5	0,004
<i>MAP1B</i>	NM_005909	5q13	1,5	0,006
<i>KNTC1</i>	NM_014708	12q24.31	1,5	0,006
<i>MPP2</i>	NM_005374	17q12-q21	-1,5	0,007
<i>MCM2</i>	NM_004526	3q21	-1,5	0,007
<i>RGS16</i>	NM_002928	1q25-q31	1,7	0,008
<i>CDO1</i>	NM_001801	5q22-q23	-1,6	0,009
<i>NCOA6</i>	NM_014071	20q11	-1,6	0,009

Gene: Símbolo do gene; Gene ID: número de acesso do gene no *GenBank*; Localização: localização cromossômica do gene.

Frente a este número de genes, optamos por seguir com todos os 10 genes para a validação da expressão gênica diferencial, independentemente de suas características biológicas.

Durante o andamento deste estudo, tivemos a oportunidade de estabelecer uma colaboração com a Dra. Elizabeth J. Perlman, patologista do *Children's Memorial Hospital* (Chicago, IL, EUA), especializada em patologia pediátrica, sobretudo em TW e tumores germinativos e também, patologista responsável pelo *Renal Tumor Biology Committee - COG*. Nesta ocasião a Dra. Elizabeth J. Perlman estava conduzindo um estudo (HUANG et al. 2009) similar ao nosso, também em busca de genes associados à recaída tumoral em TW, através do qual foram identificados, também por *microarray* de cDNA, genes diferencialmente expressos entre TW com e sem recaída tumoral, selecionados a partir de 144 amostras de TW provenientes da ressecção tumoral de pacientes não submetidos à QT pré-operatória e que apresentavam estágio avançado da doença (Estádio III) dos quais, 53 vieram a apresentar recaída tumoral após o tratamento quimioterápico. Estes genes foram comparados aos 69 genes diferencialmente expressos ( $p \leq 0,01$ ) selecionados em nosso estudo em relação à concordância do perfil de expressão entre os grupos de amostras com e sem recaída tumoral. A partir desta comparação, foi possível identificar 11 genes em comum com o mesmo perfil de expressão entre TW com e sem recaída por ambos os estudos, 6 deles (*TMEM63A*, *KIAA0368*, *HPGD*, *HBEGF*, *CDO1*, *ANKMY2*) com valor de  $p \leq 0,01$  e 5 (*UBAP1*, *KIAA0913*, *HOXA11*, *KNTC1*, *DUOX1*) com valor de  $p \leq 0,05$  no estudo conduzido pela Dra. Elizabeth J. Perlman. Estes 11 genes foram então incluídos na validação por RT-PCR em tempo real sendo que três deles (*CDO1*, *HOXA11*, *KNTC1*) estão entre os 10 genes selecionados em

nosso estudo, o que totaliza 18 genes (*TSPAN3*, *HOXA11*, *ARPC5*, *MAP1B*, *KNTC1*, *MPP2*, *MCM2*, *RGS16*, *CDO1*, *NCOA6*, *TMEM63A*, *KIAA0368*, *HPGD*, *HBEGF*, *ANKMY2*, *UBAP1*, *KIAA0913*, *DUOX1*) para terem sua expressão diferencial validada por RT-PCR em tempo real. Foram desenhados *primers* para cada um dos 18 genes selecionados. Os *primers* utilizados estão listados na Tabela 9.

**Tabela 9** – *Primers* dos genes selecionados a partir da Plataforma Universal 4.8K003 e tamanho do fragmento amplificado (*amplicom*).

<b>Gene</b>	<b>Primer Forward</b>	<b>Primer Reverse</b>	<b>Amplicom</b>
<i>TSPAN3</i>	CATGTGATCTGGGCCG	CGCCAGTGATGAGGAG	118pb
<i>HOXA11</i>	CCGAGAGCAGCAGCAG	CTTGGTATAGGGGCAGC	104pb
<i>ARPC5</i>	GGATTTGAGAGCCCGTC	GACCCTACTCCTCCAG	83pb
<i>MAP1B</i>	GAAGGAAAGGCTCAGTGG	GCTGTTTCTCATGGGTCTC	103pb
<i>KNTC1</i>	GCTTTGGAATGGACTCTTGC	GAATGGATACTGGAGATGGC	90pb
<i>MPP2</i>	CGCTGGAGAGTGGAATATC	GGTCAAAGTAGTGCCCG	105pb
<i>MCM2</i>	CAGCAGGACACTATTGAGG	GCAGAGAGGTTGTGGATG	77pb
<i>RGS16</i>	CAGGGCACACCAGATC	GGTTCATCCTCGTCAGC	95pb
<i>CDO1</i>	CAGTCCACCTTTTGATAC	CTTAGTTGTTCTCCAGC	134pb
<i>NCOA6</i>	CTGAAAGTGTGGAAAATGG	CCTGCTTGTTTACTTGG	122pb
<i>TMEM63A</i>	GTGACAAAGGAAGTGAGG	GATGTTGTGGATGGCACC	146pb
<i>KIAA0368</i>	CTGTGATAGAATTGCTGC	GTGTTTTCTCAGTAACGC	165pb
<i>HPGD</i>	CAATTGAAAAAGAAGAAAACATGG	GTGATCTTCATAATAGCACC	160pb
<i>HBEGF</i>	GGAGAGGAGGTTATGATGTG	GTCTTCTCAGAGGTAGCAG	116pb
<i>ANKMY2</i>	CTGCCAAAGAAAAGAGAC	GAGAGATACCTACTTCAG	99pb
<i>UBAP1</i>	GAGGCTCTGAAAATGCAC	GCATTGTCCTGGTCATTG	140pb
<i>KIAA0913</i>	GGCACACAACGATCACC	CATGACGATCTCCTGCAG	169pb
<i>DUOX1</i>	CCTTCTTCAACTCCCTGCAG	CGGTCTGCTGTTGATG	129pb

Gene: símbolo do gene; pb: pares de base

Quando testados através da amplificação de seus fragmentos por PCR comum e visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e coloração com prata, todos os pares de *primers* apresentaram amplificação positiva e específica de seus fragmentos, com exceção dos *primers* para o gene *HOXA11* cuja amplificação

foi inespecífica. O mesmo resultado foi encontrado quando os *primers* foram testados por RT-PCR em tempo real. As curvas de dissociação obtidas mostraram-se específicas para todos os genes, porém novamente para o gene *HOXA11* o resultado não foi satisfatório uma vez que o gráfico da curva de dissociação apresentou diversos picos, indicando uma falta de especificidade da reação. Por este motivo, foi desenhado um novo par de *primers* para este gene que, no entanto, também apresentou amplificação inespecífica o que fez com que optássemos por excluir o gene *HOXA11* do estudo. As concentrações dos *primers* adotadas para os demais genes estão demonstradas na Tabela 10. Quando verificada a eficiência de amplificação desses *primers* em diferentes condições de amplificação, os genes *HPGD* e *DUOX1* apresentaram uma eficiência de amplificação insatisfatória e foram retirados da análise. Os valores da eficiência obtida para cada um dos genes restantes estão listados na Tabela 10.

As reações de amplificação de todos os 15 genes alvo restantes e dos 4 genes normalizadores testados foram realizadas conforme descrição prévia a partir do cDNA de cada uma das 26 amostras de TW (13 EF e 13 ED) não microdissecadas a *laser* e da amostra referência (*pool* de rins fetais normais), o que caracteriza a etapa de validação experimental. Dos quatro genes constitutivos testados (*GAPDH*, *ACTB*, *BCR* e *huPO*) com a utilização da ferramenta *GeNorm* (VANDESOMPELE et al. 2002), *ACTB* e *GAPDH* foram apontados como tendo a expressão mais estável entre as amostras de TW analisadas. Por este motivo, optamos por usar a média de suas expressões para o cálculo da expressão gênica diferencial das amostras.

**Tabela 10** – Valores da eficiência dos *primers* e a concentração de *primer* escolhida para o cálculo da expressão gênica nas amostras de TW.

Gene	Eficiência dos <i>primers</i>	Concentração dos <i>primers</i>
<b>Genes Normalizadores</b>		
<i>GAPDH</i>	94%	400nM
<i>ACTB</i>	87%	400nM
<i>BCR</i>	79%	400nM
<i>huPO</i>	78%	400nM
<b>Genes Alvo</b>		
<i>TSPAN3</i>	89%	400nM
<i>ARPC5</i>	91%	400nM
<i>MAP1B</i>	88%	400nM
<i>KNTC1</i>	89%	400nM
<i>MPP2</i>	97%	400nM
<i>MCM2</i>	90%	200nM
<i>RGS16</i>	95%	200nM
<i>CDO1</i>	105%	800nM
<i>NCOA6</i>	94%	800nM
<i>TMEM63A</i>	97%	400nM
<i>KIAA0368</i>	85%	400nM
<i>HBEGF</i>	102%	400nM
<i>ANKMY2</i>	99%	800nM
<i>UBAPI</i>	104%	400nM
<i>KIAA0913</i>	95%	800nM

Gene: Símbolo do gene; nM: nanoMolar.

A análise da expressão diferencial dos 15 genes alvo testados, determinada pelo método de quantificação relativa (PFAFFL 2001) em relação à média da expressão dos genes *ACTB* e *GAPDH*, confirmou 5 deles (*TSPAN3*, *MPP2*, *MCM2*, *CDO1* e *NCOA6*) como diferencialmente expressos entre TW EF e ED ( $p \leq 0,05$ ), todos eles mais expressos nas amostras de evolução favorável ( $fold\ ED/EF < 1$ ), o que é compatível com o perfil encontrado pelos dados de *microarray* (Tabela 11, Figura 8).

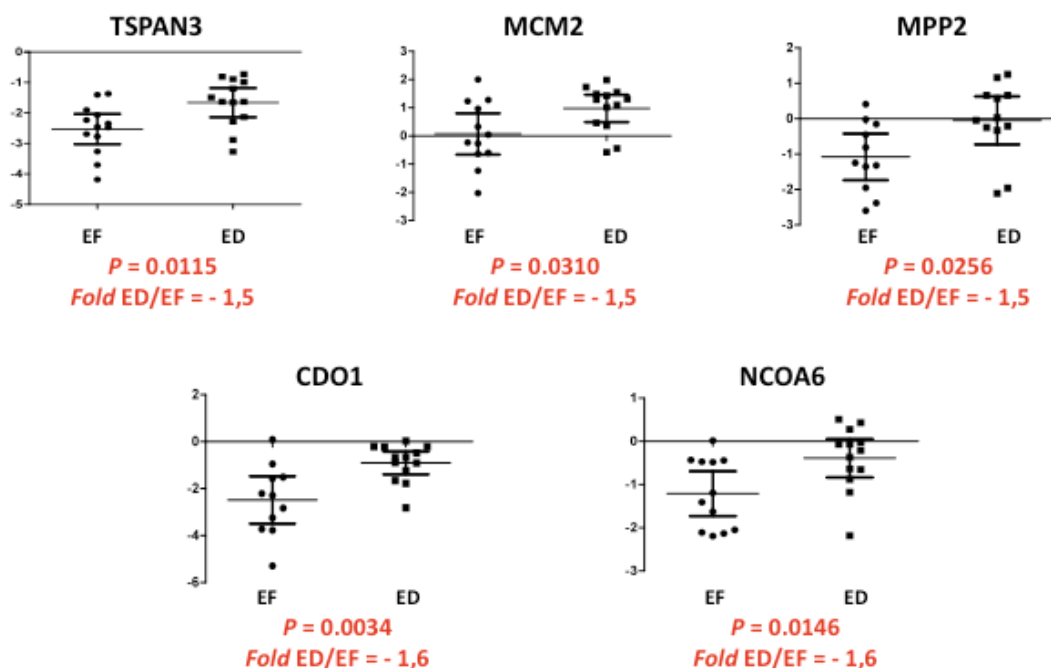


**Tabela 11** – Resultado da validação experimental da expressão dos genes selecionados entre amostras de TW de evolução favorável (EF) e desfavorável (ED) em valores de  $p$  e de  $fold$ . Em negrito estão evidenciados os genes com  $p < 0,05$ .  $Fold$  ED/EF < 1 corresponde às amostras com maior expressão nos TW EF em relação aos TW ED.

Gene	$P$	$Fold$ (ED/EF) <i>microarray</i>	$Fold$ (ED/EF) RT-PCR
<b><i>TSPAN3</i></b>	<b>0,0115</b>	<b>-1,5</b>	<b>-1,8</b>
<i>ARPC5</i>	0,9007	1,5	-1,04
<i>MAP1B</i>	0,1150	1,5	1,48
<i>KNTC1</i>	0,1961	1,5	-1,37
<b><i>MPP2</i></b>	<b>0,0256</b>	<b>-1,5</b>	<b>-2,06</b>
<b><i>MCM2</i></b>	<b>0,0310</b>	<b>-1,5</b>	<b>-1,6</b>
<i>RGS16</i>	0,9468	1,7	-1,12
<b><i>CDO1</i></b>	<b>0,0034</b>	<b>-1,6</b>	<b>-1,12</b>
<b><i>NCOA6</i></b>	<b>0,0146</b>	<b>-1,6</b>	<b>-1,69</b>
<i>TMEM63A</i>	0,8016	1,1	1,06
<i>KIAA0368</i>	0,8985	1,3	1,06
<i>HBEGF</i>	0,0920	1,2	1,93
<i>ANKMY2</i>	0,0875	-1,1	-2,05
<i>UBAP1</i>	0,1966	-1,1	-1,36
<i>KIAA0913</i>	0,4241	1,2	-1,14

Gene: Símbolo do gene

O nome completo dos genes, assim como sua localização cromossômica e função resumida estão expostos na Tabela 12. Como a função gênica não foi utilizada como parâmetro para a seleção dos genes diferencialmente expressos, as características dos genes selecionados serão melhor abordadas na discussão deste estudo.



**Figura 8** – Genes validados experimentalmente por RT-PCR em tempo real, selecionados a partir da plataforma Universal 4.8K003. Gráficos gerados pelo programa *GraphPad Prism* representando a distribuição dos valores em log<sub>2</sub> da expressão de cada um dos 5 genes alvo em relação à média da expressão de *ACTB* e *GAPDH* para cada uma das 26 amostras testadas. EF: evolução favorável; ED: evolução desfavorável. *Fold ED/EF* < 1 corresponde a uma maior expressão nos TW EF em relação aos TW ED.

**Tabela 12** - Genes selecionados para validação biológica a partir de plataforma de *microarray* 4.8K003, com localização cromossômica e função resumida.

Gene	Nome	Gene ID	Localização	Função Protéica
<i>TSPAN3</i>	<i>Tetraspanin 3</i>	NM_005724	15q24.3	Regulação do desenvolvimento, ativação, crescimento e mobilidade celular.
<i>MPP2</i>	<i>Membrane protein, palmitoylated 2</i>	NM_005374	17q12-q21	Interação com citoesqueleto, regulação da proliferação celular, comunicação intracelular e vias de sinalização.
<i>MCM2</i>	<i>Minichromosome maintenance complex component 2 / DNA replication licensing factor</i>	NM_004526	3q21	Replicação do DNA, regulação do ciclo celular, promotor da proliferação celular
<i>CDO1</i>	<i>Cysteine dioxygenase, type I</i>	NM_001801	5q22-q23	Responsável pela oxidação da cisteína em sulfato inorgânico.
<i>NCOA6</i>	<i>Nuclear receptor coactivator 6</i>	NM_014071	20q11	Interação positiva sobre a função ativadora de transcrição de diversos receptores celulares, como receptores retinóides.

