

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA PAULA PERCICOTE

A IMUNOISTOQUÍMICA COMO FATOR PROGNÓSTICO
EM TUMORES DE WILMS

CURITIBA
2010

ANA PAULA PERCICOTE

A IMUNOISTOQUÍMICA COMO FATOR PROGNÓSTICO
EM TUMORES DE WILMS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia da Universidade Federal do Paraná,
para a obtenção do título de Mestre

Orientadora: Dra Lúcia de Noronha

CURITIBA
2010



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS e da SAÚDE
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

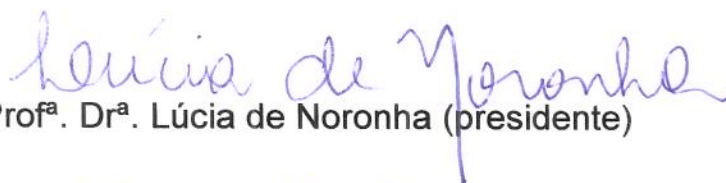
TERMO DE APROVAÇÃO

“Expressão imunoistoquímica em tumores de Wilms e correlação com fatores prognósticos”

por

ANA PAULA PERCICOTE

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:



Prof^a. Dr^a. Lúcia de Noronha (presidente)



Dr^a. Mara Albonei Dudeque Pianovski



Prof^a. Dr^a. Lia Sumie Nakao

Curitiba, 12 de novembro de 2010.

RESUMO

O nefroblastoma, ou tumor de Wilms, é a neoplasia renal mais freqüente na infância e corresponde a 98% dos tumores renais nesta faixa etária. Embora o prognóstico seja favorável para a maioria dos pacientes muitos evoluem para recidiva ou óbito. A caracterização de grupos de risco através de biomarcadores tem por objetivo adequar o tratamento ao grupo de risco e reduzir recidivas e óbitos. Entre os marcadores estão o WT1, p53, BCL-2, BAX e VEGFR1, relacionados a via apoptótica, reparo do DNA e neovascularização. A quiescina/sulfidril oxidase (QSOX1) parece participar da formação da matriz extracelular e da via apoptótica. O objetivo deste estudo é avaliar a expressão imunoistoquímica da QSOX1 em amostras de nefroblastoma humano correlacioná-la a fatores prognósticos clínico-patológicos e demais marcadores imunoistoquímicos (WT1, p53, BCL-2, BAX e VEGFR1). Foram utilizadas 29 amostras de nefroblastomas, retiradas dos Serviços de Anatomia Patológica do Hospital Infantil Pequeno Príncipe e Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, com diagnósticos entre 1994 a 2007. Através da técnica de imunoistoquímica com as amostra em tissue microarray realizou-se análise comparativa entre a expressão imunoistoquímica destes marcadores e fatores prognósticos clínico-patológicos. Quanto ao estadiamento a amostra é composta por 8 pacientes estadio I, 4 estadio II, 10 estadio III e 7 estadio IV. Anaplasia foi observada em 2 casos (6,9%). Em relação à evolução clínica, 5 pacientes foram a óbito (14,2%), 2 doentes apresentaram recidiva (6,9%), enquanto a maioria, 22 crianças (75,86%), apresentou-se livre de doença. Quanto ao risco, 4 eram de alto risco e 25 de risco intermediário. Com relação à expressão imunoistoquímica da QSOX1, não foram encontradas correlações significativas. Houve associação da expressão imunoistoquímica média de BCL-2 com a evolução clínica, sendo sua maior positividade encontrada no grupo livre de doença. Observamos, em relação ao BAX, tendência a associação a maior positividade no grupo de estadio I. A expressão imunoistoquímica média e isolada de VEGFR1 nos componentes blastematoso e epitelial se associaram ao grupo de risco. Deste modo, a QSOX1 não se mostrou um bom marcador para discriminar grupos prognósticos. O BCL-2 foi capaz de separar grupos com evoluções clínicas diferentes, sendo mais expresso no grupo livre de doença. O BAX apresentou uma tendência para discriminar grupos com estadios diferentes, sendo mais expressa no estadio inicial e o VEGFR1 se mostrou útil em se associar ao grupo de risco.

Palavras-chave: tumor de Wilms; QSOX1; WT1; p53; BCL-2, BAX; VEGFR1.

ABSTRACT

Nephroblastoma or Wilms' tumor is the commonest renal cancer in children and accounts for about 98% of renal tumors in this age group. The prognosis is favorable for the majority of the patients, but a significant number progress with relapses or death. The characterization of risk groups applying biomarkers allows to adapt the treatment with the risk group and reduce relapses and deaths. The most important biomarkers are the WT1, p53, BCL-2, BAX and VEGFR1, related to the apoptotic pathway, DNA repair and neovascularization. The quiescin/sulfhydryl oxidase (QSOX1) appears to participate in the formation of extracellular matrix and the apoptotic pathway. The aim of this study is to evaluate the immunohistochemical expression of QSOX1 in samples of human nephroblastoma and correlate it with clinical and pathological prognostic factors and other immunohistochemical markers (WT1, p53, BCL-2, BAX and VEGFR1). Twenty-nine surgical specimens of nephroblastoma, submitted to surgery between 1994 and 2007, in "Hospital Infantil Pequeno Príncipe" and "Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná" were selected. Tissues microarrays were prepared from paraffin blocks. The immunohistochemical expression was compared with clinical outcome and pathological prognostic factors. Our sample was composed of 8 patients stage I, 4 stage II, 10 stage III and 7 stage IV. Anaplasia was observed in 2 cases (6,9%). Considering the clinical outcome, 5 patients died (14,2%), 2 patients had relapse (6,9%), while the majority, 22 children (75,86%) were disease-free. About the risk group, four were high and 25 were intermediate risk. There were no correlations between the immunohistochemical expression of QSOX1, clinical outcome and pathological prognosis factors or the expression of the others biomarkers. The immunoreaction of BCL-2 correlated with clinical outcome, and its strongest positivity was found in disease-free group. The high BAX expression showed a tendency to correlate with the stage I group. The immunohistochemical expression of VEGFR1 in blastema and epithelium correlated with the risk group. We concluded that QSOX1 was not a good marker distinguish prognostic groups. The BCL-2 was able to separate groups with different clinical outcomes, being more expressed in disease-free group. The BAX showed a tendency to discriminate groups with different stages, being more expressed in early stages and VEGFR1 proved to be useful to correlate with the risk group.

Key words: Wilms' tumor; QSOX1; WT1; p53; BCL-2, BAX; VEGFR1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1	– CONDIÇÕES COM RISCO AUMENTADO DE TUMOR DE WILMS.....	26
FIGURA 1	– MACROSCOPIA DO TUMOR DE WILMS.....	27
FIGURA 2	– HISTOLOGIA DO TUMOR DE WILMS.....	28
FIGURA 3	– COMPONENTE BLASTEMATOSO DO TUMOR DE WILMS.....	29
FIGURA 4	– DIFERENCIAÇÃO RABDOMIOBLÁSTICA DO COMPONENTE ESTROMAL DO TUMOR DE WILMS.....	30
FIGURA 5	– COMPONENTE EPITELIAL DO TUMOR DE WILMS.....	31
FIGURA 6	– TUMOR DE WILMS COM ANAPLASIA.....	33
QUADRO 2	– <i>SOCIÉTÉ INTERNATIONALE D’ONCOLOGIE PÉDIATRIQUE WORKING CLASSIFICATION OF RENAL TUMORS</i>	37
QUADRO 3	– CRITÉRIOS HISTOLÓGICOS PARA SUBCLASSIFICAR TUMORES DE WILMS SEGUNDO <i>SOCIÉTÉ INTERNATIONALE D’ONCOLOGIE PÉDIATRIQUE 2001</i>	38
QUADRO 4	– ESTADIAMENTO SEGUNDO A <i>SOCIÉTÉ INTERNATIONALE D’ONCOLOGIE PÉDIATRIQUE</i> E A <i>NATIONAL WILMS TUMOR STUDY</i>	41
FIGURA 7	– ESQUEMA DEMONSTRATIVO DA MONTAGEM DE UM TISSUE MICROARRAY COM SEUS BLOCOS DOADORES (DONOR) ORGANIZADOS, A PINÇA DE <i>PUNCH</i> SOBRE A ÁREA DA AMOSTRA A SER RETIRADA E A MESMA CONTENDO O CORE DE TECIDO (SETA DUPLA), ALÉM DA CONTRUÇÃO DO BLOCO RECEPTOR (RECIPIENT) COM SUAS LINHAS E COLUNAS PREVIAMENTE IDENTIFICADAS POR UMA MAPA EM PLANO CARTESIANO.....	65