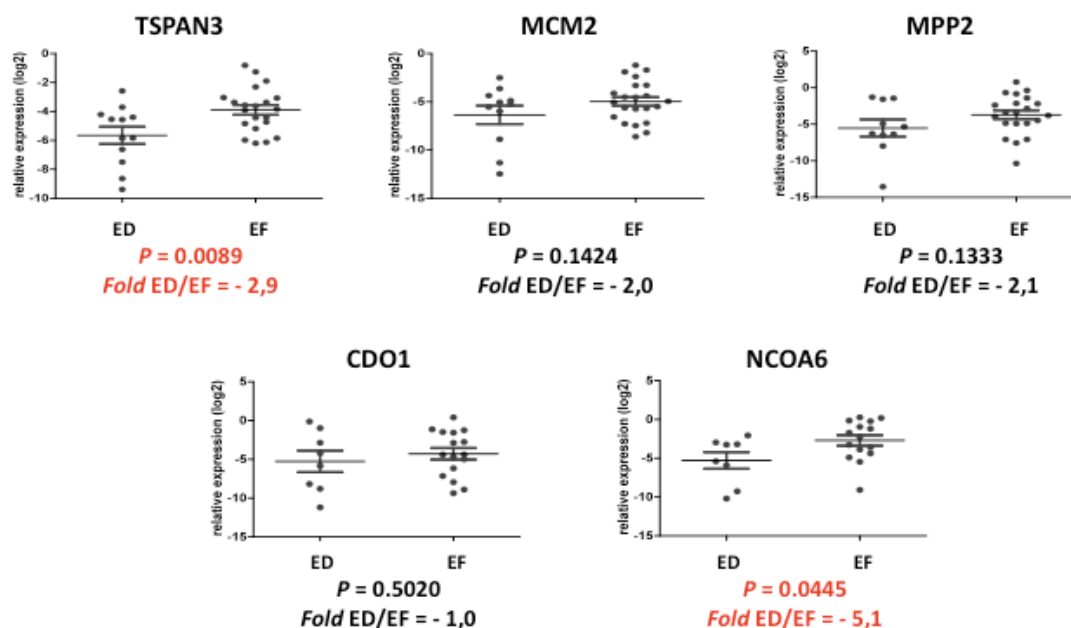
Gene: Símbolo do gene; Nome: nome completo do gene; Gene ID: código do gene no *GenBank*; Localização: localização cromossômica do gene; Função protéica: função resumida da proteína codificada pelo genes em questão.

A expressão destes 5 genes foi então verificada nas 57 amostras de TW do grupo independente, também em relação à média da expressão de *ACTB* e *GAPDH*, com os mesmos *primers* e as mesmas condições de amplificação já descritas (validação biológica). Na análise dos resultados, observamos que parte das amostras testadas apresentou valores de expressão destoantes da maioria das amostras. Ao verificarmos a integridade destas amostras, pudemos observar que elas apresentavam valores baixos de *RIN*, demonstrando uma provável má qualidade do RNA apesar de terem apresentado picos nítidos correspondentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S quando avaliadas. Desta maneira, optamos por utilizar somente as amostras que apresentaram valor de *RIN* > 5 para garantir a qualidade das amostras e a fidelidade dos resultados. Das 57 amostras, somente 35 delas (12 com recaída e 23 sem recaída) apresentaram *RIN* > 5 e foram, portanto, estas as amostras utilizadas para a etapa de validação biológica dos genes selecionados a partir dos experimentos de *microarray*.

Ao avaliarmos a expressão dos cinco genes selecionados nas 35 amostras de TW, o resultado observado foi que todos apresentaram o mesmo perfil de expressão entre os dois grupos de amostras (EF e ED) que o observado na validação experimental, ou seja, mais expressos nas amostras de TW EF (*fold* ED/EF < 1) e dois deles (*TSPAN3* e *NCOA6*) mantiveram-se como diferencialmente expressos entre TW EF e ED de acordo com os critérios de validação estabelecidos ( $p \leq 0,05$ ) sendo então considerados validados (Tabela 13).

**Tabela 13** – Resultado da validação biológica da expressão dos genes validados experimentalmente por RT-PCR em tempo real entre amostras de TW EF e ED em valores de  $p$  e de  $fold$  (ED/EF), incluindo os valores de  $fold$  (ED/EF) encontrados a partir do *microarray* e da etapa de validação experimental. Em negrito estão evidenciados os genes com  $p < 0,05$ .  $Fold$  ED/EF < 1 corresponde às amostras com maior expressão nos TW EF em relação aos TW ED.

Gene	$p$	$Fold$ (ED/EF) <i>microarray</i>	$Fold$ (ED/EF) RT-PCR Validação experimental	$Fold$ (ED/EF) RT-PCR Validação biológica
<i>TSPAN3</i>	<b>0,0089</b>	-1,5	-1,8	<b>-2,89</b>
<i>MPP2</i>	0,1333	-1,5	-2,06	-2,08
<i>MCM2</i>	0,1424	-1,5	-1,6	-2,04
<i>CDO1</i>	0,5020	-1,6	-1,12	-1,03
<i>NCOA6</i>	<b>0,0445</b>	-1,6	-1,69	<b>-5,06</b>



**Figura 9** – Resultado da validação biológica por RT-PCR em tempo real dos genes selecionados a partir da plataforma Universal 4.8K003. Gráficos gerados pelo programa *GraphPad Prism* representando a distribuição dos valores em log<sub>2</sub> da expressão de cada um dos 5 genes alvo em relação à média da expressão de *ACTB* e *GAPDH* para cada uma das 35 amostras testadas. EF: evolução favorável; ED: evolução desfavorável. Em vermelho estão evidenciados os genes com  $p < 0,05$ .  $Fold$  ED/EF < 1 corresponde a uma maior expressão nos TW EF em relação aos TW ED.

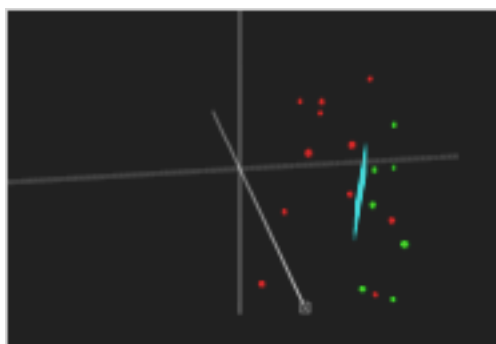
Frente a este resultado, tivemos o interesse em verificar se estes genes, em conjunto, teriam a capacidade de discriminar amostras de TW com e sem recaída tumoral com base em seu perfil de expressão. Para isto, buscamos trios de genes que melhor acertaram o *status* de recaída e não recaída do maior número de amostras possível. Os trios testados incluíram sempre os dois genes validados biologicamente (*TSPAN3* e *NCOA6*) juntamente a um dos demais genes validados experimentalmente (*MCM2*, *MPP2* e *CDOI*) e foi analisado o número de amostras com e sem recaída, dentre as 35 amostras analisadas, para as quais o nível de expressão encontrado dos três genes foi compatível com o perfil de expressão esperado destes genes, ou seja, mais expressos nas amostras sem recaída e menos expressos nas amostras com recaída (Tabela 14).

**Tabela 14** - Resultado da análise dos trios de genes em número e percentagem de acertos para o total de amostras avaliáveis para os três genes simultaneamente, considerando amostras com e sem recaída tumoral.

<b>Trio</b>	<b>Acertos Amostras sem recaída</b>	<b>Acertos Amostras com recaída</b>	<b>Acertos Total de amostras</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>
<i>NCOA6, TSPAN3, MCM2</i>	10/13 (76,9%)	4/7 (57,1%)	14/20 (70%)	4/7 (57.1%)	10/13 (76.9%)
<i>NCOA6, TSPAN3, MPP2</i>	10/12 (83,3%)	6/7 (85,7%)	16/19 (84,2%)	6/8 (75%)	10/11 (90.9%)
<i>NCOA6, TSPAN3, CDOI</i>	9/11 (81,8%)	7/7 (100%)	16/18 (88,9%)	7/9 (77.8%)	9/9 (100%)

Esta análise mostrou que, dos três trios possíveis, o trio formado pelos genes *NCOA6*, *TSPAN3* e *CDOI* foi o que apresentou maior quantidade de acertos do *status* das amostras avaliadas, apresentando-se mais expresso em 9 dentre 11 amostras sem recaída (81,8%) e menos expresso em 7 de 7 (100%) amostras com recaída, tendo acertado o *status* de 16 dentre 18 amostras avaliadas (88,9%),

correspondendo a uma sensibilidade de 77,8% e especificidade de 100%. Neste caso, sensibilidade corresponde à proporção de amostras que apresentaram recaída do total de amostras apontado pelo trio de genes como sendo com recaída, ou seja, com baixa expressão destes genes. Da mesma maneira, especificidade corresponde à proporção de amostras que não tiveram recaída identificadas com alta expressão dos genes do trio e, portanto, preditas como sendo sem recaída. Este trio conseguiu então acertar o *status* de não recaída de todas as amostras que apresentaram expressão aumentada de seus genes, como pode ser visto na Figura 10.



**Figura 10** – Gráfico representando a análise discriminatória do trio *NCOA6*, *TSPAN3* e *CDO1* para as amostras sem recaída (em vermelho) e com recaída tumoral (em verde), sendo que à direita da marcação azul estão as amostras com menor expressão e à esquerda as amostras com maior expressão para os genes que compõem o trio.

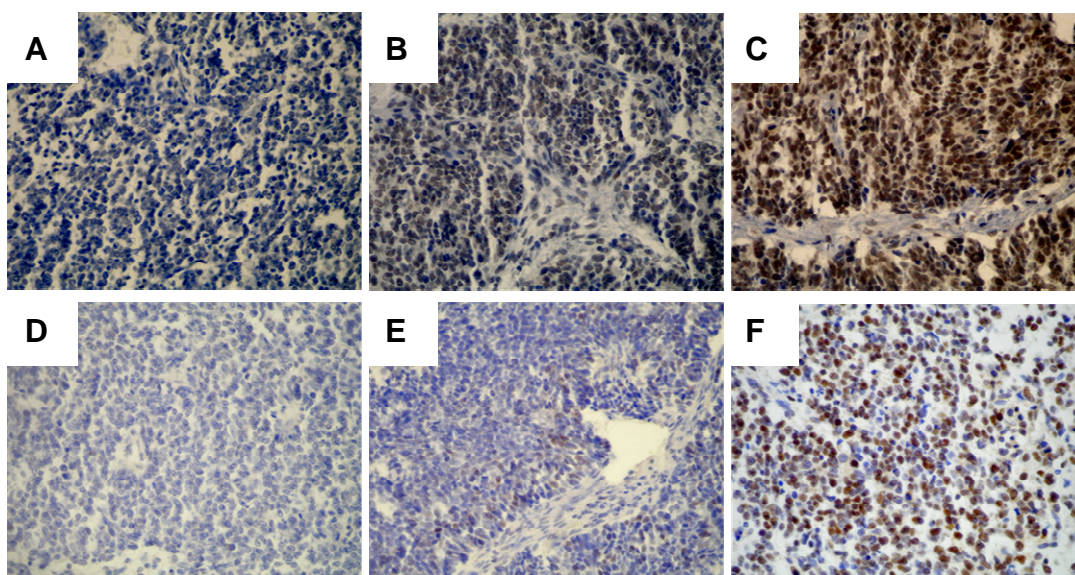
Em paralelo, partimos para a verificação por imunistoquímica da expressão das proteínas codificadas pelos genes validados que possuem anticorpo disponível comercialmente. Dos dois genes validados biologicamente, somente *NCOA6* possui anticorpo disponível comercialmente. Por este motivo, optamos por incluir nesta avaliação também os outros três genes validados experimentalmente. Destes, somente *MCM2* possui anticorpo disponível comercialmente. Demos seguimento,

portanto, à verificação da expressão protéica destes dois genes. Os anticorpos utilizados foram:

- MCM2: Anticorpo primário monoclonal de camundongo *MCM2 antibody* [CRCT2.1 (D1.9H5)] (ab6153) da *Abcam*

- NCOA6: Anticorpo policlonal mono específico de coelho *ANTI-NCOA6* (HPA004198) da *Atlas Antibodies*

Para ambos os anticorpos a marcação foi nuclear (Figura 11).



**Figura 11** – Marcação imunohistoquímica para as proteínas MCM2 e NCOA6. Figuras 3A, B e C: Proteína MCM2. 3A: marcação ausente. 3B: marcação fraca. 3C: marcação forte. Figuras 3D, E e F: Proteína NCOA6. 3D: marcação ausente. 3E: marcação fraca. 3F: marcação forte. Marcação ausente: até 10% de células marcadas; marcação fraca: entre 10 e 50% de células marcadas; marcação forte: mais de 50% de células marcadas.

Das 86 amostras de componente blastematoso de TW representadas no *TMA*, 75 e 77 amostras puderam ser avaliadas para as proteínas MCM2 e NCOA6, respectivamente. Para a proteína MCM2, das 75 amostras avaliadas, 29 (38,7%) não apresentaram marcação, 20 (26,7%) apresentaram uma marcação fraca e 26 (34,7%) apresentaram marcação forte. Para a proteína NCOA6, das 77 amostras avaliadas, 18 (23,4%) não apresentaram marcação, 43 (55,8%) apresentaram marcação fraca e 16 (20,8%) apresentaram marcação forte.

O padrão de expressão destas proteínas entre as amostras do *TMA* foi então correlacionada com a ocorrência ou não de recaída tumoral, além de algumas outras variáveis clínicas como sexo, idade ao diagnóstico, estágio, realização ou não de QT pré-operatória e ocorrência ou não de óbito. Devido à semelhança observada entre os padrões de marcação ausente e fraco para ambas as proteínas (Figura 11), consideramos para a análise destas variáveis os sinais ausentes e fracos como marcação negativa e como marcação positiva os sinais fortes. Desta maneira temos, para MCM2, 49 amostras (65,3%) com marcação negativa e 26 amostras (34,7%) com marcação positiva e, para NCOA6, 61 amostras (79,2%) com marcação negativa e 16 amostras (20,8%) com marcação positiva. A distribuição das amostras em relação às variáveis clínicas analisadas está exposta na Tabela 15.



**Tabela 15** - Distribuição das amostras avaliadas para MCM2 e NCOA6 em relação às variáveis clínicas analisadas, em número de amostras.

		MCM2			NCOA6		
		<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>	<i>Total</i>	<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>	<i>Total</i>
<b>Sexo</b>	M	16	10	26	24	4	28
	F	33	16	49	37	12	49
<b>Idade Média</b>	≤ 3 anos	17	10	27	23	4	27
	> 3 anos	32	16	48	38	12	50
<b>Estádio</b>	I	12	7	19	19	3	22
	II	15	5	20	18	3	21
	III	16	10	26	17	7	24
	IV	5	3	8	6	2	8
	V	1	1	2	1	1	2
<b>QT Pré-operatória</b>	Sim	8	8	16	13	5	18
	Não	40	18	58	47	11	58
	NI	1	0	1	1	0	1
<b>Recaída</b>	Sim	13	5	18	13	5	18
	Não	36	20	56	48	10	58
	NI	0	1	1	0	1	1
<b>Óbito</b>	Sim	12	4	16	12	4	16
	Não	37	21	58	49	11	60
	NI	0	1	1	0	1	1
<b>Total</b>		49	26	75	61	16	77

M: masculino; F: feminino; QT: quimioterapia; NI: Não informado.

De um total de 77 e 75 amostras avaliadas para as proteínas NCOA6 e MCM2, respectivamente, pudemos observar um predomínio importante (13 de 18 amostras = 72,2%) de casos com marcação negativa para ambas as proteínas dentre as amostras de pacientes com recaída, ainda que sem significância estatística. Este achado é compatível com o perfil de expressão dos genes *NCOA6* e *MCM2* entre as amostras EF e ED (Tabela 13) onde ambos estão mais expressos nas amostras EF, sustentando uma possível correlação entre a ação destes genes e uma melhor evolução clínica dos pacientes.

Em relação às demais variáveis clínicas, nenhuma delas pôde ser associada significativamente com a expressão de NCOA6. Já, para a proteína MCM2, pudemos

observar uma associação estatisticamente significativa ( $p = 0,044$ ) entre marcação negativa de MCM2 e a não realização de QT pré-operatória nos pacientes de estádios III e IV (Tabela 16).

**Tabela 16** - Análise estatística da comparação da marcação de MCM2 por imunoistoquímica com a realização ou não de QT pré-operatória em amostras de 33 indivíduos portadores de TW de componente blastematoso de estádios III e IV avaliadas através de TMA. Cálculo realizado pelo teste de Chi-quadrado de *Pearson* com a utilização do *software* SPSS 17.0.2, considerando  $p \leq 0,05$ .

	<b>MCM2 Negativo (n)</b>	<b>MCM2 Positivo (n)</b>	<b>Total (n)</b>
<b>Sem QT pré-operatória</b>	<b>16</b>	<b>6</b>	<b>22</b>
% na variável [QT pré-op.]	72,7%	27,3%	100%
% na variável [MCM2]	80%	46,2%	66,7%
<b>Com QT pré-operatória</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>11</b>
% na variável [QT pré-op.]	36,4%	63,6%	100%
% na variável [MCM2]	20%	53,8%	33,3%
<b>Total (n)</b>	<b>20</b>	<b>13</b>	<b>33</b>
% na variável [QT pré-op.]	60,6%	39,4%	100%
% na variável [MCM2]	100%	100%	100%

QT: quimioterapia; pré-op: pré-operatória

Segundo o resultado encontrado, 72,7% dos TW de componente blastematoso de pacientes com estádios III e IV que não receberam QT pré-operatória apresentam marcação negativa para MCM2, enquanto que 63,6% dos tumores com as mesmas características em pacientes que receberam QT pré-operatória apresentam marcação positiva para MCM2. Esta correlação é reforçada quando observamos que 80% dos tumores com marcação negativa para MCM2 são de pacientes que não receberam QT pré-operatória. Estes dados mostram que a maioria dos pacientes avaliados ao diagnóstico, sem QT pré-operatória, não expressam MCM2, enquanto que a maior

parte daqueles avaliados após terem sido expostos à QT pré-operatória expressam MCM2, apontando para uma possível interferência da QT sobre a expressão de MCM2 em parte dos pacientes.

Na tentativa de encontrar alguma correlação entre este resultado e a evolução clínica destes pacientes verificamos, através de uma análise preliminar, a distribuição dos pacientes em relação expressão de MCM2, realização de QT pré-operatória e ocorrência de recaída considerando os pacientes com estádios III e IV e também, todos os pacientes com estádios I, II, III e IV que puderam ser avaliados para as variáveis em questão (Tabela 17).

**Tabela 17** - Distribuição das amostras de TW de componente blastematoso em relação à marcação imunoistoquímica para MCM2, realização de QT pré-operatória e ocorrência de recaída, em número e percentagem de amostras. As amostras de pacientes com estádios I a IV e somente III e IV estão apresentadas separadamente.

		Estádios III e IV			Estádios I, II, III e IV		
		MCM2			MCM2		
		<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>	<i>Total</i>	<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>	<i>Total</i>
<b>Sem QT Pré-operatória</b>	<b>Sem Recaída</b>	n 11 (%) (73,3%)	4 (26,7%)	15 (100%)	31 (66%)	16 (34%)	47 (100%)
	<b>Com Recaída</b>	n 5 (%) (71,4%)	2 (28,6%)	7 (100%)	9 (81,8%)	2 (18,2%)	11 (100%)
<b>Total de casos avaliáveis</b>		16	6	22	40	18	58
<b>Com QT Pré-operatória</b>	<b>Sem Recaída</b>	n 3 (%) (42,9%)	4 (57,1%)	7 (100%)	5 (55,6%)	4 (44,4%)	9 (100%)
	<b>Com Recaída</b>	n 1 (%) (33,3%)	2 (66,7%)	3 (100%)	3 (50%)	3 (50%)	6 (100%)
<b>Total de casos avaliáveis</b>		4	6	10	8	7	15
<b>Total</b>		20	12	32	48	25	73

Esta análise nos mostra que, para os pacientes que foram avaliados ao diagnóstico (sem QT pré-operatória), independentemente do estágio da doença, a distribuição das amostras com e sem expressão de MCM2 foi a mesma entre os pacientes com e sem recaída, com cerca de 70% das amostras sem expressão de MCM2 e 30% delas com expressão de MCM2, tanto para os pacientes que tiveram como para aqueles que não tiveram recaída da doença e, portanto, a mesma observada na análise anterior (Tabela 16) para os pacientes com estádios III e IV sem QT pré-operatória, sugerindo que este deve ser o padrão de expressão de MCM2 em TW de componente blastematoso em geral.

Em relação aos pacientes que receberam QT pré-operatória, podemos observar novamente uma maior incidência de amostras com expressão positiva para MCM2 em comparação aos pacientes que não receberam QT pré-operatória, como já observado anteriormente (Tabela 16), onde a maior parte das amostras expressam MCM2, no entanto, sem diferenças significativas entre os estádios da doença ou entre pacientes com e sem recaída.

Estes achados sugerem que a maioria dos TW de componente blastematoso não expressa MCM2 ao diagnóstico e que a presença ou não desta expressão não interfere na evolução dos pacientes independentemente do estágio da doença ao diagnóstico. Sugerem também que a QT administrada na fase pré-operatória pode ser capaz de induzir a expressão de MCM2 em parte dos pacientes. No entanto estes achados são preliminares, sem embasamento estatístico, a partir de um número pequeno de amostras, sendo necessária uma análise mais ampla para sua verificação.

### 4.3.2 Plataforma de Vias de Sinalização Celular

Para a hibridização com a Plataforma de Vias de Sinalização Celular, 24 amostras de TW microdissecadas a *laser* (12 com recaída e 12 sem recaída tumoral) além da amostra referência, foram marcadas com Cy3 e Cy5 (*dye-swap*). Todas as amostras apresentaram uma concentração de cDNA marcado  $\geq 0,7$ pmol/ul e, portanto, uma incorporação eficiente dos fluoróforos.

Após os passos de marcação, hibridização e captura de sinal, os dados foram submetidos às denominadas pré-análises para a verificação da qualidade das lâminas. Pelo fato das etapas referentes às pré-análises das lâminas hibridizadas com esta plataforma terem sido as mesmas daquelas realizadas para a Plataforma Universal 4.8K003 e os resultados equivalentes, as imagens já expostas (Figuras 5, 6 e 7) podem servir de exemplo para as pré-análises de ambas as plataformas, considerando a substituição dos fluoróforos. Neste caso, a correlação de *Pearson* entre as lâminas controle e *swap* após a normalização para todas as amostras também foi superior a 80% (Tabela 18).

Das 1.794 sequências de cDNA avaliadas a partir desta plataforma (150 delas pertencentes à via do AR), 173 apresentaram valor de  $p \leq 0,05$  quando comparados seus níveis de expressão entre as amostras EF e ED sendo, portanto, considerados como diferencialmente expressos, com diferenças de expressão (*fold*) entre as duas populações gênicas avaliadas (EF e ED) variando de -2,3 a 1,9. Deste total, foram identificados 11 genes pertencentes à via do ácido retinóico, porém somente 5 deles apresentaram uma diferença de expressão maior ou igual a 1,5 vezes ( $fold\ ED/EF \geq 1,5$  e  $\leq -1,5$ ).

**Tabela 18** - Valores normalizados para as amostras de TW revelando a replicabilidade experimental em relação à incorporação dos fluoróforos (Cy3 e Cy5) entre as lâminas controle e *swap* através de correlação de *Pearson*.

<b>Amostra</b>	<b>Correlação de <i>Pearson</i></b>
BC1 – 1	NR
BC1 – 2	0,844
BC1 – 3	0,895
BC1 – 4	0,889
BC1 – 5	0,934
BC1 – 6	0,956
BC1 – 7	0,912
BC1 – 8	0,841
BC1 – 9	0,887
BC1 – 10	0,938
BC1 – 11	NR
BC1 – 12	0,825
BC1 – 13	0,95
BC1 – 14	0,939
BC1 – 15	0,96
BC1 – 16	0,88
BC1 – 17	0,865
BC1 – 18	0,73
BC1 – 19	0,872
BC1 – 20	NR
BC1 – 21	0,908
BC1 – 22	0,816
BC1 – 23	0,883
BC1 – 24	NR
BC1 – 25	0,907
BC1 – 26	NR
BC1 – 27	0,942
BC1 – 28	0,88
BC1 – 29	0,934
BC1 – 30	NR

NR: não realizado

Uma vez que um dos objetivos deste estudo é avaliar a expressão de genes relacionados ao metabolismo do AR e considerando que a análise, neste caso, envolve células blastematosas microdissecadas a *laser*, ou seja, com uma maior pureza, optamos por incluir todos os 11 genes na validação da expressão gênica diferencial e, por este motivo, passamos a considerar como corte a menor diferença de expressão encontrada, que foi de 1,2 vezes ( $fold \geq 1,2$  e  $\leq -1,2$ ). Desta maneira, os genes selecionados foram: *HOXA4*, *B3GAT1*, *BCDO2*, *SULT1A1*, *SNAP25*, *CAMK4*, *NPY1R*, *MAP1A*, *NGFR*, *MAP1B*, e *S100A11* (Tabela 19).

Foram desenhados *primers* para os 11 genes selecionados para a validação de sua expressão diferencial por RT-PCR em tempo real. Os *primers* utilizados estão listados na Tabela 20.

**Tabela 19** - Lista dos 11 genes diferencialmente expressos pertencentes à via do Ácido Retinóico, selecionados entre as amostras de TW EF e ED, a partir da plataforma de vias de Sinalização Celular, considerando  $p \leq 0,05$  e  $fold\ ED/EF \geq 1,2$  e  $\leq -1,2$ .  $Fold\ ED/EF < 1$  corresponde às amostras com maior expressão nos TW EF em relação aos TW ED.

Gene	Nome	Gene ID	Localização	<i>Fold</i> ED/EF	<i>p</i>	Função Protéica
<i>HOXA4</i>	Homeobox A4	NM_002141	7p15-p14	-1,7	0,020	Regulação da expressão gênica, morfogênese e diferenciação celular.
<i>B3GAT1</i>	Beta-1,3-glucuronyl-transferase 1	NM_018644	11q25	-1,6	0,032	Catalisa a síntese do <i>human natural killer-1</i>
<i>BCDO2</i>	Beta-carotene oxygenase 2	NM_031938	11q22.3-q23.1	-1,5	0,019	Catalisa a clivagem oxidativa do beta-caroteno
<i>SULT1A1</i>	Sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1	NM_001055	16p12.1	-1,4	0,029	Catalisa a conjugação do sulfato em diversos hormônios, neurotransmissores, drogas e compostos xenobióticos
<i>SNAP25</i>	Synaptosomal associated protein, 25kDa	NM_003081	20p12-p11.2	-1,3	0,045	Regulação da liberação de neurotransmissores
<i>CAMK4</i>	Calcium/calmodulin dependent protein kinase IV	NM_001744	5q21.3	1,2	0,033	Regulação transcricional em linfócitos, neurônios e células germinativas masculinas
<i>NPY1R</i>	Neuropeptide Y receptor Y1	NM_000909	4q31.3-q32	1,2	0,003	Receptor de neuropeptídeo Y, envolvido em diversas atividades fisiológicas
<i>MAP1A</i>	Microtubule associated protein 1A	NM_002373	15q13-qter	1,3	0,041	Organização dos microtúbulos
<i>NGFR</i>	Nerve growth factor receptor	NM_002507	17q21-q22	1,3	0,029	Receptor de fator de crescimento neuronal
<i>MAP1B</i>	Microtubule associated protein 1B	NM_005909	5q13	1,8	0,008	Organização dos microtúbulos
<i>S100A11</i>	S100 calcium binding protein A11	NM_005620	1q21	1,9	0,048	Regulação de vários processos celulares como progressão do ciclo celular e diferenciação celular

Gene: Símbolo do gene; Nome: nome completo do gene; Gene ID: número de acesso do gene no *GenBank*; Localização: localização cromossômica do gene; Função protéica: função resumida da proteína codificada pelo genes em questão.



**Tabela 20** – *Primers* dos genes selecionados a partir da plataforma de vias de sinalização celular e tamanho do fragmento amplificado (*amplicom*).

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Amplicom
<i>HOXA4</i>	GCAAGGAGCCCGTGGTG	GAACTCCTTCTCCAGCTCC	137pb
<i>B3GAT1</i>	CAGTGCTGGTGAATGAGG	GGTGATGGTGATTCCCTTAGG	163pb
<i>BCDO2</i>	CCAGGAACCAATGAAGAAG	CCATAAGGCATCTGCACAG	146pb
<i>SULT1A1</i>	GACCTGGAGAAGTGTCAC	CGGTGTGTCTTTTCAGAG	105pb
<i>SNAP25</i>	GACAGGATCATGGAGAAG	CCTACTAGATAATACCATGAG	169pb
<i>CAMK4</i>	CAAGAATTCAATGCCCGGC	GCTTTCATGTCCTCGTTGC	161pb
<i>NPY1R</i>	CTCCTCTTGGTGCTGC	CTGGACCTGTACTTATTGTC	128pb
<i>MAP1A</i>	CTGGATGCCCTGCTGGAG	CCAGGACCAGGACATTCAG	142pb
<i>NGFR</i>	CCTGGACGCTTTGTTGG	CCATGATGTTGAGATCTTGC	137pb
<i>MAP1B</i>	GAAGGAAAGGCTCAGTGG	GCTGTTTCTCATGGGCTC	103pb
<i>S100A11</i>	GAATACAGAACTAGCTGCC	CTTGAGGAAGGAGTCATG	163pb

Gene: símbolo do gene; pb: pares de base

O teste de amplificação de seus fragmentos, tanto por PCR comum quanto por RT-PCR em tempo real, seguido por visualização através de eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e coloração com prata, mostrou amplificação positiva e específica para 9 dos 11 genes avaliados. Os *primers* dos genes *HOXA4* e *B3GAT1* apresentaram amplificação inespecífica em ambos os testes e, por este motivo, não foram utilizados. Ao ser verificada a eficiência de amplificação destes *primers* em diferentes condições de amplificação, o gene *SNAP25* apresentou uma eficiência de amplificação insatisfatória e CTs muito tardios em relação à amostra calibradora, demonstrando ser um gene muito pouco expresso, sendo também retirado da análise. As concentrações adotadas dos *primers* e a eficiência de amplificação obtida para cada um dos 8 genes restantes estão listados na Tabela 21.

**Tabela 21** – Valores da eficiência dos *primers* e a concentração de *primer* escolhida para o cálculo da expressão gênica nas amostras de TW.

Gene	Eficiência dos <i>primers</i>	Concentração dos <i>primers</i>
Genes Normalizadores		
<i>GAPDH</i>	82%	800nM
<i>ACTB</i>	80%	400nM
Genes Alvo		
<i>BCDO2</i>	67%	600nM
<i>SULT1A1</i>	82%	800nM
<i>CAMK4</i>	70%	600nM
<i>NPY1R</i>	81%	800nM
<i>MAPIA</i>	89%	800nM
<i>NGFR</i>	78%	600nM
<i>MAPIB</i>	89%	600nM
<i>S100A11</i>	76%	600nM

Gene: Símbolo do gene.