- FIGURA 8** – FOTOGRAFIA DE DOIS BLOCOS DE TISSUE MICROARRAYS E DA PINÇA DE *PUNCH* NÚMERO 3 UTILIZADA PARA A SUA CONSTRUÇÃO..... 66
- FIGURA 9** – FOTOGRAFIA DE DUAS LAMINAS EM TISSUE MICROARRAYS CORADAS PELO MÉTODO DA IMUNOISTOQUÍMICA COM O ANTICORPO ANTI-QSOX1 APRESENTANDO AS IDENTIFICAÇÕES DOS CASOS NAS LINHAS NUMERADAS E DAS QUATRO AMOSTRAS DE CADA CASO NAS COLUNAS A, B, C E D..... 66
- FIGURA 10** – IMUNOEXPRESSÃO DE QSOX, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1..... 75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– DADOS CLÍNICOS DA POPULAÇÃO EM ESTUDO.....	71
TABELA 2	– ESTATÍSTICA DESCRITIVA DE TODAS AS VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DO ESTUDO.....	73
TABELA 3	– VALORES DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA QSOX1, p53, WT1, BCL2, BAX E VEGFR1.....	74
TABELA 4	– AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE QSOX1 E p53, BCL-2, BAX, WT-1 E VEGFR1.....	76
TABELA 5	– RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 E A IDADE DOS PACIENTES DIVIDIDA EM MENORES DE 24 MESES OU MAIORES/IGUAIS A 24 MESES.....	77
TABELA 6	– RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE MARCADORES QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 E O ESTADIAMENTO.....	78
TABELA 7	– RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 E O GRUPO DE RISCO.....	79
TABELA 8	– RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 E A EVOLUÇÃO CLÍNICA.....	80
TABELA 9	– RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 E O PESO TUMORAL..	80
TABELA 10	– RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 E A ANAPLASIA.....	82

TABELA 11 – RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 E A QUIMIOTERAPIA PRÉ-OPERATÓRIA.....	83
TABELA 12 – RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS E O GRUPO DE RISCO.....	84
TABELA 13 – RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS E O ESTADIAMENTO.....	85
TABELA 14 – RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS E A EVOLUÇÃO CLÍNICA.....	88
TABELA 15 – RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS E A ANAPLASIA.....	89
TABELA 16 – RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS E A QUIMIOTERAPIA PRÉ-OPERATÓRIA.....	91

LISTA DE SIGLAS

BAX	- <i>BCL-2 associated X protein</i>
BCL-2	- <i>B-cell lymphoma protein 2</i>
CD40	- <i>TNF receptor superfamily member 5</i>
C/EBPB	- <i>CCAAT/enhancer-binding protein-β</i>
CLK1	- <i>CDC-like kinase 1</i>
CTNNB1	- <i>Catenin (cadherin-associated protein), beta 1</i>
<i>EGR1</i>	- <i>Early growth response 1</i>
<i>EGR2</i>	- <i>Early growth response 2</i>
Fas	- <i>TNF receptor superfamily, member 6</i>
FWT1	- Gene do tumor de Wilms 1 familial
FWT2	- Gene do tumor de Wilms 2 familial
GPO	- <i>German Pediatric Oncology</i>
H4FG	- <i>Histone H4 family</i>
IL11RA	- <i>Interleukin 11 receptor, alpha</i>
INK4	- <i>Inhibitors of CDK4</i>
NWTSG	- <i>National Wilms Tumor Study Group</i>
NWTS	- <i>National Wilms Tumor Study</i>
PEG3	- <i>Paternally expressed 3</i>
POSTN	- <i>Periostin, osteoblast specific factor</i>
p53	- Proteína 53

p21	- Proteína 21
QSOX	- Quiescina sulfidril oxidase
QSOX-1	- Quiescina sulfidril oxidase- 1
QSOX-2	- Quiescina sulfidril oxidase- 2
QSOXN	- Quiescina sulfidril oxidase N
RNPL	- Restos nefrogênicos perilobares
RNIL	- Restos nefrogênicos intralobares
RT-PCR	- Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SFOP	- <i>French Société d'Oncologie Pédiatrique</i>
SIOP	- <i>Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique</i>
SMPDL3	- <i>Sphingomyelin phosphodiesterase 3</i>
SMYD2	- <i>SET and MYND domain containing 2</i>
TRKB	- Receptor tirosina quinase
UKCCSG	- <i>United Kingdom Children's Cancer Study Group</i>
VEGF	- Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR1	- Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1
WT-1	- Gene do tumor de Wilms 1
WT-2	- Gene do tumor de Wilms 2
WTX	- Gene do tumor de Wilms no X

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2. 1. OBJETIVO GERAL	18
2. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3. 1. HISTÓRICO	19
3. 2. EPIDEMIOLOGIA	20
3. 3. PATOGÊNESE	21
3. 4. APRESENTAÇÃO CLÍNICA E ANOMALIAS CONGÊNITAS ASSOCIADAS	25
3. 5. ANATOMIA PATOLÓGICA	27
3. 5. 1. MACROSCOPIA	27
3. 5. 2. MICROSCOPIA	28
3. 6. SEQÜELAS DO TRATAMENTO	33
3. 7. RECORRÊNCIA TUMORAL	34
3. 8. FATORES PROGNÓSTICOS	35
3. 8. 1. IDADE	35
3. 8. 2. GRUPO DE RISCO	36
3. 8. 3. ESTADIAMENTO	39
3. 8. 4. ASPECTOS HISTOLÓGICOS RELEVANTES PARA O PROGNÓSTICO	42
3. 8. 5. PESO TUMORAL	42
3. 8. 6. VARIÁVEIS DE MICROESTADIAMENTO.....	43
3. 9. MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS	43
3. 9. 1. QSOX1.....	43
3. 9. 2. O WT1.....	47
3. 9. 3. A PROTEÍNA p53	51
3. 9. 4. A PROTEÍNA BCL-2	54
3. 9. 5. A PROTEÍNA BAX	57
3. 9. 6. O RECEPTOR VEGFR1	59
4. MATERIAL E MÉTODOS	63
4. 1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	63
4. 2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	63
4. 3. SELEÇÃO DE BLOCOS E LÂMINAS	64
4. 4. CLASSIFICAÇÃO DA AMOSTRA	64
4. 5. PREPARAÇÃO DE LÂMINAS POR ARRANJO TECIDUAL EM MATRIZ (TMA) ARTESANAL	64
4. 6. REALIZAÇÃO DOS TESTES DE IMUNOISTOQUÍMICA	67
4. 7. LEITURA DAS LÂMINAS DE IMUNOISTOQUÍMICA	67
4. 8. COLETA DE DADOS CLÍNICOS E DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DO ESTUDO	69
4. 9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
5. RESULTADOS	71
5. 1. DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO	71
5. 2. EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA QSOX1, p53, WT1, BCL2, BAX E VEGFR1.....	74