As curvas de dissociação obtidas no teste de amplificação por RT-PCR em tempo real mostraram-se específicas para todos os genes, porém, ao iniciarmos as reações de amplificação para a análise da expressão dos genes com as amostras de TW, observamos que o gráfico da curva de dissociação para o gene *SULT1A1* apresentou dois padrões distintos correspondentes a duas temperaturas de dissociação diferentes, onde parte das amostras apresentou pico compatível com o observado para a amostra calibradora, parte das amostras apresentaram um pico diferente deste e, um terceiro grupo de amostras apresentou os dois picos simultaneamente, sugerindo a amplificação de dois fragmentos gênicos distintos e não um só como seria esperado. Por este motivo, este gene também foi retirado da análise.

As reações de amplificação dos 7 genes alvo restantes e dos 2 genes normalizadores (*ACTB* e *GAPDH*) testados foram realizadas conforme descrição prévia a partir do cDNA sintetizado a partir do aRNA das 24 amostras de TW (12 EF

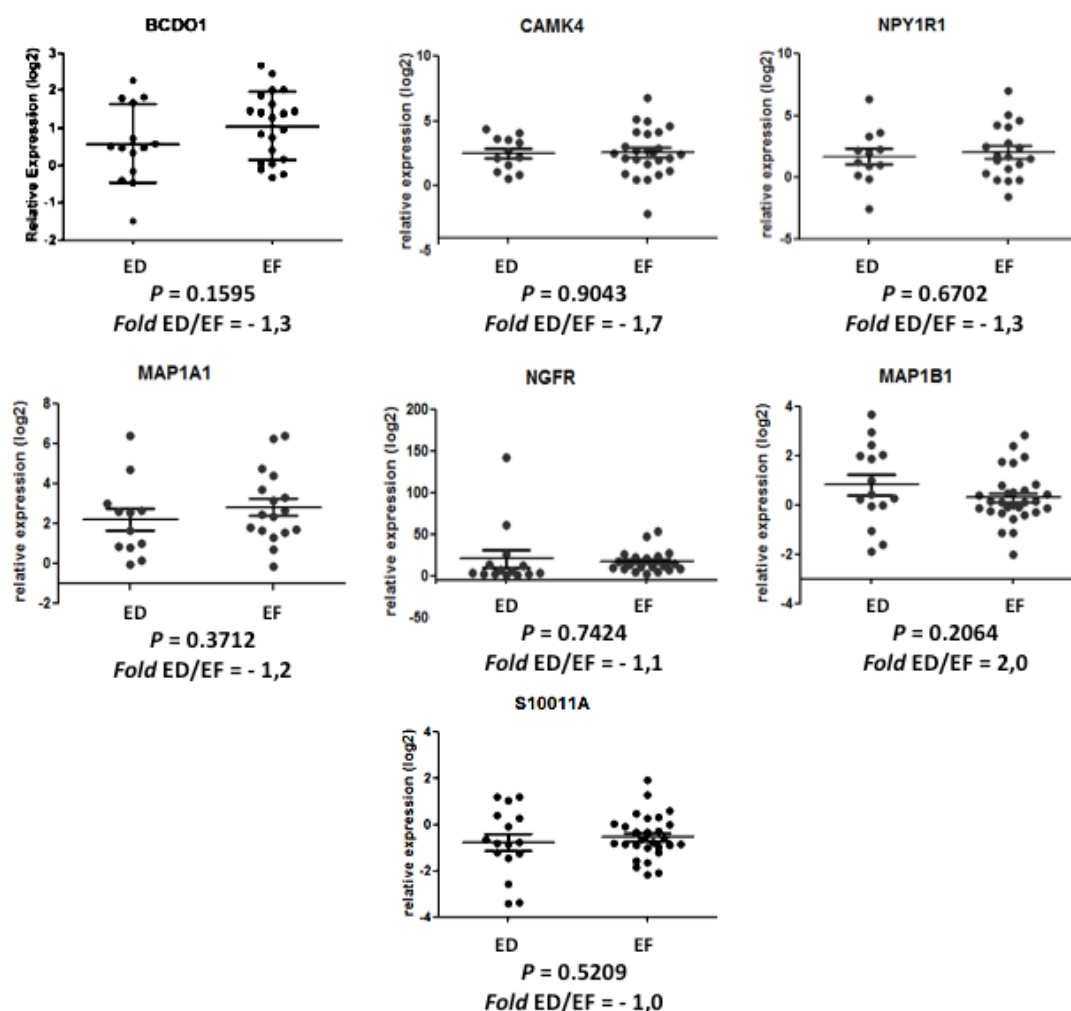
e 12 ED) microdissecadas a *laser* e da amostra referência (*pool* de rins fetais normais), o que caracteriza a etapa de validação experimental. No entanto, os resultados destas reações para todos os genes, tanto para os genes alvo quanto para os normalizadores, foram muito insatisfatórios, com muita disparidade entre as duplicatas além de CTs muito tardios para a maioria das amostras, o que impossibilitou a avaliação da expressão gênica e, conseqüentemente, a utilização desta etapa de validação. Por este motivo, passamos para a validação biológica com todos os 7 genes alvo, que foi então caracterizada pela avaliação da expressão destes genes a partir do cDNA das 35 amostras de TW não microdissecadas a *laser* (23 EF e 12 ED) do grupo independente e da amostra referência.

Apesar de não termos tido o mesmo problema de amplificação das amostras, a análise da expressão gênica dos 7 genes alvo (*BCDO2*, *CAMK4*, *NPY1R*, *MAP1A*, *NGFR*, *MAP1B* e *SI00A11*), determinada pelo método de quantificação relativa (PFAFFL 2001) em relação à média da expressão dos genes *ACTB* e *GAPDH*, não conseguiu confirmar com significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) a expressão diferencial entre TW EF e ED de nenhum dos genes (Figura 12) para o grupo independente de amostras (validação biológica). O perfil de expressão entre TW EF e ED encontrado pela análise de RT-PCR em tempo real se manteve o mesmo observado por *microarray* somente para os genes *BCDO2* e *MAP1B*, mais expressos nas amostras de TW de evolução favorável ( $fold\ ED/EF = -1,3$ ) e desfavorável ( $fold\ ED/EF = 2,0$ ), respectivamente. Para os demais genes o perfil de expressão foi discordante entre as duas técnicas (Tabela 22).

**Tabela 22.** Resultados da etapa de validação por RT-PCR em tempo real em valores de  $p$  e  $fold$  ED/EF resultante das análises de RT-PCR em tempo real e *microarray* dos 7 genes selecionados a partir da plataforma de Vias de Sinalização Celular.  $Fold$  ED/EF < 1 corresponde às amostras com maior expressão nos TW EF em relação aos TW ED.

Gene	$p$	$Fold$ ED/EF <i>microarray</i>	$Fold$ ED/EF RT PCR
<i>BCDO2</i>	0,1595	-1,5	-1,3
<i>CAMK4</i>	0,9043	1,2	-1,7
<i>NPY1R</i>	0,6702	1,2	-1,3
<i>MAP1A</i>	0,3712	1,3	-1,2
<i>NGFR</i>	0,7424	1,3	-1,1
<i>MAP1B</i>	0,2064	1,8	2,0
<i>S100A11</i>	0,5209	1,9	-1,0

Gene: Símbolo do gene.



**Figura 12** – Resultado da validação por RT-PCR em tempo real dos genes selecionados a partir da plataforma de Vias de Sinalização Celular. Gráficos gerados pelo programa *GraphPad Prism* representando a distribuição dos valores em log<sub>2</sub> da expressão de cada um dos 7 genes alvo em relação à média da expressão de *ACTB* e *GAPDH* para cada uma das amostras testadas. EF: evolução favorável; ED: evolução desfavorável.  $Fold$  ED/EF < 1 corresponde a uma maior expressão nos TW EF em relação aos TW ED.

O fato de não termos conseguido confirmar a expressão gênica diferencial de nenhum dos genes selecionados a partir desta plataforma no grupo independente de amostras não justificou a obtenção de anticorpos para a análise imunistoquímica destes genes durante o período de conclusão desta tese.

## 5 DISCUSSÃO

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

Neste sentido, este estudo teve como principal objetivo identificar entre TW de predomínio blastematoso, que na maioria dos casos apresentam grande sensibilidade terapêutica e cursam com bom prognóstico, padrões de expressão gênica que possam auxiliar na identificação de tumores potencialmente maus respondedores ao tratamento. Desta forma, os pacientes com menor risco de recidiva da doença poderiam se beneficiar de uma terapia mais branda, com uma menor morbidade, enquanto que aqueles pacientes com maior risco de recidiva seriam submetidos a esquemas terapêuticos mais agressivos com o objetivo de aumentar sua sobrevida livre de doença. Além disso, tivemos o interesse em verificar a expressão de genes envolvidos no metabolismo do AR nestes tumores pela possibilidade do uso terapêutico desta substância.

Para isto, partimos para a análise da expressão gênica buscando genes diferencialmente expressos entre TW de componente blastematoso com (ED) e sem

(EF) recaída tumoral utilizando duas plataformas customizadas de *microarray* de cDNA, uma contendo diversos genes humanos selecionados a partir do Projeto Genoma do Câncer (Plataforma Universal 4.8K003) e outra contendo genes pertencentes a diferentes vias de sinalização celular (Plataforma de Vias de Sinalização Celular).

A análise de expressão gênica tem se mostrado uma ferramenta extremamente útil na caracterização de diferenças no comportamento tumoral uma vez que fornece informações diretas sobre o perfil de expressão dos genes de determinado tecido tumoral em um determinado momento. Considerando os métodos de análise de expressão gênica disponíveis, a técnica de *microarray* de cDNA é uma técnica já bastante difundida e de fácil interpretação, que permite a análise da expressão de qualquer transcrito conhecido em, teoricamente, qualquer tecido, o que a torna adequada para a realização de estudos de expressão gênica diferencial e para a avaliação da representação de vias metabólicas, como neste caso.

Estudos de expressão gênica em TW referentes especificamente aos TW de componente blastematoso são raros, sendo que há até o momento somente um estudo publicado (MASCHIETTO et al. 2008), também realizado por nosso grupo, que tenha utilizado células blastematosas isoladas de TW. Assim como em nosso estudo, MASCHIETTO et al. (2008) utilizaram células microdissecadas de componente blastematoso e também dos componentes epitelial e estromal de TW, além de células não tumorais de rim fetal e de rim maduro, que foram também hibridizadas com a Plataforma Universal 4.8K003 com o objetivo de buscar associações moleculares entre TW e o processo de nefrogênese. Os genes de cada um dos componentes celulares dos TW identificados como mais expressos em relação aos rins fetais foram

comparados ao perfil de expressão gênica de diferentes estágios do desenvolvimento renal previamente identificados por STUART et al. (2001). Esta análise permitiu identificar que o perfil de expressão dos tumores de componente blastematoso, e não dos TW como um todo, é o que mais se assemelha ao perfil de expressão dos estágios iniciais do desenvolvimento renal normal. Um paralelo entre os perfis de expressão dos TW de componente blastematoso com rins fetais e rins maduros permitiu também identificar um grupo de genes cujo padrão de expressão é sugestivo da ocorrência de uma interrupção precoce no processo de diferenciação do rim possivelmente relacionada aos primeiros eventos moleculares responsáveis pelo processo de tumorigênese dos TW. Entre os genes identificados e validados deste grupo foi observada uma super representação de genes pertencentes à via de sinalização Wnt e genes codificadores de fatores de transcrição, dentre eles o gene *MCM2*, também identificado neste estudo. Estes resultados nos mostram que a análise da expressão gênica de grupos celulares isolados pode trazer informações bastante específicas e de grande valor no estudo de patologias como esta.

Com resultados semelhantes, um estudo anterior realizado por LI et al. (2002) trouxe informações acerca do componente blastematoso do TW a partir de dados de *microarray* de cDNA, porém obtidas por imunistoquímica e em TW sem separação dos componentes. Neste estudo, os autores realizaram uma análise comparativa entre 6 TW esporádicos, não anaplásicos, não relacionados a síndromes e 6 rins fetais humanos e identificaram, com a utilização de uma plataforma de *microarray* contendo cerca de 10.000 genes, 357 genes diferencialmente expressos, sendo 168 mais expressos nos TW e 189 mais expressos nos rins fetais. Os autores também observaram uma correspondência entre os perfis de expressão dos TW e dos estágios



mais iniciais do desenvolvimento renal, assim como uma baixa expressão nos TW de genes expressos nos estágios mais tardios do desenvolvimento metanéfrico. Isto permitiu a seleção de um grupo de 27 genes, enriquecido com genes codificadores de fatores de transcrição relacionados à sobrevivência e proliferação celular além de genes pertencentes à via de sinalização Wnt. A verificação da expressão protéica de alguns desses genes por imunistoquímica em dois dos TW permitiu aos autores sugerir que o blastema nos TW advém de uma falha na diferenciação celular durante fases precoces da transição epitélio-mesênquima.

Para a obtenção das amostras tumorais classificadas como EF e ED utilizadas para a seleção gênica, optamos por utilizar somente amostras de pacientes não submetidos à QT pré-operatória e, por este motivo, estabelecemos a colaboração com o *COG*, uma vez que este grupo dispõe de um grande número de amostras de TW de pacientes não submetidos à QT pré-operatória. Tumores não submetidos à QT pré-operatória não sofrem interferência da QT na expressão de seus genes, nos permitindo assim ter acesso às suas características naturais no momento do diagnóstico, além do fato de que a QT pré-operatória impossibilita o acesso às células tumorais sensíveis à QT uma vez que, no momento cirúrgico, elas estão destruídas.

Todos os tumores envolvidos no estudo eram dependentes de QT adjuvante à ressecção cirúrgica, o que teve o objetivo de garantir que o critério de classificação das amostras em EF e ED fosse unicamente a resposta quimioterápica através da ocorrência ou não de recaída tumoral. Neste sentido, as amostras que não apresentaram recaída foram consideradas como EF por evidenciar uma resposta ao tratamento adjuvante efetuado, enquanto que as amostras que apresentaram recaída

foram consideradas como ED por demonstrarem a ocorrência de falha terapêutica. A escolha pela utilização de amostras provenientes de pacientes somente com estágios avançados da doença (estádios III e IV) para a caracterização de EF teve o intuito de permitir que abordássemos tumores sabidamente dependentes de terapia adjuvante à ressecção cirúrgica, ou seja, com presença de doença extra-renal residual após a cirurgia, e que pudessem ser facilmente avaliáveis quanto à resposta terapêutica, tendo como parâmetro de resposta a ocorrência ou não de recidiva tumoral. Desta maneira evitamos a interferência de tumores naturalmente resistentes à QT, porém limitados ao rim (estádios I e II), que tenham sido submetidos à ressecção cirúrgica completa, ou seja, sem doença residual após a cirurgia, e que poderiam ser falsamente classificados como EF pela ausência de recidiva. Já, para a caracterização ED, foram incluídas também amostras de tumores com estádios I e II, pois neste caso, a presença de recaída é um indício da persistência de células tumorais extra-renais residuais após a ressecção do tumor primário, resistentes ao tratamento, e que não foram detectadas pelos métodos usuais de diagnóstico.

Apesar dos tumores de estágio III e IV terem vias de disseminação distintas sendo que, para os tumores de estágio IV a disseminação é por via hematogênica e, por este motivo, estes tumores poderiam apresentar um perfil de expressão gênica distinto dos tumores de estágio III, optamos por utilizá-los em conjunto pois em ambos a ocorrência de recidiva é devida à falha terapêutica e, nestes casos, não há diferença significativa de prognóstico entre eles.

## 5.1 PLATAFORMA UNIVERSAL 4.8K003

A análise da expressão de 4.608 genes representados na Plataforma 4.8K003 em 26 amostras de TW enriquecidas de componente blastematoso através de microdissecção manual, sendo 13 sem recaída (EF) e 13 com recaída tumoral (ED), permitiu a identificação de um total de 69 genes diferencialmente expressos entre os dois grupos, dos quais 18 genes foram selecionados para validação sendo, 10 genes por apresentarem uma diferença de expressão mínima entre EF e ED de 1,5 vezes ( $fold\ ED/EF \geq 1,5$  e  $\leq -1,5$ ) e outros 8 genes por terem sido igualmente identificados como diferencialmente expressos entre TW com e sem recaída tumoral no estudo conduzido pela Dra. Elizabeth J. Perlman do *Children's Memorial Hospital* (HUANG et al. 2009). A validação experimental de 15 destes 18 genes por RT-PCR em tempo real confirmou a expressão diferencial e o perfil de expressão encontrado pelo *microarray* de 5 genes (*TSPAN3*, *MPP2*, *MCM2*, *CDO1* e *NCOA6*). Apesar de pequena, a quantidade de genes validados experimentalmente foi considerada satisfatória se considerarmos que a diferença de expressão (*fold*) encontrada pelo *microarray* dos genes selecionados para validação entre os grupos avaliados (EF e ED) era muito pequena, de no máximo 1,7 vezes ( $fold\ ED/EF$  do gene *RGS16*). Isto é compreensível pelo fato de termos utilizado amostras muito semelhantes do ponto de vista biológico, ou seja, todas as amostras envolvidas neste estudo são de uma única neoplasia (TW), de um mesmo sub-tipo histológico (componente blastematoso) e, portanto, com características morfológicas e comportamentos semelhantes, provenientes de indivíduos de uma mesma faixa etária (população infantil), todos com uma extensão da doença equivalente (estádios III e IV), não submetidos a

nenhum tratamento até o momento da obtenção da amostra, onde a única diferença entre eles é o fato de terem ou não apresentado recaída tumoral após a instituição do tratamento. Esta uniformidade das amostras analisadas implica muito provavelmente em uma uniformidade também no perfil de expressão gênica destas amostras, com variações mínimas e de difícil detecção pelos métodos de análise utilizados, o que pode ser observado pelo pequeno número de genes com  $p$  valor  $\leq 0,01$  e, principalmente, pelo valor máximo encontrado de  $fold$  ED/EF = 2,0 (gene *HOXA11*) considerando todos os 69 genes diferencialmente expressos, o que demonstra uma diferença muito pequena na expressão gênica entre os grupos de amostras. Provavelmente foi por este mesmo motivo que nenhum dos genes também identificados pelo estudo conduzido pela Dra. Elizabeth J. Perlman (*TMEM63A*, *KIAA0368*, *HBEGF*, *ANKMY2*, *UBAP1* e *KIAA0913*) foram validados nesta etapa, se considerarmos que foram os genes com os menores valores de  $fold$  ED/EF dentre os genes selecionados.

Apesar de não termos conseguido validar nenhum dos genes em comum com o estudo conduzido pela Dra. Elizabeth J. Perlman, esta colaboração foi de grande utilidade pois pudemos observar que, além destes, vários outros genes identificados individualmente como diferencialmente expressos foram comuns a ambos os estudos e com o mesmo perfil de expressão entre amostras com e sem recaída, incluindo alguns dos genes validados experimentalmente em nosso estudo (dados não apresentados). Considerando que no estudo conduzido pela Dra. Elizabeth J. Perlman foram utilizadas amostras de TW sem a individualização dos componentes histológicos e no nosso somente amostras de componente blastematoso de TW, a identificação de genes em comum aumenta a confiabilidade dos resultados e reforça a

possibilidade de que estes genes estejam realmente relacionados aos TW, sobretudo ao componente blastematoso, merecendo uma análise mais profunda com outros parâmetros de avaliação.

A outra colaboração estabelecida durante a realização deste estudo, com o grupo *COG*, também foi de grande importância pois permitiu a aquisição de um grande número de amostras de TW, bastante homogêneas entre si, o que possibilitou a formação de dois grupos independentes de amostras com as mesmas características clínicas e morfológicas (grupo inicial e grupo independente), diferenciados somente pelo número de amostras sendo, um menor, utilizado para a seleção de genes diferencialmente expressos e outro maior, utilizado para a validação da expressão diferencial dos genes selecionados. Com isso aumentamos o poder de análise e, novamente, a confiabilidade dos resultados, pois a concordância de resultados entre os dois grupos garante que a expressão dos genes avaliados esteja de fato relacionada às características biológicas daquele grupo e não às características de cada indivíduo.

A verificação da expressão diferencial dos 5 genes validados experimentalmente em um total de 35 amostras do grupo independente (12 com recaída e 23 sem recaída) confirmou dois deles (*TSPAN3* e *NCOA6*) como diferencialmente expressos entre TW EF e ED, ambos mais expressos nas amostras EF. Os outros 3 genes, apesar de não atingirem valor de  $p$  estabelecido como parâmetro de validação, mantiveram o mesmo perfil de expressão entre as amostras EF e ED, ou seja, também mais expressos nas amostras EF, observada nas etapas anteriores. Nesta etapa de validação biológica, pudemos observar que o valor de *fold* ED/EF para 4 dos 5 genes testados aumentou, sobretudo para os dois genes validados, o que reforça a expressão diferencial destes genes.

Se olharmos para as funções dos genes validados experimentalmente, sobretudo daqueles que apresentaram resultados mais robustos como *TSPAN3* e *NCOA6*, validados biologicamente, e também *MCM2*, podemos observar uma relação com a proliferação celular que pode ser compatível com uma expressão preferencial em tumores como os TW de componente blastematoso com características de sensibilidade quimioterápica, ainda que sem nenhuma evidência direta. O gene *NCOA6* codifica uma proteína com função co-ativadora transcricional que interage com diversos receptores celulares, como os receptores retinóides, potencializando suas funções ativadoras de transcrição. Parece ter uma ação promotora da proliferação celular por sua interação com fatores de transcrição relacionados à expressão de genes envolvidos com a progressão do ciclo celular (KONG et al. 2003). É encontrado amplificado em diferentes neoplasias, sobretudo em tumores de mama, assim como em várias linhagens de células tumorais (MAHAJAN e SAMUELS 2005; YANG et al. 2005), estando aparentemente envolvido com o desenvolvimento e crescimento tumoral (LEE et al. 1999, 2000; KONG et al. 2003). O gene *TSPAN3* codifica uma proteína de superfície celular mediadora de eventos de transdução de sinal envolvidos na regulação do crescimento, proliferação, diferenciação, adesão e migração celular (TODD et al. 1998). Não há relações descritas entre a expressão deste gene em TW ou tumores renais, havendo somente poucas referências ao ganho de material de 15q em TW, no entanto, sem correlações significativas (SCHLUTH et al. 2005; NATRAJAN et al. 2007). A proteína codificada pelo gene *MCM2* atua na regulação do ciclo celular, sendo responsável pela inicialização e pelo controle do processo de replicação do DNA durante a proliferação celular. Sua expressão tem sido identificada em diversos tipos de câncer,

sendo considerada um marcador molecular de proliferação celular com importância prognóstica, associada a uma pior sobrevida dos pacientes (MENG et al. 2001; RAMNATH et al. 2001; DUDDERIDGE et al. 2005; OBERMANN et al. 2005; GAKIOPOULOU et al. 2007; MATSUBARA et al. 2008; GIAGINIS et al. 2009).

A expressão aumentada de genes envolvidos na proliferação celular nos tumores sem recaída aponta para um alto índice proliferativo nestes tumores. Em algumas neoplasias, sobretudo nos tumores embrionários, maioria entre os tumores pediátricos, os tumores com alto índice proliferativo costumam apresentar uma maior sensibilidade aos agentes terapêuticos como quimioterapia e radioterapia, estando frequentemente associados a uma melhor resposta terapêutica, menores índices de recidiva tumoral e bom prognóstico. Nestes casos, isto está relacionado ao menor grau de diferenciação celular destes tumores. Em geral, células mais indiferenciadas, cujo padrão histológico tende ao fenótipo embrionário, têm um alto poder proliferativo e são mais sensíveis às drogas quimioterápicas, enquanto que células mais maduras e diferenciadas, com um fenótipo tendendo ao epitelial, apresentam um poder proliferativo menor e uma maior resistência à QT, o que faz com que o processo de diferenciação celular seja um importante fator de predição da resposta quimioterápica nos tumores embrionários. No caso dos TW, por exemplo, o componente blastematoso, mais indiferenciado dos componentes celulares, é o que apresenta o maior índice proliferativo, maior agressividade, poder de invasão e metástase, mas é também, na maior parte dos casos, o mais sensível aos agentes terapêuticos e, conseqüentemente, o de melhor prognóstico dentre os demais. As proteínas NCOA6 e MCM2, por exemplo, já foram relacionadas à diferenciação celular. HONG et al. (2001) demonstraram que NCOA6 induz a diferenciação de

granulócitos a partir de células promielocíticas através da transativação de genes codificadores de fatores de transcrição relacionados a este processo e, tanto sua expressão quanto a expressão do gene *NCOA6*, são responsivas ao efeito indutor da diferenciação celular do AR. A expressão de *MCM2*, por sua vez, já foi correlacionada ao grau de diferenciação celular de tumores renais (RODINS et al. 2002) e de mama (REENA et al. 2008) de diferentes tipos histológicos em comparação aos respectivos tecidos não tumorais sendo que, em ambos os casos, esta proteína se mostrou mais expressa nos tecidos tumorais em relação ao respectivo tecido não tumoral e, entre os tumores, naqueles derivados de células com menor grau de diferenciação. Esta mesma relação entre expressão do gene *MCM2* e o grau de diferenciação celular já foi observada nos TW no estudo realizado por MASCHIETTO et al. (2008) no qual *MCM2* foi identificado e comprovado como mais expresso nos TW de componente blastematoso em relação aos demais componentes celulares, mais expresso quando comparado ao rim não neoplásico tanto fetal quanto maduro e mais expresso no rim fetal em relação ao rim maduro. Esta diminuição progressiva na expressão de *MCM2* dos TW de componente blastematoso em direção ao rim maduro não neoplásico demonstra a existência de uma relação inversa entre a expressão deste gene e o grau de diferenciação das células renais.

Neste sentido, o perfil de expressão dos genes identificados e validados em nosso estudo entre as amostras de tumores com e sem recaída está de acordo com a relação existente entre o grau de diferenciação das células dos tumores embrionários e sua resposta quimioterápica pela qual, os tumores de evolução favorável com expressão aumentada destes genes devem ser mais indiferenciados enquanto que aqueles que apresentaram recaída e que pouco expressam estes genes talvez possuam



uma maior tendência à diferenciação, o que deve contribuir para torná-los menos responsivos à QT.

A análise do perfil de expressão dos 5 genes validados experimentalmente agrupados em trios, incluindo os dois genes validados biologicamente, em relação ao *status* de recaída ou não recaída das 35 amostras do grupo independente, foi realizada na tentativa de encontrarmos um grupo de genes com poder de prever recaída através de sua baixa expressão ou não recaída através de sua alta expressão em amostras de TW de componente blastematoso. Esta análise mostrou que 81,8% das amostras EF apresentam alta expressão dos genes *NCOA6*, *TSPAN3* e *CDO1* concomitantemente e 100% das amostras ED apresentam baixa expressão destes genes, ou seja, o perfil de expressão esperado dos genes que compõem este trio está compatível com o *status* de 88,9% do total de amostras avaliadas. Isto significa que este trio de genes conseguiu prever recaída com uma sensibilidade de 77,8%, uma vez que se mostrou pouco expresso em um total de 9 amostras das quais 7 amostras são ED e, conseguiu prever ausência de recaída com uma especificidade de 100%, pois todas as amostras que apresentaram alta expressão de seus genes são EF.

A identificação de grupos de genes diferencialmente expressos com poder preditivo de diagnóstico ou prognóstico para diversos tipos de patologias, sobretudo neoplasias, tem ganhado importância à medida que cada vez mais dados de expressão gênica vão sendo gerados, pois eles potencializam o poder discriminatório de uma determinada condição ou característica da amostra analisada e minimizam a interferência de variações biológicas individuais e artefatos de técnica quando comparados à utilização de um único gene.

Alguns estudos de expressão gênica em TW já identificaram grupos de genes com poder prognóstico, todos relacionados à recidiva tumoral. Em um deles, WILLIAMS et al. (2004) identificaram, através da análise do perfil de mais de 30.000 genes por *microarray* de cDNA em 27 amostras de TW pré-tratamento que possuíam informações quanto à recidiva tumoral futura, 138 genes diferencialmente expressos entre os tumores que apresentaram e que não apresentaram recidiva dos quais 3 genes (*PAPSS2*, *TIMM22* e *B7H3*) conseguiram, juntos, separar estes dois grupos de tumores. Em outro estudo, LI W et al. (2005) analisaram, também através de *microarray* de cDNA, o perfil de expressão de 4.900 genes relacionados ao câncer em 26 TW primários que possuíam informações quanto à recidiva tumoral futura. O autores puderam identificar um grupo de quatro genes (*C/EBPB*, *cDNA CF542255*, *p21* e *H4FG*) que, juntos, são capazes de prever recidivas futuras em TW primários ao diagnóstico com uma eficácia de 92%, independente da presença de anaplasia. No estudo conduzido pela Dra. Elizabeth J. Perlman (HUANG et al. 2009), 144 amostras de TW não anaplásicos provenientes de pacientes não submetidos à QT pré-operatória e que apresentavam estágio avançado da doença (Estádio III), foram analisadas por *microarray* de cDNA. Desta análise foi selecionado um grupo de 50 genes que teve o poder de prever recaída em 25 de 53 amostras (sensibilidade de 47%) e não recaída em 64 de 91 amostras sem recaída (especificidade de 70%).

Apesar de necessitar de testes estatísticos mais robustos em um maior e mais diversificado número de amostras de TW para uma possível aplicabilidade clínica, o uso da expressão conjunta dos genes *NCOA6*, *TSPAN3* e *CDO1* como marcador de evolução clínica em TW de componente blastematoso nos parece bastante promissor, sobretudo para auxiliar na identificação de tumores com menor potencial de recaída.

Por fim, verificamos a expressão das proteínas codificadas pelos genes *NCOA6* e *MCM2*, por imunohistoquímica em 86 amostras de componente blastematoso de TW, por se tratarem dos únicos dentre os 5 genes validados experimentalmente que possuíam anticorpo disponível comercialmente. A marcação imunohistoquímica com os anticorpos utilizados nos permitiu avaliar 89,5% (n=77) e 87,2% (n=75) das amostras para as proteínas *NCOA6* e *MCM2*, respectivamente, o que consideramos um número bastante satisfatório. O fato de termos considerado marcação fraca e ausente em uma mesma categoria (marcação negativa) não interferiu nos resultados, uma vez que as variáveis foram avaliadas em relação às três categorias separadamente (marcação ausente, fraca e forte) e também considerando a união das marcações fraca e forte como marcação positiva, porém com resultados menos significativos do que da maneira realizada, além de que a equivalência no padrão imunohistoquímico de positividade entre as amostras com marcação fraca e forte foi menor do que observado entre as amostras de marcação ausente e fracamente positiva.