5. 3. CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA QSOX1 COM ÀQUELA DOS OUTROS BIOMARCADORES DE PROGRESSÃO TUMORAL (p53, WT1, BCL2, BAX E VEGFR1) ...	76
5. 4. CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA QSOX1, P53, WT1, BCL2, BAX E VEGFR1 COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA, COM A IDADE DOS PACIENTES, ESTADIAMENTO E GRUPO DE RISCO DOS MESMOS	76
5. 4. 1. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS EM RELAÇÃO À IDADE DOS PACIENTES	77
5. 4. 2. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS EM RELAÇÃO AO ESTADIAMENTO DOS PACIENTES	77
5. 4. 3. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS EM RELAÇÃO AO GRUPO DE RISCO DOS PACIENTES	78
5. 4. 4. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS EM RELAÇÃO À EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES	79
5. 5. CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA QSOX1, P53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 COM AS OUTRAS VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DO ESTUDO QUE (PESO TUMORAL, PRESENÇA DE ANAPLASIA E PRESENÇA DE QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE)	80
5. 5. 1. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS EM RELAÇÃO AO PESO TUMORAL	80
5. 5. 2. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS EM RELAÇÃO À ANAPLASIA	81
5. 5. 3. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS EM RELAÇÃO À QUIMIOTERAPIA PRÉ-OPERATÓRIA	82
5. 6. CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA QSOX1, P53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS TUMORAIS (BLASTEMA, EPITÉLIO E ESTROMA) COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA, CIENTES, ESTADIAMENTO E GRUPO DE RISCO DOS MESMOS E AS VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DO ESTUDO (PESO TUMORAL, PRESENÇA DE ANAPLASIA E PRESENÇA DE QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE)	83
5. 6. 1. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS EM RELAÇÃO AO GRUPO DE RISCO DOS PACIENTES	84
5. 6. 2. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS EM RELAÇÃO AO ESTADIAMENTO DOS PACIENTES.....	85
5. 6. 3. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS EM RELAÇÃO À EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES	87
5. 6. 4. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS EM RELAÇÃO À ANAPLASIA..	89
5. 6. 5. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS EM RELAÇÃO À QUIMIOTERAPIA PRÉ-OPERATÓRIA	90
6. DISCUSSÃO	92
6. 1. O ARRANJO TECIDUAL EM MATRIZ (TMA).....	92

6. 2. MÉTODO.....	93
6. 3. ASPECTOS CLÍNICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS.....	94
6. 4. QSOX1.....	99
6. 5. O WT1.....	100
6. 6. A PROTEÍNA p53	101
6. 7. A PROTEÍNA BCL-2	103
6. 8. A PROTEÍNA BAX	104
6. 9. O RECEPTOR VEGFR1	105
6. CONCLUSÃO	106
REFERÊNCIAS	108

1. INTRODUÇÃO

O tumor de Wilms ou nefroblastoma é uma neoplasia maligna embrionária derivada das células do blastema nefrogênico. É a neoplasia renal mais freqüente na infância e corresponde a 98% dos tumores renais nesta faixa etária (STILLER; PARKIN, 1990; BRESLOW *et al.*, 1993; STILLER; PARKIN, 1996). À microscopia o tumor de Wilms apresenta componentes histológicos semelhantes aos encontrados durante a nefrogênese, como blastema, epitélio e estroma, em proporções variadas.

Apesar do excelente prognóstico dos tumores de Wilms, uma significativa parcela dos pacientes apresenta recorrência da neoplasia e redução da sobrevida (REINHARD *et al.*, 2008). A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese do tumor de Wilms tem como um dos principais objetivos permitir a estratificação dos pacientes em grupos de risco que melhor reflitam o comportamento biológico da neoplasia e o desenvolvimento de terapias alvo (KALAPURAKAL *et al.*, 2004; GELLER, 2008; HUANG *et al.*, 2009).

Existem inúmeros biomarcadores descritos como importantes na patogênese do tumor de Wilms, entre eles as proteínas, p53, WT1, BCL-2, BAX e VEGFR1, todos implicados em proliferação e apoptose das células neoplásicas. Estes marcadores parecem ter um importante papel na patogênese e na progressão das células tumorais e, conseqüentemente, no prognóstico e na resposta terapêutica dos pacientes, isto é, no comportamento biológico destas neoplasias (WAGNER *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2009; ROYER-POKORA *et al.*, 2008; RUTESHOUSER; ROBINSON; HUFF, 2008; KRUSE; GU, 2009; GALONEK; HARDWICK, 2006; YIP; REED, 2008; GHANEM, 2001; SLOGO *et al.*, 2007).

Um biomarcador que foi recentemente descrito como implicado na patogênese, na progressão, no prognóstico e na resposta terapêutica de alguns tumores é a quiescina sulfidril oxidase (QSOX) (TURY *et al.*, 2005; WITTKE *et al.*, 2003; THORPE; COPPOCK, 2007). A família quiescina sulfidril oxidase (QSOX) parece atuar na remodelação dos componentes da matriz extracelular ou sinalização celular (HOOBER *et al.*, 1999; THORPE *et al.*, 2002; HECKLER *et al.*, 2008). Em humanos foram descritos dois genes para as enzimas QSOX. Estes genes são encontrados em cromossomos distintos e são denominados QSOX1 e QSOX2 ou QSOXN (COPPOCK *et al.*, 1993; THORPE *et al.*, 2002). A QSOX1 humana foi primeiramente identificada em fibroblastos pulmonares quiescentes e parece ter um

papel na maturação de componentes da matriz extracelular e no programa de quiescência reversível (COPPOCK *et al.*, 1993). A QSOXN, encontrada em neuroblastomas, está associada à resposta pró-apoptótica a agentes citostáticos (TURY *et al.*, 2005; WITTKKE *et al.*, 2003; THORPE; COPPOCK , 2007).

As tentativas de determinar o papel destes biomarcadores na patogênese, progressão, prognóstico e resposta terapêutica das neoplasias passam pela comparação da expressão dos mesmos com variáveis clínico-patológicas consagradas na literatura como determinantes do comportamento biológico destes tumores, isto é, determinantes do prognóstico e da evolução clínica dos pacientes. Ao longo das últimas décadas, grupos de estudo buscam identificar características clínico-patológicas com importância prognóstica, no tumor de Wilms, que facilitem a estratificação dos pacientes e permitam o emprego de terapias menos agressivas. As variáveis clínico-patológicas já identificadas por estes grupos e consagradas pela literatura, que melhor se correlacionam com o comportamento biológico e com a evolução clínica dos tumores de Wilms, são, principalmente, a idade, o grupo de risco e o estadiamento dos pacientes. Além disso, outros fatores têm sido considerados, como o aspecto histológico, o peso tumoral, a invasão vascular e a presença de metástases, sendo que vários destes últimos critérios já são direta ou indiretamente considerados quando identificamos o grupo de risco das lesões e o estadiamento dos pacientes (BRESLOW *et al.*, 1978; WEIRICH *et al.*, 2001).

Este estudo tem por objetivo principal avaliar a expressão imunohistoquímica do biomarcador conhecido como QSOX1, em amostras parafinadas de tumores de Wilms, bem como seu papel na patogênese, na progressão e no prognóstico destas lesões. Além disso, este estudo ainda pretende estudar a expressão imunohistoquímica de outros biomarcadores implicados na patogênese, na progressão tumoral e no prognóstico dos nefroblastomas (p53, WT1, BCL-2, BAX e VEGFR1). Para tanto, pretendemos correlacionar todos estes dados imunohistoquímicos às variáveis clínico-patológicas consagradas pela literatura como determinantes do comportamento biológico e da evolução clínica destas lesões do estudo.