O perfil de expressão de *NCOA6* em 77 amostras de TW não pôde ser correlacionado significativamente com nenhuma das variáveis clínicas avaliadas. Mesmo assim, pudemos observar uma alta frequência de amostras com marcação negativa entre os pacientes que apresentaram recaída, com 72,2% dos tumores destes pacientes não expressando *NCOA6*, resultado este encontrado também para a proteína *MCM2* (Tabela 15). Apesar de não ter apresentado significância estatística, este achado deve ser valorizado uma vez que condiz com os resultados da análise da expressão dos genes *NCOA6* e *MCM2*, onde ambos estão mais expressos nas

amostras de EF, ou seja, sem recaída, sustentando uma possível correlação entre a ação destes genes e uma melhor evolução clínica dos pacientes.

Quanto à correlação observada entre marcação negativa de MCM2 e a não realização de QT pré-operatória nos pacientes de estádios III e IV (Tabela 16), devemos considerar as características funcionais desta proteína. Se considerarmos a função indutora da proliferação celular de MCM2, sua relação com a diferenciação celular e sua maior expressão nos TW sem recaída, como já discutido, seria esperado que encontrássemos uma expressão aumentada de MCM2 nos tumores sem QT pré-operatória e uma ausência ou diminuição de sua expressão naqueles que receberam QT pré-operatória, o que é contrário ao resultado encontrado. Isto porque os TW de componente blastematoso, diferentemente dos tumores não embrionários como, por exemplo, a maioria dos tumores que acomete indivíduos adultos, são originalmente mais indiferenciados, com um maior índice proliferativo e geralmente sensíveis à QT e, por não terem sido ainda expostos à QT, o perfil de expressão encontrado neste momento estaria retratando estas características. A administração da QT no momento pré-operatório, por sua vez, inibiria a proliferação das células tumorais levando, conseqüentemente, a uma perda da expressão de MCM2.

No entanto, se considerarmos a função de reparo do DNA exercida por MCM2, o resultado encontrado poderia fazer sentido. MCM2 é uma proteína nuclear que integra o complexo pré-replicativo celular e é responsável pela iniciação do processo de replicação do DNA. Ela liga-se ao sítio de replicação do DNA, recruta outras proteínas relacionadas à replicação e libera a iniciação do processo de replicação garantindo que este processo ocorra, nas células eucarióticas, somente uma única vez por ciclo celular sendo, desta maneira, fundamental para o processo de

replicação e proliferação celular. Sua expressão é variável no decorrer do ciclo celular, apresentando um pico de expressão na fase G1/S (MINCHEVA et al. 1994; TYE 1999; KONG et al. 2003) onde atua no ponto de checagem (*check-point*) de danos no DNA presente nesta fase (BAILIS e FORSBURG 2004), interrompendo o ciclo celular, se necessário. Desta maneira, sua atuação no ciclo celular faz com que MCM2 exerça, além de um controle sobre a manutenção da ploidia do DNA, uma função de reparo do DNA por permitir que os danos introduzidos na molécula de DNA durante a fase S replicativa devido à ação de agentes genotóxicos e ao *stress* replicativo sejam corretamente identificados e reparados pelo sistema de reparo ou, caso isso não seja possível, que a célula danificada seja direcionada à cascata da apoptose, mantendo assim a integridade do genoma da célula. Se olharmos somente para as amostras de pacientes que não receberam QT pré-operatória, uma vez que correspondem ao *status* original do tumor ao diagnóstico, sem influência da QT, podemos observar que a maior parte delas não apresenta expressão de MCM2 ao diagnóstico (40 de 58 amostras avaliáveis = 69%, Tabela 15), percentagem esta que praticamente se mantém quando consideramos somente as amostras sem QT pré-operatória de pacientes com estágio III e IV (16 de 22 amostras = 72,7%, Tabela 16) e, da mesma maneira, para os pacientes com estágio I e II (24 de 36 amostras = 66,7%, dados não apresentados), sugerindo que este possa ser o padrão original de expressão de MCM2 nas amostras avaliadas, onde somente cerca de 30% das amostras de pacientes com TW de componente blastematoso não expostas à QT apresentam marcação positiva para MCM2 no momento do diagnóstico. Porém, quando olhamos para as amostras de pacientes que receberam QT pré-operatória, observamos um aumento importante na positividade de MCM2 para 63,6% das

amostras de pacientes com estádios III e IV (Tabela 16) e para 50% considerando os estádios I a IV (dados não expostos), sugerindo uma provável influência da QT sobre a expressão de MCM2. Uma possível interpretação para isto seria que a QT realizada no momento pré-operatório teria causado danos ao DNA das células tumorais e, desta maneira, induzido a expressão de MCM2 na tentativa de reparar esses danos, justificando a maior expressão de MCM2 nos tumores que receberam QT pré-operatória em relação aos que não receberam, sobretudo se considerarmos o efeito citotóxico da dactinomicina, uma das drogas quimioterápicas utilizadas nesta etapa. A dactinomicina pertence à classe dos antibióticos antitumorais por ser um produto de metabolismo microbiano (*Actinomyces sp.*) e sua ação citotóxica é determinada por sua estrutura molecular, que tem o poder de intercalar-se entre bases na molécula de DNA causando quebras nestas moléculas, bloqueando assim a replicação do DNA das células tumorais e a transcrição do RNA (ROWINSKY e DONEHOWER 1996; RIGGS 2002). Logo, o uso da dactinomicina no tratamento pré-operatório poderia justificar um ganho de expressão de MCM2 em tumores que originalmente não expressam esta proteína como resposta aos danos causados ao DNA tumoral. Esta resposta, contudo, estaria provavelmente indicando uma atuação efetiva do sistema de reparo do DNA, o que pode conferir às células tumorais um efeito protetor contra os danos causados pela QT e, conseqüentemente, uma maior resistência quimioterápica e maior risco de recidiva tumoral. Sabe-se que o principal mecanismo de resistência da dactinomicina é justamente determinado por um eficiente sistema de reparo do DNA e, condições que levem à uma hiperatividade de proteínas envolvidas com o reparo do DNA podem ser responsáveis por uma menor

eficácia do tratamento com a esta droga (ROWINSKY e DONEHOWER 1996; RIGGS 2002).

Neste sentido, resolvemos verificar, dentre as amostras com e sem QT pré-operatória, quais apresentaram ou não recaída tumoral na tentativa de compreender o possível significado desta diferença de expressão de MCM2 entre os grupos de amostras e sua relação com a resposta quimioterápica. Através de uma análise preliminar pudemos observar que, para os pacientes com estádios III e IV que foram avaliados ao diagnóstico (sem QT pré-operatória), não houve diferença na distribuição das amostras com e sem expressão de MCM2 entre os pacientes com e sem recaída, com uma frequência de cerca de 70% das amostras sem expressão de MCM2 e 30% delas com expressão de MCM2, tanto para os pacientes que tiveram como para aqueles que não tiveram recaída da doença e, portanto, a mesma distribuição já observada anteriormente sem os dados de recaída. A inclusão dos pacientes com estádios I e II também não interferiu significativamente nesta distribuição o que sustenta a impressão de que este deve ser o padrão de expressão de MCM2 em TW de componente blastematoso em geral e que esta proporcionalidade deverá se manter apesar do número de amostras avaliadas, como de fato aconteceu com a inclusão dos pacientes com estágio I e II nesta análise.

Em relação aos pacientes que receberam QT pré-operatória, a observação da maior incidência de amostras com expressão positiva para MCM2 em comparação aos pacientes que não receberam QT pré-operatória por si só já demonstra uma provável influência da QT na expressão de MCM2 uma vez que não há nenhuma diferença biológica conhecida entre os tumores de pacientes expostos ou não à QT pré-operatória. No entanto, o fato de não encontrarmos diferenças significativas entre

os pacientes com recaída em relação àqueles sem recaída, seja entre os pacientes com estádios III e IV (66,7% e 57,1% para pacientes com e sem recaída, respectivamente) ou quando considerados os pacientes com estádios I a IV (50% e 44,4% para pacientes com e sem recaída, respectivamente) (Tabela 17) sugere que, apesar da possível interferência da QT sobre a expressão de MCM2, isto parece não afetar a evolução clínica dos pacientes com TW de componente blastematoso, independente da extensão da doença ao diagnóstico.

Apesar do pequeno número de casos avaliáveis e, conseqüentemente, do pouco embasamento estatístico destas análises, elas apontam para resultados bastante coerentes. Estes achados, no entanto, são especulativos, na tentativa de compreender os dados encontrados neste estudo sendo de grande interesse a realização de análises mais robustas, se possível com um maior número de amostras para sua verificação.

## **5.2 PLATAFORMA DE VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR**

A análise da expressão de 1.794 genes representados na Plataforma de Vias de Sinalização Celular em 24 amostras de TW de componente blastematoso microdissecadas a *laser*, sendo 12 sem recaída (EF) e 12 com recaída tumoral (ED), permitiu a identificação de um total de 173 genes diferencialmente expressos entre os dois grupos, 11 deles pertencentes à via do AR. A diferença de expressão entre as amostras EF e ED encontrada para estes genes variou de 1,2 a 1,9 vezes e todos foram selecionados para validação. A verificação da expressão diferencial de 7 destes genes por RT-PCR em tempo real nas 24 amostras do grupo inicial (validação experimental) não foi bem sucedida possivelmente pelo fato dos experimentos de RT-



PCR em tempo real terem sido realizados com cDNA sintetizado a partir de RNA amplificado de amostras microdissecadas a *laser* provenientes de tumores biologicamente bastante semelhantes entre si. Isto pode ter dificultado a detecção das variações na expressão de genes já sabidamente com pouca diferença de expressão entre as amostras EF e ED, ainda que mantidas as quantidades de RNA e cDNA utilizados para os procedimentos de síntese de cDNA e amplificação por RT-PCR em tempo real, respectivamente, para ambas as plataformas. A verificação da expressão diferencial destes genes por RT-PCR em tempo real nas 35 amostras não microdissecadas a *laser* do grupo independente (validação biológica) confirmou o perfil de expressão encontrado pelo *microarray* de 2 destes genes (*BCDO2* e *MAP1B*) sendo, *BCDO2* mais expresso nas amostras de TW EF e *MAP1B* mais expresso nas amostras de TW ED, porém sem valor de *p* compatível com os critérios de validação estabelecidos para esta plataforma ( $p \leq 0,05$ ).

Ao considerarmos os fatores responsáveis por este resultado, chegamos novamente à pequena diferença de expressão entre os grupos EF e ED dos genes selecionados, encontrada pelo *microarray*, de no máximo 1,9 vezes (*fold* ED/EF do gene *S100A11*). Neste caso especificamente, o fato da hibridização ter sido realizada com amostras microdissecadas a *laser* fez com que os genes tenham sido selecionados a partir de células isoladas de blastema de tumores muito semelhantes morfológicamente, sem a interferência do conteúdo genético de nenhum outro tipo celular, o que torna a semelhança biológica entre as amostras utilizadas ainda maior. Isto fica evidente com os valores encontrados de *p* e de *fold*, o que fez com que tivéssemos que considerar valores menores ( $p \leq 0,05$  e *fold* ED/EF  $\geq 1,2$  e  $\leq -1,2$ ) para que pudéssemos levar um maior número de genes para a fase de validação. No

entanto, esta mudança fez com que os genes selecionados apresentassem uma diferença de expressão entre os grupos de amostras ainda menor, prejudicando a reprodutibilidade dos resultados na fase de validação. O fato, por exemplo, de termos considerado genes com valores de *fold* menores do que 1,5 vezes aumentou o número de genes selecionados, porém não interferiu no resultado da validação pois, de um total de 11 genes selecionados, somente 3 apresentaram  $fold > 1,5$  estando entre eles os únicos genes cujo perfil de expressão foi mantido entre as duas técnicas (*BCDO2* e *MAP1B*) e que também apresentaram os menores valores de  $p$ , sendo estes os genes que ficaram mais próximos de terem sido validados. Estes dados sustentam a importância, não só da etapa de validação, como do uso da diferença de expressão (*fold*) e não apenas o valor de  $p$  nas análises de expressão gênica diferencial pois, quanto maior é esta diferença, maior é a chance de que os genes avaliados sejam realmente diferencialmente expressos entre as populações analisadas.

Um outro fator que deve ser considerado é a diferença na origem das amostras de RNA utilizadas nas etapas de seleção e validação gênica. No caso desta plataforma, a seleção dos genes diferencialmente expressos foi feita a partir de RNA amplificado de amostras microdissecadas *a laser*, enquanto que na validação foi utilizado RNA não amplificado de amostras microdissecadas manualmente. Isto pode representar um "viés" em nossas análises em relação à variabilidade do material genético entre as duas populações celulares em comparação. Diferentemente da Plataforma Universal 4.8K003, onde tanto a seleção gênica quanto a validação foram realizadas com RNA de amostras microdissecadas manualmente, aqui o material genético das amostras microdissecadas *a laser* é proveniente de um pequeno número de células isoladas de blastema cujas características individuais foram exacerbadas

pelo processo de amplificação, apresentando assim uma variabilidade genética muito menor quando comparada à diversidade genética proveniente de um grupo celular bem mais numeroso obtido a partir de amostras de tecido tumoral somente enriquecidas de componente blastematoso. Isto pode também ter contribuído pelo insucesso da validação experimental dos genes selecionados a partir desta plataforma.

Ainda em relação ao uso de células microdissecadas *a laser* neste estudo, uma vez que o objetivo principal foi identificar genes diferencialmente expressos entre amostras de um único sub-tipo histológico (componente blastematoso) de um mesmo tipo tumoral (TW), cuja única característica que as diferencia é o fato de terem ou não apresentado recidiva da doença após a instituição do tratamento, surge o questionamento se esta diferença está, de fato, no âmbito genético. Devemos considerar que o fato dos pacientes terem ou não apresentado recaída tumoral pode ter sido determinada ou influenciada por uma série de fatores como fatores moleculares não genéticos, fatores relacionados ao tratamento, fatores imunológicos, dentre outros, incluindo até uma possível interferência de outros tipos celulares intra-tumorais adjacentes às células blastematosas como, por exemplo, células parenquimatosas e dos componentes celulares estromal e epitelial, não tendo necessariamente sido determinada por fatores genéticos da célula blastematoso. Isto talvez deva ser considerado quando se pretende usar células tumorais isoladas, como neste caso, em estudos relacionados ao comportamento tumoral, como presença ou não de recaída tumoral e metástase e diferenças na resposta terapêutica, lembrando que os tumores fazem parte de um organismo como um todo, sendo originados e mantidos por este organismo e, desta maneira, inteiramente expostos às suas influências. Portanto, em estudos como este, talvez não seja possível diferenciar TW

de melhor ou pior evolução clínica partindo somente das alterações genéticas da célula blastematosa. Por outro lado, quando se pretende analisar alterações intracelulares como características genéticas e morfológicas de um tipo ou grupo celular específico, como no estudo realizado por MASCHIETTO et al. (2008) cujo objetivo foi comparar o perfil de expressão gênica dos diferentes componentes celulares dos TW com o de rins fetais e maduros não tumorais e identificar relações entre o desenvolvimento renal e tumoral, a utilização de células isoladas por microdissecção *a laser*, como de fato foi feito, está bem indicada.

Levando em consideração a possível interferência destes fatores na validação dos genes selecionados, resolvemos avaliar a função dos genes *BCDO2* e *MAP1B* e pudemos observar uma grande coerência com o perfil de expressão encontrado entre as amostras EF e ED.

O gene *BCDO2* (*Beta-carotene oxygenase 2*), encontrado como mais expresso nos TW EF, codifica uma proteína que catalisa a clivagem oxidativa do beta caroteno cujo produto é o retinol, ou vitamina A, ou AR em sua forma ativa (KIEFER et al. 2001). Sua expressão aumentada nos TW EF pode refletir uma maior disponibilidade de AR nestes tumores (ou uma não privação) em comparação aos TW ED e, conseqüentemente, uma maior exposição das células tumorais aos efeitos do AR sobre a diferenciação celular, apoptose e ainda, sobre a expressão de *WT1*. Considerando que o AR exerce um efeito positivo sobre a expressão de *WT1* (KUDOH et al. 1996; SCHARNHORST et al. 1997; BOLLIG et al. 2009) e que a deficiência de vitamina A está associada a uma incidência aumentada de mutações em *WT1*, assim como de TW e de anormalidades no desenvolvimento do trato urogenital (LI K et al. 2005; LI et al. 2009), uma diferença na disponibilidade de AR

entre estes grupos de tumores poderia sugerir a possibilidade de estarmos diante de populações tumorais distintas, com e sem mutações em WT1, o que poderia estar relacionado à pior ou melhor evolução clínica. Outro fator que deve ser considerado é a ação do beta caroteno sobre a doxorrubicina, quimioterápico utilizado no tratamento dos TW de estádios III e IV, foco deste estudo. A doxorrubicina é um quimioterápico que intercala-se ao DNA da célula tumoral causando quebras em uma ou ambas as fitas da molécula de DNA, além de gerar radicais livres (BALIS et al. 2002). O beta caroteno, por possuir uma ação antioxidante, exerce um efeito protetor contra a ação genotóxica da doxorrubicina (DIAS et al. 2009), o que pode estar diretamente relacionado à pior evolução clínica dos pacientes com TW ED neste estudo.

Alterações citogenéticas envolvendo o *locus* 11q, localização cromossômica de *BCDO2* (11q22.3-q23.1), são frequentes nos TW sendo que a perda de material de 11q está associada à recorrência tumoral (KLAMT et al. 1998; BOWN et al. 2002), o que seria condizente com a baixa expressão deste gene nos TW ED.

O gene *MAP1B* (*Microtubule-associated protein 1B*), mais expresso nos TW ED, codifica uma proteína que promove a estabilização e estimula a polimerização dos microtúbulos, controlando suas propriedades dinâmicas. Esta proteína é a principal responsável polimerização dos neurônios e participa do processo de diferenciação neuronal, estimulada pelo AR, estando preferencialmente expressa em neurônios com maior grau de diferenciação (TANAKA et al. 1992). Seu ganho de expressão leva à estabilização dos microtúbulos (LI et al. 2006) tornando-os resistentes ao efeito anti-microtúbulo (TÖGEL et al. 1998) de certas drogas quimioterápicas, como é o caso da vincristina, principal droga no tratamento dos TW. A vincristina exerce seu efeito citotóxico ligando-se às moléculas de tubulina,

principal componente dos microtúbulos, promovendo sua desorganização. Portanto, a alta expressão de genes estabilizadores de microtúbulos, como *MAP1B* nos TW ED, pode indicar uma maior integridade estrutural e/ou capacidade regenerativa dos microtúbulos nestes tumores, podendo corresponder a um possível mecanismo de resistência ao tratamento com vincristina (ROWINSKY e DONEHOWER 1996; RIGGS 2002). Já foi observado também que a proteína MAP1B interage com a proteína p53 e que ambas, em células de neuroblastoma tratadas com doxorubicina, outra droga também usada no tratamento de TW como exposto anteriormente, migram do citoplasma para o núcleo das células onde inibem a apoptose induzida por esta droga (LEE et al. 2008).

Apesar de não estar aparentemente correlacionado ao TW, o *locus* 5q, onde está localizado o gene *MAP1B* (5q13), já pôde ser relacionado à resistência quimioterápica através de uma associação entre o ganho de material desta região e linhagens celulares de LLA resistentes à diferentes agentes quimioterápicos (EFFERTH et al. 2002), o que favorece a associação deste gene nos TW ED.

Como pudemos observar, apesar de não termos conseguido atingir os critérios estabelecidos para a validação da expressão diferencial dos genes selecionados à partir da Plataforma de Vias de Sinalização Celular, possivelmente pelos fatores já discutidos aqui, pudemos identificar dois genes (*BCDO2* e *MAP1B*) cujos perfis de expressão entre as amostras de TW EF e ED foram mantidos entre as técnicas de *microarray* e RT-PCR em tempo real e que, sobretudo, puderam ser coerentemente relacionados com a evolução clínica destas amostras. Por este motivo, estes genes merecem ser submetidos à análises mais profundas em uma amostragem mais coesa de TW.

Além disto, pudemos gerar informações acerca do perfil de expressão de 173 genes pertencentes a diferentes vias de sinalização celular em células blastematosas de TW, o que pode possibilitar uma série de estudos futuros.

Resumidamente, este estudo possibilitou, com a utilização de duas plataformas customizadas de *microarray* de cDNA totalizando mais de 6.400 genes, a identificação de genes diferencialmente expressos entre TW de componente blastematoso com evolução clínica favorável e desfavorável. A não confirmação com significância estatística da expressão diferencial dos genes relacionados ao metabolismo do AR selecionados a partir do *microarray* pode ter sido influenciada por diversos fatores, dentre eles a pequena diferença de expressão entre os grupos de amostras avaliados, o que não descarta uma possível associação destes, assim como de outros genes relacionados ao metabolismo do AR, com a evolução clínica de portadores de TW de componente blastematoso. Dos genes selecionados, aqueles que tiveram sua expressão diferencial confirmada através das etapas de validação têm uma grande chance de estarem realmente envolvidos com o prognóstico de portadores de TW de componente blastematoso. O perfil de expressão destes genes entre os grupos de amostras e suas características biológicas nos permitiu estabelecer relações com a resposta terapêutica vivenciada pelos pacientes, relações estas que, no entanto, são especulativas o que torna necessária a realização de estudos funcionais para sua comprovação para que possa ser considerada a utilização de um ou mais destes genes como marcador(es) molecular(es) de prognóstico para os tumores de Wilms.

## 6 CONCLUSÕES

### 6.1 PLATAFORMA UNIVERSAL 4.8K003

1. Foram identificados 69 genes diferencialmente expressos entre amostras de TW enriquecidas com o componente blastematoso, de histologia favorável, não submetidas à QT pré-operatória, provenientes de pacientes com estágios avançados da doença e que apresentaram (ED) ou não (EF) recaída tumoral;
2. Foi confirmada, por RT-PCR em tempo real, a expressão diferencial entre TW com EF e ED de 5 genes no grupo inicial de amostras (validação experimental), todos mais expressos nos tumores EF, dos quais 2 genes foram também confirmados como diferencialmente expressos no grupo independente de amostras (validação biológica);
3. A alta expressão dos genes *TSPAN3* e *NCOA6* foi associada à evolução favorável em TW de componente blastematoso não anaplásicos de estádios avançados;
4. Foi possível identificar um trio formado pelos genes *TSPAN3*, *NCOA6* e *CDO1* capaz de discriminar amostras de TW de componente blastematoso com e sem recaída tumoral com uma sensibilidade de 78% e especificidade de 100%;
5. Foi encontrada uma associação significativa entre marcação negativa da proteína MCM2 em amostras de TW de componente blastematoso de



pacientes com estádios III e IV e a não realização de QT pré-operatória nestes pacientes.

## 6.2 PLATAFORMA DE VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR

1. Foram identificados 173 genes diferencialmente expressos entre amostras de TW enriquecidas com o componente blastematoso, de histologia favorável, não submetidas à QT pré-operatória, provenientes de pacientes com estágios avançados da doença e que apresentaram (ED) ou não (EF) recaída tumoral, com a utilização de uma plataforma customizada de *microarray* de cDNA contendo genes pertencentes a diferentes vias de sinalização celular, dos quais 11 genes pertencentes à via do Ácido Retinóico foram selecionados para terem sua expressão diferencial validada através da técnica de RT-PCR em tempo real;
2. A análise da expressão diferencial dos genes selecionados por RT-PCR em tempo real confirmou o perfil de expressão entre TW com EF e ED de 2 genes (*BCDO2* e *MAP1B*), porém sem atingir os critérios de validação estabelecidos no grupo independente de amostras;
3. A alta expressão dos genes *BCDO2* e *MAP1B* pôde ser associada à evolução favorável e desfavorável, respectivamente, em TW de componente blastematoso não anaplásicos de estádios avançados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamson PC, Reaman G, Finklestein JZ, et al. Phase I trial and pharmacokinetic study of all-trans-retinoic acid administered on an intermittent schedule in combination with interferon-alpha2a in pediatric patients with refractory cancer. **J Clin Oncol** 1997; 15:3330-7.

Adamson PC, Matthay KK, O'Brien M, Reaman GH, Sato JK, Balis FM. A phase 2 trial of all-trans-retinoic acid in combination with interferon-alpha2a in children with recurrent neuroblastoma or Wilms tumor: A Pediatric Oncology Branch, NCI and Children's Oncology Group Study. **Pediatr Blood Cancer** 2007; 49:661-5.

Bailis JM, Forsburg SL. MCM proteins: DNA damage, mutagenesis and repair. **Curr Opin Genet Dev** 2004; 14:17-21.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Bollig F, Perner B, Besenbeck B, et al. A highly conserved retinoic acid responsive element controls wt1a expression in the zebrafish pronephros. **Development** 2009; 136:2883-92.

Bonadio JF, Storer B, Norkool P, Farewell VT, Beckwith JB, D'Angio GJ. Anaplastic Wilms' tumor: clinical and pathologic studies. **J Clin Oncol** 1985; 3:513-20.

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

Brentani H, Caballero OL, Camargo AA, et al. The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:13418-23.

Brentani RR, Carraro DM, Verjovski-Almeida S, et al. Gene expression arrays in cancer research: methods and applications. **Crit Rev Oncol Hematol** 2005; 54:95-105.

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

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

Corbin M, de Reyniès A, Rickman DS, et al. WNT/beta-catenin pathway activation in Wilms tumors: a unifying mechanism with multiple entries? **Genes Chromosomes Cancer** 2009; 48:816-27.

Cotton CA, Peterson S, Norkool PA, et al. Early and late mortality after diagnosis of Wilms tumor. **J Clin Oncol** 2009; 27:1304-9.

Cox WG, Singer VL. Fluorescent DNA hybridization probe preparation using amine modification and reactive dye coupling. **Biotechniques** 2004; 36:114-22.

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

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

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

de Camargo B, de Oliveira Santos M, Rebelo MS, et al. Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: first report of 14 population-based cancer registries. **Int J Cancer** 2010; 126:715-20.

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

de Luca LM. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. **FASEB J** 1991; 5:2924-33.

de Souza SJ, Camargo AA, Briones MR, et al. Identification of human chromosome 22 transcribed sequences with ORF expressed sequence tags. **Proc Natl Acad Sci USA** 2000; 97:12690-3.

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

Dias CD, Araújo BC, Dutra ES, Nepomuceno JC. Protective effects of beta-carotene against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genet Mol Res** 2009; 8:1367-75.

Dias Neto E, Correa RG, Verjovski-Almeida S, et al. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2000; 97:3491-6.

Diller L, Ghahremani M, Morgan J, et al. Constitutional WT1 mutations in Wilms' tumor patients. **J Clin Oncol** 1998; 16:3634-40.

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

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

Dudderidge TJ, Stoeber K, Loddo M, et al. Mcm2, Geminin, and KI67 define proliferative state and are prognostic markers in renal cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2005; 11:2510-7.

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

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

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

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

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

Fukuzawa R, Reeve AE. Molecular pathology and epidemiology of nephrogenic rests and Wilms tumors. **J Pediatr Hematol Oncol** 2007; 29:589-94.

Fukuzawa R, Anaka MR, Heathcott RW, McNoe LA, Morison IM, Perlman EJ, Reeve AE. Wilms tumour histology is determined by distinct types of precursor lesions and not epigenetic changes. **J Pathol** 2008; 215:377-87.

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

Gakiopoulou H, Korkolopoulou P, Levidou G, et al. Minichromosome maintenance proteins 2 and 5 in non-benign epithelial ovarian tumours: relationship with cell cycle regulators and prognostic implications. **Br J Cancer** 2007; 97:1124-34.

Giaginis C, Georgiadou M, Dimakopoulou K, et al. Clinical significance of MCM-2 and MCM-5 expression in colon cancer: association with clinicopathological parameters and tumor proliferative capacity. **Dig Dis Sci** 2009; 54:282-91.

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

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.

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

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

Hennigar RA, O'Shea PA, Grattan-Smith JD. Clinicopathologic Features of Nephrogenic Rests and Nephroblastomatosis. **Adv Anat Pathol** 2001; 8:276-89.

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

Hong S, Lee MY, Cheong J. Functional interaction of transcriptional coactivator ASC-2 and C/EBPalpha in granulocyte differentiation of HL-60 promyelocytic cell. **Biochem Biophys Res Commun** 2001; 282:1257-62.

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.

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

Jelinic P, Shaw P. Loss of imprinting and cancer. **J Pathol** 2007; 211:261-8.

Kiefer C, Hessel S, Lampert JM, et al. Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. **J Biol Chem** 2001; 276:14110-6.

Kim MK, McGarry TJ, O Broin P, Flatow JM, Golden AA, Licht JD. An integrated genome screen identifies the Wnt signaling pathway as a major target of WT1. **Proc Natl Acad Sci USA** 2009; 106:11154-9.

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

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



Ko EY, Ritchey ML. Current management of Wilms' tumor in children. **J Pediatr Urol** 2009; 5:56-65.

Kong HJ, Yu HJ, Hong S, et al. Interaction and functional cooperation of the cancer-amplified transcriptional coactivator activating signal cointegrator-2 and E2F-1 in cell proliferation. **Mol Cancer Res** 2003; 1:948-58.

Kudoh T, Ishidate T, Nakamura T, Toyoshima K, Akiyama T. Constitutive expression of the Wilms tumor suppressor gene WT1 in F9 embryonal carcinoma cells induces apoptotic cell death in response to retinoic acid. **Oncogene** 1996; 13:1431-9.

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

Lee SK, Anzick SL, Choi JE, et al. A nuclear factor, ASC-2, as a cancer-amplified transcriptional coactivator essential for ligand-dependent transactivation by nuclear receptors in vivo. **J Biol Chem** 1999; 274:34283-93.

Lee SK, Na SY, Jung SY, et al. Activating protein-1, nuclear factor-kappaB, and serum response factor as novel target molecules of the cancer-amplified transcription coactivator ASC-2. **Mol Endocrinol** 2000; 14:915-25.

Lee SY, Kim JW, Jeong MH, et al. Microtubule associated protein 1B light chain (MAP1B-LC1) negatively regulates the activity of tumor suppressor p53 in neuroblastoma cells. **FEBS Lett** 2008; 582:2826-32.

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

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

Li K, Gao J, Xiao X, Chen L, Zhang L. The enhancing role of vitamin A deficiency on chemically induced nephroblastoma in rats. **J Pediatr Surg** 2005; 40:1951-6.

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

Li K, Zeng S, Gao J, Chen L, Wang Y. The effect of vitamin A deficiency in maternal rats on tumor formation in filial rats. **J Pediatr Surg** 2009; 44:565-70.

Li W, Xia JT, Feng Y. Microtubule stability and MAP1B upregulation control neuritogenesis in CAD cells. **Acta Pharmacol Sin** 2006; 27:1119-26.

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

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

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

Mahajan MA, Samuels HH. Nuclear hormone receptor coregulator: role in hormone action, metabolism, growth, and development. **Endocr Rev** 2005; 26:583-97.

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

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

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.

Matsubara T, Eimoto T, Okabe M, et al. Proliferation and apoptosis of tumour cells before and after neoadjuvant therapy for high-grade extremity sarcomas: divergent associations with tumour response and prognosis. **Histopathology** 2008; 52:706-16.