A idéia de estudar a QSOX1 vem do fato de que esta proteína tem um papel importante na indução de apoptose em situações de estresse, na diferenciação celular de elementos mesenquimais em embriões e na maturação de elementos da matriz extracelular. Em vista disso, como o tumor de Wilms é composto de

elementos embrionários, entre eles blastema, túbulos e mesênquima, e como a maturação destes elementos pode estar relacionada com melhor prognóstico, hipotetizamos que a expressão de QSOX1 nestes tumores pode estar relacionada a um melhor comportamento biológico. Além disso, a expressão da QSOX1 poderia ter relação com a melhor resposta a quimioterapia devido ao seu papel na indução de apoptose em situações de estresse.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão imunoistoquímica tecidual da Quiescina/sulfidril oxidase 1 (QSOX1) em amostras parafinadas de tumores de Wilms através da técnica de imunoistoquímica, correlacionando-a com a evolução clínica dos pacientes e com as variáveis clínico-patológicas do estudo, além de correlacioná-la com a imunoeexpressão de outros biomarcadores envolvidos na progressão tumoral.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os dados clínico-patológicos da população do estudo.
2. Avaliar a expressão imunoistoquímica da QSOX1 em amostras parafinadas de tumor de Wilms, através do anticorpo anti-QSOX1.
3. Avaliar a expressão imunoistoquímica de outros biomarcadores de progressão tumoral tais como p53, WT1, BCL2, BAX e VEGFR1.
4. Avaliar se existe correlação entre a expressão imunoistoquímica média da QSOX1 e a expressão dos outros biomarcadores de progressão tumoral.
5. Avaliar se existe correlação entre a expressão imunoistoquímica média da QSOX1, evolução clínica dos pacientes e fatores prognósticos mais relevantes.
6. Avaliar se existe correlação entre a expressão imunoistoquímica da QSOX1 por componente histológico do tumor de Wilms, evolução clínica dos pacientes e fatores prognósticos mais relevantes.
7. Avaliar se existe correlação entre a expressão imunoistoquímica média dos outros biomarcadores de progressão tumoral, evolução clínica dos pacientes e fatores prognósticos mais relevantes.
8. Avaliar se existe correlação entre a expressão imunoistoquímica dos outros biomarcadores de progressão tumoral por componente histológico do tumor de Wilms, evolução clínica dos pacientes e fatores prognósticos mais relevantes.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. HISTÓRICO

Os primeiros relatos do nefroblastoma ou embrioma renal são de autoria de Hunter em 1793, seguido por Hance, em 1814 (BECKWITH *et al.*, 1996).

O nefroblastoma recebeu o epônimo de tumor de Wilms após a publicação da monografia intitulada “*Die Mischgeschwülte der Niere*” do cirurgião alemão Carl Max Wilhelm Wilms, em 1899, que reconheceu as similaridades entre o tecido embrionário renal e o nefroblastoma (WILMS, 1899).

Os primeiros grandes avanços no tratamento do tumor de Wilms surgiram nas décadas de 30 e 50, com o emprego da nefrectomia, radioterapia e quimioterapia no tratamento desta neoplasia (LEMERLE *et al.*, 1976; LEMERLE *et al.*, 1983).

Porém, nas últimas décadas a história do tumor de Wilms mudou drasticamente com a formação de grupos cooperativos internacionais na Europa, Estados Unidos e Canadá que se dedicam ao tratamento e pesquisa desta neoplasia. Estes grupos desenvolveram ao longo destes 40 anos avanços surpreendentes. A cada novo estudo, novos esquemas terapêuticos e drogas foram aplicados com o intuito de melhorar a sobrevida, reduzir os efeitos colaterais a curto e longo prazo, as recidivas, os danos psicossociais ao paciente e a sua família e os custos do tratamento médico. Concomitantemente aos avanços terapêuticos, conhecimentos da epidemiologia e dos aspectos clínicos e anatomopatológicos do tumor de Wilms passaram a ser estudados e difundidos.

Os resultados obtidos por estes grupos, em especial o norte americano, incentivaram a formação do Grupo Cooperativo Brasileiro para o Tratamento do Tumor de Wilms (GCBTTW), em 1986, fundado com o objetivo de estudar as características epidemiológicas e fatores prognósticos dos Tumores de Wilms na população brasileira (DE CAMARGO; FRANCO, 1994).

Entre os grupos cooperativos internacionais mais expressivos estão a *Société Internationale d’Oncologie Pédiatrique* (SIOP) composto por diversos países europeus, *National Wilms Tumor Study Group* (NWTSG) que envolve os Estados Unidos e Canadá, *United Kingdom Children’s Cancer Study Group* (UKCCSG),

German Pediatric Oncology (GPO) e *French Société d'Oncologie Pédiatrique (SFOP)* (KALAPURAKAL *et al.*, 2004).

3.2. EPIDEMIOLOGIA

O tumor de Wilms é a neoplasia renal mais comum na faixa etária pediátrica e corresponde a 5 a 7% dos cânceres pediátricos e a 98% dos cânceres renais em crianças (BRESLOW *et al.*, 1993; STILLER; PARKIN, 1996).

A incidência anual em caucasianos é de aproximadamente 6-9 casos por milhão de habitantes. Em algumas séries da África Subsaara e Nigéria a incidência de tumor de Wilms está acima de 10 casos por milhão, semelhante à encontrada para a população negra nos Estados Unidos. Já a menor incidência está na população da Ásia Oriental (STILLER; PARKIN, 1990). Esta notável diferença na incidência mundial do tumor de Wilms acompanha uma distribuição étnica (STILLER; PARKIN, 1996). O papel da geografia na distribuição dos casos sugere que os riscos ambientais exerçam menor influência sobre sua etiologia (BRESLOW *et al.*, 1993).

Dados coletados através de 14 centros de registro de câncer entre crianças e adolescentes no Brasil reportaram a maior incidência de tumores renais em Goiânia (15,32/ milhão). Entre estes 14 centros, Curitiba está em décimo primeiro lugar com 5,21 casos de tumores renais/ milhão (DE CAMARGO *et al.*, 2010).

A incidência entre os sexos é bastante variável (BRESLOW *et al.*, 1993). Alguns estudos mostram discreto predomínio no sexo feminino (BRESLOW *et al.*, 1993; BRESLOW *et al.*, 1988). A distribuição entre os sexos segundo dados do Grupo Cooperativo Brasileiro para o Tratamento do Tumor de Wilms para a população brasileira é semelhante ao encontrado no *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique* e *National Wilms Tumor Study Group* (razão M:F de 0,83) (PASTORE *et al.*, 1988; BRESLOW *et al.*, 1994).

A manifestação do tumor de Wilms ocorre em 80% dos casos antes dos cinco anos de idade (BRESLOW *et al.*, 1988). A idade média ao diagnóstico varia de 2,9 a 3,1 anos (WEIRICH *et al.*, 2004; BRESLOW *et al.*, 1993; REINHARD *et al.*, 2008). Alguns fatores parecem contribuir para a variação da idade ao diagnóstico. Entre

estes fatores estão: o sexo, a etnia e a lateralidade. Os pacientes do sexo masculino quando diagnosticados são de 6 a 10 meses mais jovens que pacientes do sexo feminino (FRANCO *et al.*, 1991; BRESLOW *et al.*, 1988). O diagnóstico na população asiática ocorre em faixa etária menor que em pacientes negros (BRESLOW *et al.*, 1993; BRESLOW *et al.*, 1988; BRESLOW *et al.*, 1994). Os tumores bilaterais são diagnosticados até um ano antes quando comparados aos tumores unilaterais ou multicêntricos e têm maior frequência de associação com anomalias congênitas (PASTORE *et al.*, 1988; BRESLOW *et al.*, 1988). Além da influência destes fatores sobre a idade ao diagnóstico, sabe-se que pacientes mais velhos são diagnosticados em estádios clínicos mais avançados (FRANCO *et al.*, 1991).

O tumor de Wilms está associado a anomalias congênitas, em especial a anomalias do trato genitourinário e hemihipertrofia (BRESLOW; BECKWITH, 1982). Há relatos de tumor de Wilms familiar em aproximadamente 1% dos casos (BRESLOW; BECKWITH, 1982).

3.3. PATOGÊNESE

O tumor de Wilms é um paradigma da heterogeneidade e complexidade genética (RUTESHOUSER; ROBINSON; HUFF, 2008). Há a identificação de pelo menos dez genes envolvidos em sua patogênese. Muitos dos quais estão associados a síndromes genéticas (BRESLOW *et al.*, 2006). Acreditava-se que a genética do tumor de Wilms seria semelhante a do retinoblastoma e seguiria o modelo proposto por Knudson e Strong (1972) de mutação em duas etapas. Nos casos de retinoblastoma, 10% dos pacientes com tumores esporádicos unilaterais e todos os pacientes com tumores bilaterais carregam mutações germinativas e a tumorigênese está associada a um segundo evento. O primeiro evento pode ser constitucional, uma mutação germinativa nova de origem paterna ou transmitida por um genitor que carrega a mutação ou uma mutação somática, que resultam na perda de função de um dos alelos do gene do retinoblastoma. Caso a função do alelo remanescente seja perdida, o produto do gene do retinoblastoma estará ausente nas células retinianas (KNUDSON; STRONG, 1972; BRESLOW;

BECKWITH, 1982; GREEN *et al.*, 1996). Algumas características fundamentam a hipótese de mutação em duas etapas na etiologia do tumor de Wilms como a idade precoce ao diagnóstico, a associação com anomalias congênitas e tumores bilaterais e restos nefrogênicos. Porém, outros achados contradizem a participação deste modelo na genética do tumor de Wilms. (BRESLOW; BECKWITH, 1982; RITCHEY *et al.*, 2005).

A maioria das neoplasias embrionárias, como por exemplo, o sarcoma de Ewing/PNET e retinoblastoma, é composta por um único tipo celular e em geral, há uma única alteração genética. Os tumores de Wilms, por sua vez, são distinguidos por sua estrutura complexa que reflete os inúmeros eventos genéticos coordenados que participam da nefrogênese (BECKWITH, 1998). Semelhante ao encontrado em outros tumores, o tumor de Wilms também é caracterizado por alterações em genes que regulam o crescimento, diferenciação e proliferação celular (DOME; COPPES, 2002).

A primeira evidência de que loci cromossômicos específicos estão associados com tumores de Wilms foi a identificação de deleções intersticiais no 11p13 em pacientes com tumor de Wilms e com síndrome de Denys-Drash. Este gene denominado de *gene do tumor de Wilms 1 (WT1)* foi isolado e seqüenciado (GREEN *et al.*, 1996). O segundo locus identificado está localizado no cromossomo 11p15.5, denominado *gene do tumor de Wilms 2 (WT2)*. Alterações cromossômicas neste locus são descritas em pacientes com síndrome de Beckwith-Weidemann (GREEN *et al.*, 1996).

Outros dois genes, *WTX (gene do tumor de Wilms no X)* e *CTNNB1*, parecem estar envolvidos na patogênese do tumor de Wilms. O *CTNNB1*, que codifica a β -catenina, apresenta mutações em aproximadamente 15% dos tumores de Wilms e, em geral, está acompanhado de mutações do *WT1*. Enquanto o *WTX* encontrado em 11% a 29% dos casos ocorre com ou sem mutações do *WT1*. Aproximadamente um terço dos tumores de Wilms carrega mutações do *WT1*, *CTNNB1* e/ou *WTX* (RUTESHOUSER; ROBINSON; HUFF, 2008). Uma das hipóteses para a tumorigênese do tumor de Wilms sugere que a inativação da via Wnt através da mutação do *CTNNB1*, *WTX* ou outro componente da via Wnt, como *WT1* é necessária para desencadear o processo (RUTESHOUSER; ROBINSON; HUFF, 2008).

A β -catenina é uma proteína de adesão com papel central na via Wnt, crítica para o desenvolvimento de uma série de neoplasias. Na ausência da via Wnt, a β -catenina é fosforilada e degradada pela via ubiquitina-proteossomo. As mutações e deleções da β -catenina resultam no acúmulo da proteína e aumento da disponibilidade de β -catenina para ativar os genes alvo. Muitos estudos têm relatado as mutações da β -catenina em tumores de Wilms (DOME; COPPES, 2002).

A predisposição familiar para tumor de Wilms é rara e afeta apenas 1 a 2% dos pacientes com tumor de Wilms. Mutações do *WT1* foram encontradas em pequeno número de famílias com esta neoplasia (DOME; COPPES, 2002). Há relatos de dois genes relacionados aos casos familiares de tumor de Wilms: o *FWT1*, localizado no cromossomo 17q12-21, e o *FWT2*, localizado no cromossomo 19q13 (RAPLEY *et al.*, 2000). Porém, em alguns casos de tumor de Wilms familiar não se observou correlação com *WT1*, *FWT1* ou *FWT2*, sugerindo que outros genes participem da susceptibilidade em casos de tumor de Wilms familiares (DOME; COPPES, 2002).

Mutações no *gene supressor tumoral p53*, localizado no cromossomo 17p, também são relatadas especificamente nas áreas de anaplasia. A aquisição de mutações restritas às áreas de anaplasia sugere que estas mutações estariam relacionadas ao processo de progressão para anaplasia (DOME; COPPES, 2002).

Análises citogenéticas têm revelado anormalidades cromossômicas recorrentes em tumores de Wilms. Entre as alterações encontradas, 14,6% dos tumores de Wilms com histologia favorável apresentam perda da heterozigose do cromossomo 16q, 10,3% perda da heterozigose do cromossomo 1p e 2,6% perda da heterozigose do 16q e 1p. O *United Kingdom Children's Cancer Study Group- 3* e o *National Wilms Tumor Study- 5* relataram a alta prevalência da perda da heterozigose do 16q, principalmente em tumores com anaplasia, sugerindo o envolvimento do 16q na tumorigênese do tumor de Wilms (GRUNDY *et al.*, 2005; MESSAHEL *et al.*, 2009). A correlação entre perda da heterozigose do 16q e anaplasia difusa também foi relatada em pacientes tratados segundo a *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique* (WITTMANN *et al.*, 2007).

A perda da heterozigose do 16q e 1p se correlaciona a um pior prognóstico, ao estágio tumoral e a histologia (DOME; COPPES, 2002). Os efeitos da função destes genes sobre a sobrevida em pacientes estádios I e II, tratados menos intensamente pelo *National Wilms Tumor Study- 5*, sugerem que estes genes atuem

sobre a habilidade das células tumorais em tolerar os agentes quimioterápicos ou a radioterapia (GRUNDY *et al.*, 2005). A importância de tal anormalidade cromossômica está relacionada ao fato de que pacientes com perda da heterozigose do 16q e 1p e redução significativa da sobrevida livre de doença podem ser beneficiados com a intensificação do tratamento quimioterápico (GRUNDY *et al.*, 2005).

Wittmann *et al.*(2007) relataram a coexistência da perda da heterozigose do 16q e 11q em 50% dos casos de tumor de Wilms, sugerindo a ligação destas duas regiões e inter-relação no desenvolvimento de certos tipos de tumor de Wilms.