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

Meng MV, Grossfeld GD, Williams GH, et al. Minichromosome maintenance protein 2 expression in prostate: characterization and association with outcome after therapy for cancer. **Clin Cancer Res** 2001; 7:2712-8.

Mincheva A, Todorov I, Werner D, Fink TM, Lichter P. The human gene for nuclear protein BM28 (CDCL1), a new member of the early S-phase family of proteins, maps to chromosome band 3q21. **Cytogenet Cell Genet** 1994; 65:276-7.

Natrajan R, Little SE, Sodha N, et al. Analysis by array CGH of genomic changes associated with the progression or relapse of Wilms' tumour. **J Pathol** 2007; 211:52-9.

Obermann EC, Went P, Zimpfer A, et al. Expression of minichromosome maintenance protein 2 as a marker for proliferation and prognosis in diffuse large B-cell lymphoma: a tissue microarray and clinico-pathological analysis. **BMC Cancer** 2005; 5:162.

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

Perlman EJ. Pediatric renal tumors: practical updates for the pathologist. **Pediatr Dev Pathol** 2005; 8:320-38.

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.

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

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

Ramnath N, Hernandez FJ, Tan DF, et al. MCM2 is an independent predictor of survival in patients with non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol** 2001; 19:4259-66.

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

Reena RM, Mastura M, Siti-Aishah MA, et al. Minichromosome maintenance protein 2 is a reliable proliferative marker in breast carcinoma. **Ann Diagn Pathol** 2008; 12:340-3.

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

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

Rodins K, Cheale M, Coleman N, Fox SB. Minichromosome maintenance protein 2 expression in normal kidney and renal cell carcinomas: relationship to tumor dormancy and potential clinical utility. **Clin Cancer Res** 2002; 8:1075-81.

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

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.

Satoh Y, Nakadate H, Nakagawachi T, et al. Genetic and epigenetic alterations on the short arm of chromosome 11 are involved in a majority of sporadic Wilms' tumours. **Br J Cancer** 2006; 95:541-7.

Scharnhorst V, Kranenburg O, van der Eb AJ, Jochemsen AG. Differential regulation of the Wilms' tumor gene, WT1, during differentiation of embryonal carcinoma and embryonic stem cells. **Cell Growth Differ** 1997; 8:133-43.

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

Schluth C, Mattei MG, Mignon-Ravix C, et al. Intrachromosomal triplication for the distal part of chromosome 15q. **Am J Med Genet A** 2005; 136:179-84.

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

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

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

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

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

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

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

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

Tanaka Y, Kawahata K, Nakata T, Hirokawa N. Chronological expression of microtubule-associated proteins (MAPs) in EC cell P19 after neuronal induction by retinoic acid. **Brain Res** 1992; 596:269-78.

Todd SC, Doctor VS, Levy S. Sequences and expression of six new members of the tetraspanin/TM4SF family. **Biochim Biophys Acta** 1998; 399:101-4.

Tögel M, Wiche G, Propst F. Novel features of the light chain of microtubule associated protein MAP1B: microtubule stabilization, self interaction, actin filament binding, and regulation by the heavy chain. **J Cell Bio** 1998; 143:695-707.

Tye BK. MCM proteins in DNA replication. **Annu Rev Biochem** 1999; 68:649-86.

Vandesompele J, Katleen DP, Filip P, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology** 2002; 3:34.1-34.11.

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

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

Vujanic GM, Sandstedt B, Harms D, et al. Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. **Med Pediatr Oncol** 2002; 38:79-82.

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

Wegert J, Wittmann S, Leuschner I, Geissinger E, Graf N, Gessler M. WTX inactivation is a frequent, but late event in Wilms tumors without apparent clinical impact. **Genes Chromosomes Cancer** 2009; 48:1102-11.

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

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

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

Yang SH, Seo MY, Jeong HJ, et al. Gene copy number change events at chromosome 20 and their association with recurrence in gastric cancer patients. **Clin Cancer Res** 2005; 11:612-20.

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.

Zirn B, Samans B, Spangenberg C, Graf N, Eilers M, Gessler M. All-trans retinoic acid treatment of Wilms tumor cells reverses expression of genes associated with high risk and relapse in vivo. **Oncogene** 2005; 24:5246-51.

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.




Zuppan CW, Beckwith JB, Luckey DW, et al. Anaplasia in unilateral Wilms' tumor: a report from the National Wilms' Tumor Study Pathology Center. **Hum Pathol** 1988; 19:1199-209.

*ANEXOS*

---

**Anexo 1** Aprovação do projeto deste estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital A. C. Camargo

 **Hospital  
A.C. Camargo**

**Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 19 de Setembro de 2008.

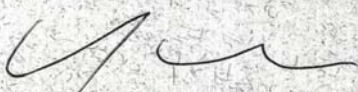
A  
**Dra. Dirce Maria Carraro**

**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 764/06**  
**“Identificação de potenciais marcadores de resposta terapêutica para o tumor de Wilms através de microarray usando plataforma de cDNA contendo genes pertencentes à via do ácido retinóico”.**

Prezada Doutora:

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente - Hospital A.C. Camargo, em sua última reunião de 09/09/2008, **tomaram conhecimento e aprovaram** as mudanças no conteúdo e no título do projeto para desenvolvimento sob nova orientação.

Atenciosamente,

  
**Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**  
**Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**

---

Rua Prof. Antônio Prudente, 211 - Liberdade - São Paulo - SP - CEP 01509-900 - CNPJ 60.961.968/0001-06  
Tel/Fax (0XX11)2189.5020 - cep\_hcancer@hcancer.org.br

**Anexo 2** - Protocolo para a amplificação do mRNA (Baseado em WANG et al. 2000).

**Seqüências dos Primers:**

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

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

**Primeiro round de amplificação**

**1. Síntese da primeira fita de cDNA:**

3-5µg RNA total  
H<sub>2</sub>O DEPC q.s.p. 6µL.  
1µL 0,5µg/µL oligo dT(15)-T7 primer

- Incubar a 70 °C por 10 min. seguido de resfriamento rápido em gelo

**Preparo do 1<sup>st</sup> Strand Master Mix:**

4µL 5x first strand buffer  
3µL 0,5ug/µL TS (template switch) primer  
2µL 0,1M DTT  
1µL Rnase IN  
2µL 10mM dNTP  
1µL Superscript II

- Incubação a 42°C por 1 hora no termo-ciclador  
- Adicionar 1µL de Superscript II e incubar a 42°C por mais 1 hora no termo-ciclador.  
- Resfriar rapidamente em gelo

**2. Síntese da segunda fita de cDNA:** reservar 5µL do ss-cDNA

**Preparo do 2<sup>nd</sup> Strand Master Mix:**

21µL de ss-cDNA  
64,3µL H<sub>2</sub>O DEPC  
10µL Advantage PCR buffer  
2µL 10mM dNTP mix  
0,7µL RNase H

2 $\mu$ L Advantage Polymerase  
Volume final: 100 $\mu$ L / tubo

- Incubar:
  - 37°C por 10 min. (digestão do mRNA)
  - 94°C por 3 min. (desnaturação)
  - 65°C por 5 min. (anelamento)
  - 75°C por 30 min. (extensão)
- Interromper a reação com 5 $\mu$ L de solução 1M NaOH contendo 2mM EDTA
- Incubar a 65°C por 10min. para inativação da enzima

### 3. Purificação com Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico e precipitação

- Adicionar aos tubos com produto da reação da segunda fita de cDNA: 100 $\mu$ L de Fenol / Clorofórmio / Álcool Isoamílico (25:24:1) pH 8.0
- Transferir para um novo tubo de 1,5mL, agitar por 2 min. e deixar à T.A. por 10 min.
- Centrifugar à T.A. por 15 min. a 13.200rpm.
- Transferir a fase aquosa para um novo tubo de 1,5mL.
- Adicionar 100 $\mu$ L de Clorofórmio, agitar por 2 min. e deixar à T.A. por 10 min.
- Centrifugar à T.A. por 15 minutos a 13.200rpm.
- Transferir a fase aquosa para um novo tubo de 2,0ml, adicionar 1 $\mu$ l de acrilamida linear (10mg/mL), 10% do volume total de NaOAc 3M pH 5,2 e 3 volumes de EtOH 100% gelado.
- Agitar por 2 min. e deixar a -80°C por 40 min.
- Centrifugar a 14.000rpm por 30 min. a 4°C.
- Lavar o pellet 5-6 vezes com 1mL de EtOH 70% preparado com água Milli-Q, centrifugando a 14.000rpm por 2 min. a 4°C.
- Solubilizar o pellet em 11 $\mu$ L de água DEPC, deixar por 10 min. a 55°C em banho-maria e agitar
- Fazer a leitura espectrofotométrica na diluição 1:100.

### 4. Transcrição *In Vitro*

#### 4.1. Preparo do *Master Mix*:

10 $\mu$ L ds-cDNA  
7,5 $\mu$ L de 25mM dNTP (A,G,C e UTP)  
5 $\mu$ L 5x reaction buffer  
2,5 $\mu$ L enzyme mix (RNase inhibitor e T7 phage polymerase)  
Volume final: 25 $\mu$ L

- Incubar a 37°C por 6hs.

## 4.2. Purificação do aRNA com Trizol

- Adicionar 1mL de Trizol a cada tubo e agitar
- Adicionar 200µL de Clorofórmio para cada 1mL de solução Trizol
- Agitar vigorosamente por 1 min.
- Incubar à T.A. por 5 min.
- Centrifugar a 12.000rpm por 15 min. a 4°C
- Transferir cuidadosamente a fase aquosa para um novo tubo (2.0 mL) e adicionar 500µL de Isopropanol p/ cada 1mL de Trizol e agitar vigorosamente por 2 min.
- Incubar à T.A. por 30 min.
- Centrifugar a 14.000rpm por 30 min. a 4°C
- Lavar o *pellet* 5 a 6 vezes com 1mL de EtOH 70% gelado
- Centrifugar a 14.000rpm por 2 min. a 4°C
- Secar o *pellet* em ar ambiente ou em banho seco a 42°C e solubilizá-lo rapidamente em 7µL de H<sub>2</sub>O DEPC
- Fazer a leitura espectrofotométrica (OD 260 e OD 280).

## Segundo round de amplificação

### 1. Síntese da primeira fita de cDNA:

- Concentrar o aRNA em um volume de 6µL com *speed-vac*
- Adicionar 3µL (3µg/µL) de *random hexamer* (dN6). Agitar bem.
- Incubar a 70 °C por 10 min., resfriar à T.A. e reservar por 10 min.

#### **Preparo do 1<sup>nd</sup> Strand Master Mix:**

- vide 1º *round* de amplificação

### 2. Síntese da segunda fita de cDNA:

#### **Preparo do 2<sup>nd</sup> Strand Master Mix:**

- vide 1º *round* de amplificação

### 3. Purificação com Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico e precipitação

- vide 1º *round* de amplificação

### 4. Transcrição *In Vitro*

#### 4.1. Preparo do *master mix*:

- vide 1º *round* de amplificação

#### 4.2. Purificação do aRNA com Trizol

- vide 1º *round* de amplificação
- No final, secar o *pellet* em ar ambiente ou em banho seco a 42°C e solubilizá-lo rapidamente em 11 µL de H<sub>2</sub>O DEPC
- Fazer a leitura espectrofotométrica (OD 260 e OD 280).

### Anexo 3 Protocolo para a marcação do cDNA.

#### 1. Síntese do cDNA marcado com fluorocromos.

- 4µg de aRNA
- 3µL de dN6 (3µg/µL)
- 1,2µL de cDNA controle<sup>1</sup> 4.5x (ou 1µL controle 5x)
- H<sub>2</sub>O DEPC: qsp 15,9µL
- Incubar a 70 °C por 10 min. seguido de resfriamento rápido em gelo

#### Adicionar :

- 15,9µL do RNA/oligo mix
- 6µL first strand buffer 5x
- 3,0µL 0,1M DTT
- 0,6µL Low C<sup>2</sup>
- 0,5µL RNasin (*Promega, cat # N251B, 40U/µL*).
- 2µL dCTP<sup>3</sup> (25nmol Cy3 ou Cy5, cat # PA53021 ou PA55021, respectivamente, *Amersham*).
- 2,0µL SuperscriptII reverse transcriptase (*Life Technologies*)
- Volume final = 30µL
- Mix com cuidado, spin, 42°C por 2 hs
- <sup>1</sup> 1 µL da mistura do mRNA controles 1X contém:
  - Q do fago λ “landmark” na concentração de 45ng/µL
  - Clone de *B. subtilis* trp gene (ATCC, 87485) 30ng/µL
  - Clone de *B. subtilis* dapB gene (ATCC, 87485) 15ng/µL
  - Clone de *B. subtilis* thrB gene (ATCC, 87485) 3ng/µL
  - Clone de *B. subtilis* pheB gene (ATCC, 87485) 1,5ng/µL
  - Clone de *B. subtilis* lysA gene (ATCC, 87485) 0,3ng/µL

(A adição de 1µL desta mistura 1X em 25 a 50µg de RNA total resulta em uma contaminação do RNA total de mamíferos com mRNAs que correspondem a genes com níveis de transcrição de aproximadamente 1:20.000 (lysA), 1:4.000 (pheB), 1:2.000 (thrB), 1:400 (dapB), 1:200 (trp)).

#### <sup>2</sup> dNTPs mix (Low C ddNTP mix): uso com dCTP marcado

Concentração Inicial	Volume	Concentração final
dATP (100mM)	5µL	25mM
dCTP (100mM)	2µL	10mM
dGTP (100mM)	5µL	25mM
dTTP (100mM)	5µL	25mM
H <sub>2</sub> O DEPC q.s.p 20,0µL	3µL	
Total	20µL	

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



<sup>3</sup> **dNTPs mix (Low T dNTP mix):** uso com dUTP marcado

Concentração Inicial	Volume	Concentração final
dATP (100mM)	5 $\mu$ L	25mM
dCTP (100mM)	5 $\mu$ L	25mM
dGTP (100mM)	5 $\mu$ L	25mM
dTTP (100mM)	2 $\mu$ L	10mM
H <sub>2</sub> O DEPC q.s.p 20,0 $\mu$ L	3 $\mu$ L	
Total	20 $\mu$ L	

\*O dCTP deve ser aliquotado em 3 $\mu$ l/tubo e guardado no escuro a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Durante as reações evitar sempre a luz, cobrindo tubos e aquecedores com papel alumínio.

**2. Degradação do RNA** – volume:volume

1,5 $\mu$ L 0,5M EDTA

1,5 $\mu$ L 1M NaOH

- Incubar a  $70^{\circ}\text{C}$  por 20 min.
- Neutralizar a reação: adicionar 1,5 $\mu$ L 1M HCl
- Incubar no escuro durante a preparação da coluna
- Purificar em coluna Autoseq G50 (item 3)

**3. Purificação do cDNA em coluna Autoseq G50 (Amersham cat # 27-5340-01):**

- Ressuspender a resina com o uso de vortex.
- Quebrar a ponta da coluna e desatarrachar a tampa com meia volta ( $\sim 40^{\circ}$ ).
- Spin a 2000g por 1min. com a coluna adaptada em tubo *ependorf* de 2,0mL.
- Adicionar o produto de cada reação de cDNA ( $\pm 34,5\mu\text{L}$ ) no centro da resina de cada coluna, com cuidado. Usar uma coluna por reação de cDNA.
- Transferir a coluna para o tubo *ependorf* de 2,0mL.
- Spin a 2000g por 1min. com a coluna adaptada em tubo de 2,0mL.
- Guardar eluato a  $4^{\circ}\text{C}$  ao abrigo da luz ou a  $-20^{\circ}\text{C}$  overnight.