Recentemente, foram identificados dois grupos distintos de tumores de Wilms com histologia favorável em pacientes enquadrados no estágio I, idade inferior a 24 meses e peso tumoral inferior a 550g designados tumores de Wilms de muito baixo risco. O primeiro grupo é constituído por tumores epiteliais tubulares diferenciados que não estão associados à perda da heterozigose do 1p, 16q e 11p e evoluem sem recaída tumoral. O segundo grupo, composto por tumores mistos, estão associados à redução da expressão de WT1 e a recaída tumoral (SREDNI *et al.*, 2009).

Os estudos baseados em expressão gênica demonstraram alterações em tumores de Wilms que incluem o *gene da telomerase*, *TRKB*, *VEGF*, *survivina*, *fas* e *INK4* (DOME; COPPES, 2002; MESSAHEL *et al.*, 2009). A supregulação dos genes *SMPDL3* e *IL11RA* e infraregulação do gene *POSTN* são descritas em pacientes com recidiva tumoral. Já os genes *C/EBPB*, *p21*, *H4FG* e *CLK1* podem identificar tumores com capacidade de recidiva (HUANG *et al.*, 2009).

Em pacientes em estágio III com histologia favorável e recidiva tumoral tratados segundo o *National Wilms Tumor Study- 5*, observou-se a infraregulação do *gene PEG3* que é induzido após o dano do DNA por um mecanismo dependente de p53 e contribui para a translocação do BAX. *DIABLO*, gene que contribui para a ativação da via das caspases, também está infraregulado nestes casos. *SMYD2* são metiltransferases supreguladas em tumores de Wilms é supressor da ação pró-apoptótica do p53. A atuação dos genes *DIABLO*, *PEG3* e *SMYD2* sobre a via p53/BAX sugere a importância da via apoptótica na recidiva tumoral (HUANG *et al.*, 2009). Outros marcadores da via apoptótica como *BCL-2* e *CD40* também estão supreguladas em tumores de Wilms com recidiva (HUANG *et al.*, 2009).

3.4. APRESENTAÇÃO CLÍNICA E ANOMALIAS CONGÊNITAS ASSOCIADAS

O sintoma inicial mais comum em pacientes com tumor de Wilms é massa abdominal e aumento do volume abdominal com frequência relatado pelos pais. Sintomas como dor abdominal, anorexia, vômito ou uma combinação destes sintomas estão presentes em um terço dos pacientes (GREEN *et al.*, 1996; KALAPURAKAL *et al.*, 2004). Apresentação clínica aguda com necessidade de cirurgia de emergência, hematúria macroscópica e hipertensão também são relatadas (LEMERLE *et al.*, 1976).

Há uma grande variedade de síndromes genéticas e anormalidades cromossômicas associadas ao tumor de Wilms. Esta variabilidade genética reflete a diversidade molecular envolvida na tumorigênese do tumor de Wilms (SCOTT *et al.*, 2006). Os tumores de Wilms bilaterais estão presentes com maior frequência em pacientes portadores de anormalidades genéticas (NG *et al.*, 2007).

Estas condições podem ser divididas conforme o risco de desenvolver tumor de Wilms em alto risco (> 20%), risco moderado (5-20%) e baixo risco (< 5%) (SCOTT *et al.*, 2006). Estas condições podem ser divididas em quatro grupos: desordens associadas a genes no cromossomo 11p13, tumor de Wilms familiar, síndromes de supercrescimento e defeitos no reparo do DNA, como descritos no QUADRO 1 (SCOTT *et al.*, 2006; NG *et al.*, 2007).

QUADRO 1 – CONDIÇÕES COM RISCO AUMENTADO DE TUMOR DE WILMS

ALTO RISCO (> 20%)
<ul style="list-style-type: none"> • Deleções do WT1 (incluindo síndrome WARG) • Mutações missense do WT1 (incluindo síndrome Dennys-Drash) • Tumor de Wilms familiar • Síndrome de Perlman • Aneuploidia variegada em mosaico • Anemia de Fanconi/ Mutações bialélicas do BRCA2
RISCO MODERADO (5 – 20%)
<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de Frasier (mutação splice WT1 no intron 9) • Síndrome de Beckwith-Wiedemann • Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel
BAIXO RISCO (< 5%)
<ul style="list-style-type: none"> • Hemihipertrofia isolada* • Síndrome de Bloom • Síndrome de Li-Fraumeni/ Síndrome de Li-Fraumeni símile • Síndrome do hiperparatireoidismo hereditário – tumor maxilar • Nanismo Mulibrey • Trissomia do 18 • Trissomia do 13 • Deleções do 2q37

FONTE: SCOTT *et al.* (2006).

LEGENDA: * Pacientes com hemihipertrofia causada por dissomia uniparental do 11p15 ou metilação isolada H19 são risco moderado para tumor de Wilms.

Entre as síndromes mais comumente relatadas em associação ao tumor de Wilms estão a síndrome WAGR, síndrome de Denys-Drash e síndrome de Beckwith-Wiedemann. A síndrome WAGR (Wilms – aniridia – genitourinário – retardo mental) é caracterizada por aniridia parcial ou completa, genitália externa ambígua e criptorquidismo no sexo masculino e retardo mental (SCOTT *et al.*, 2006).

Por sua vez, a síndrome de Denys-Drash caracteriza-se pela tríade composta por nefropatia, tumor de Wilms e anormalidades genitourinárias. A síndrome de Beckwith-Wiedemann é caracterizada por macroglossia, macrossomia e anormalidades da parede abdominal (SCOTT *et al.*, 2006)

Ng *et al.* (2007) relataram anormalidades ao exame clínico em 45% dos pacientes com tumor de Wilms e salientaram a importância de relatar a associação de malformações congênicas e consanguinidade nestes pacientes.

Outras anomalias congênicas são relatadas no *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique* e *National Wilms Tumor Study*, como as malformações do sistema nervoso central e sistema urinário, aniridia, criptorquidismo, hipospadia e hemihipertrofia (BRESLOW; BECKWITH, 1982; PASTORE *et al.*, 1988).

3.5. ANATOMIA PATOLÓGICA

3.5.1. MACROSCOPIA

A macroscopia o tumor de Wilms geralmente é caracterizado por massa única, arredondada, de tamanho variável, bem delimitada do tecido renal adjacente por pseudocápsula. Aos cortes, a superfície da lesão é uniforme, branco-acinzentada e de consistência macia (FIGURA 1). A lesão com freqüência é subdividida por septos proeminentes, conferindo aspecto lobulado à macroscopia. Espaços císticos, hemorragia e necrose podem estar presentes. Os tumores podem ser multicêntricos e bilaterais (BECKWITH, 1998).

FIGURA 1 - MACROSCOPIA DO TUMOR DE WILMS

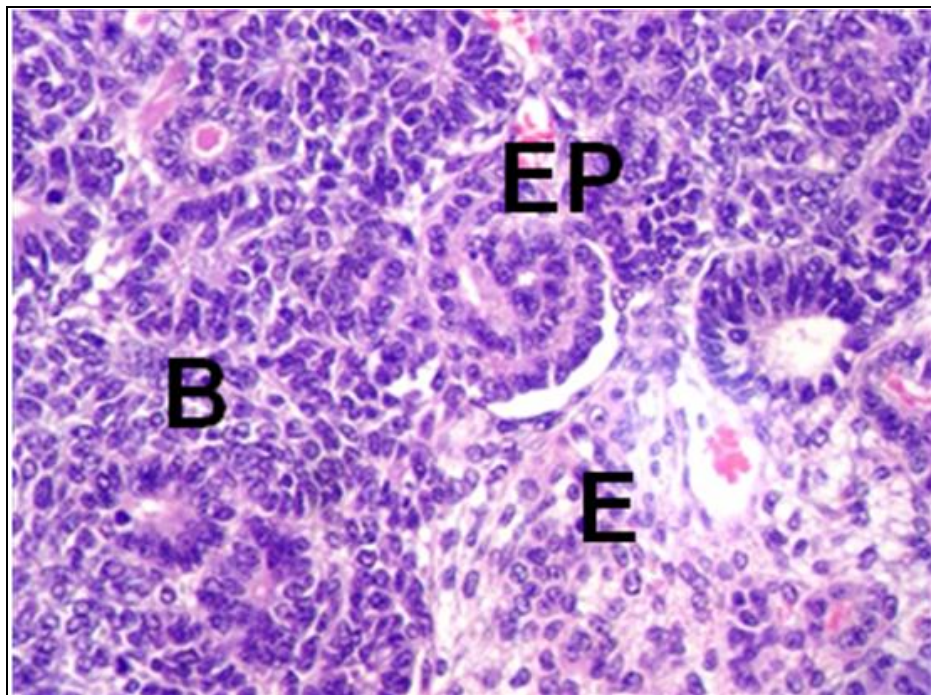


FONTE: GILBERT-BARNESS *et al.* (2007).

3.5.2. MICROSCOPIA

Um único tumor de Wilms pode expressar todo o espectro de diferenciação nefrogênica, do blastema primitivo a células epiteliais e estromais semelhantes ao rim maduro (BECKWITH, 1998). Os tumores de Wilms em geral são trifásicos, compostos por uma mistura de células indiferenciadas do blastema e elementos diferenciados como epitélio e estroma e podem exibir uma diversidade de graus de diferenciação (FIGURA 2) (BRESLOW; BECKWITH, 1982; BECKWITH, 1983; SCHUMACHER *et al.*, 2003).

FIGURA 2 – HISTOLOGIA DO TUMOR DE WILMS

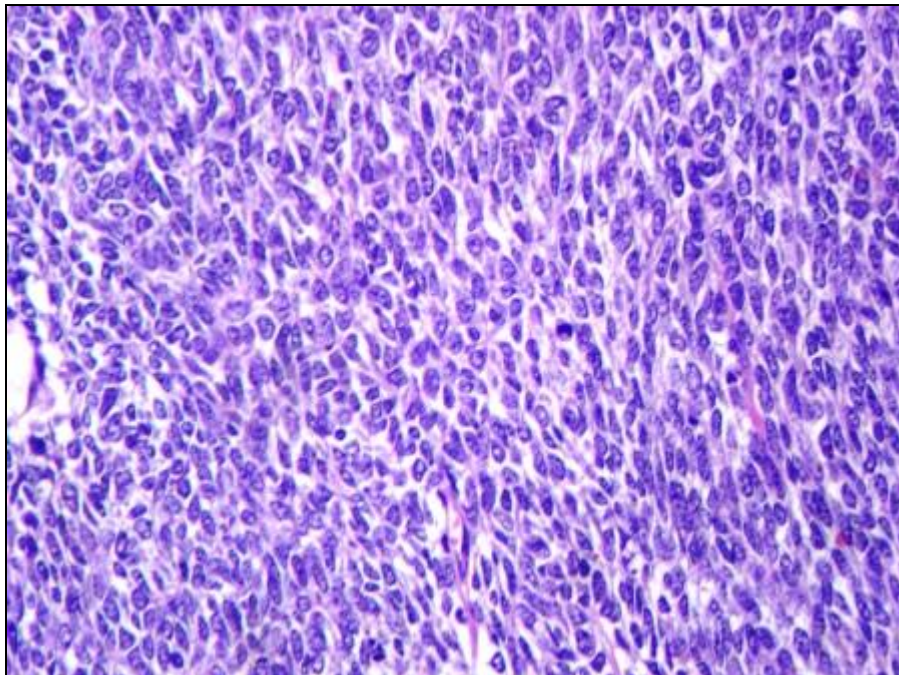


NOTA: Nefroblastoma misto composto por blastema (B), epitélio (EP) e estroma (E).

FONTE: o autor (Hematoxilina-eosina, 400x).

As células que compõem o blastema são pequenas, variam de ovais a redondas, têm citoplasma escasso e formam ninhos ou lençóis celulares (FUKUZAWA *et al.*, 2004; RIVERA; HABER, 2005). Tumores de Wilms monofásicos com predomínio do componente blastematoso costumam ser invasivos, são diagnosticados em estádios mais avançados e seu aspecto histológico dificulta o diagnóstico diferencial com outros tumores de células pequenas azuis e redondas, como tumor primitivo neuroectodérmico, neuroblastoma e linfoma (FIGURA 3) (KALAPURAKAL *et al.*, 2004).

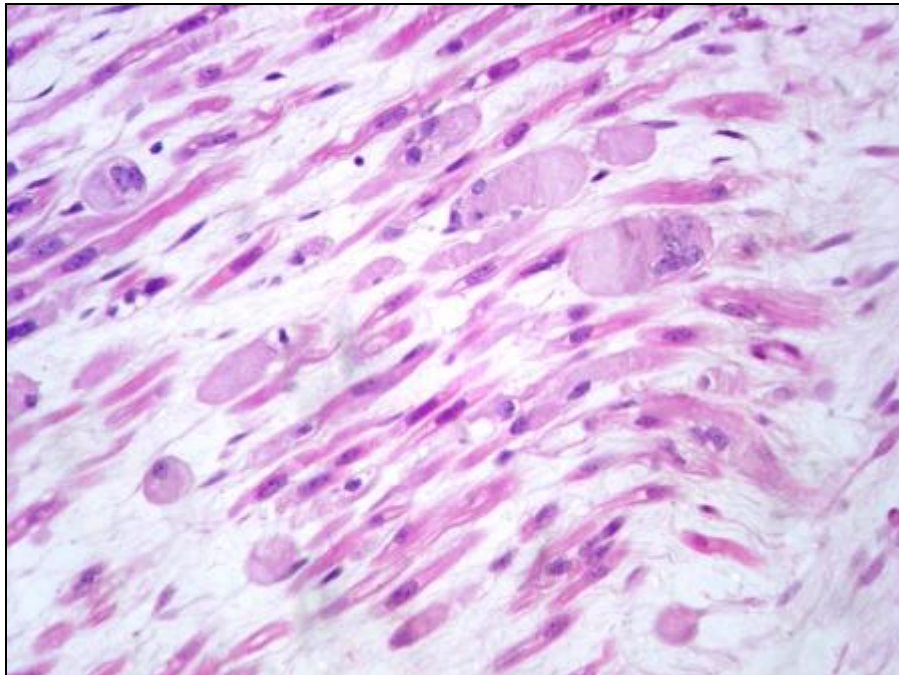
FIGURA 3 – COMPONENTE BLASTEMATOSO DO TUMOR DE WILMS



FONTE: o autor (Hematoxilina-eosina, 400x).

O componente estromal é formado por células semelhantes a fibroblastos e pode apresentar áreas mixóides, fusocelulares, células musculares esqueléticas, musculares lisas ou elementos neurais (LEMERLE *et al.*, 1976; FUKUZAWA *et al.*, 2004; RIVERA; HABER, 2005). Os tumores de Wilms com predomínio do componente estromal que mostram diferenciação rabdomioblástica estão mais associados a mutações do WT1 (WEIRICH *et al.*, 2001; KALAPURAKAL *et al.*, 2004). A presença de estroma na histologia pode mimetizar o sarcoma de células claras, o nefroma mesoblástico congênito ou sarcoma sinovial (KALAPURAKAL *et al.*, 2004). Componentes heterólogos como músculo liso, cartilagem, osso e tecido adiposo podem ser encontrados em aproximadamente 10% dos casos (FIGURA 4) (SCHUMACHER *et al.*, 2003).

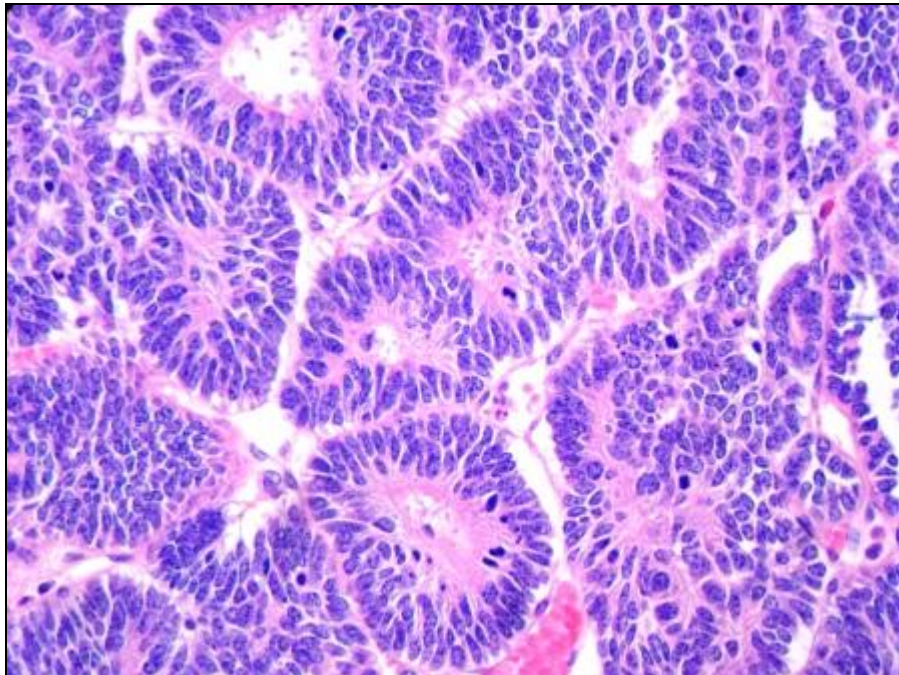
FIGURA 4 – DIFERENCIAÇÃO RABDOMIOBLÁSTICA DO COMPONENTE ESTROMAL DO TUMOR DE WILMS



FONTE: o autor (Hematoxilina-eosina, 400x).

O componente epitelial pode apresentar um espectro de estruturas que recapitulam a nefrogênese, como túbulos, estruturas com arranjo glandular pouco definido e estruturas glomerulares ao redor de pequenas alças capilares (FIGURA 5) (LEMERLE *et al.*, 1976; FUKUZAWA *et al.*, 2004; RIVERA; HABER, 2005).

FIGURA 5 – COMPONENTE EPITELIAL DO TUMOR DE WILMS



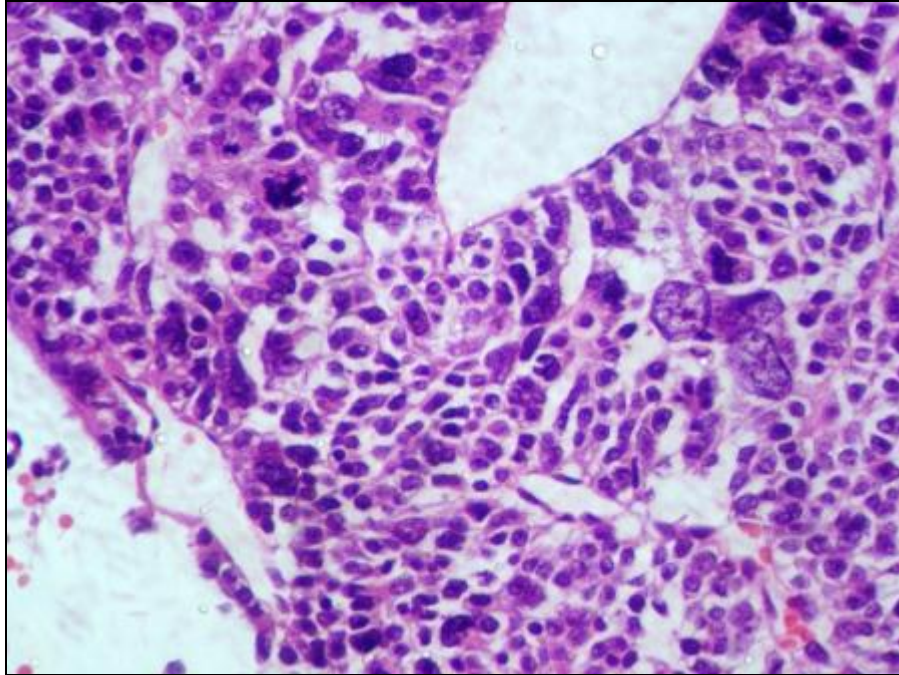
FONTE: o autor (Hematoxilina-eosina, 400x).

Em estudo dirigido pelo *National Wilms Tumor Study*, Beckwith e Palmer (1978) observaram a associação de anaplasia em tumores de Wilms com pior prognóstico. Estes autores sugeriram a classificação dos tumores em histologia desfavorável e favorável, se anaplasia presente ou ausente, respectivamente, e definiram anaplasia em tumores de Wilms através de três características histológicas: **(a)** presença de mitoses atípicas hiperdiploides, **(b)** aumento nuclear de pelo menos três vezes o tamanho dos núcleos de células adjacentes do mesmo tipo e **(c)** marcada hiper cromasia (FIGURA 6) (BECKWITH; PALMER, 1978). A anaplasia, presente em 5 a 10,1% dos tumores de Wilms, é um marcador de resistência a quimioterapia, associada à disseminação regional, óbito e recaídas,

mas não se correlaciona à agressividade tumoral. Há algumas evidências que corroboram esta observação, tais como: **(a)** pacientes portadores de tumores com anaplasia localizada, mas totalmente ressecados apresentam melhor sobrevida; **(b)** tumores de Wilms extrarenais com anaplasia estão associados a pior prognóstico; **(c)** a anaplasia presente em células invasivas do blastema está associada a pior prognóstico; **(d)** a anaplasia persiste após quimioterapia pré-operatória; e **(e)** não há correlação entre estádios mais avançados e anaplasia (BONADIO *et al.*, 1985; BECKWITH *et al.*, 1996; FARIA *et al.*, 1996; VUJANIĆ *et al.*, 1999; WEIRICH *et al.*; 2004; DOME *et al.*, 2006). Porém, segundo resultados obtidos com o *National Wilms Tumor Study- 5*, tumores de Wilms com anaplasia em estágio I têm taxas de recorrência e óbito superiores a tumores com o mesmo estágio sem anaplasia (DOME *et al.*, 2006). Tumores com anaplasia são mais comuns em pacientes acima dos três anos de idade, em pacientes do sexo feminino e afro-americanos (BONADIO *et al.*, 1985; DOME *et al.*, 2006). Além disso, a anaplasia pode ser classificada como: **(a)** focal, a qual é caracterizada por focos de anaplasia restrita ao tumor primário, circundados por parênquima renal, sem se estender além deste, inexistindo em metástases ou margem de ressecção e; **(b)** difusa, quando um ou mais dos seguintes critérios devem estar presentes no espécime: **(b1)** alterações anaplásicas no tumor primário menos restritas do que para a definição de anaplasia focal; **(b2)** células tumorais com anaplasia presentes em vasos intra ou extrarenais, seio renal, locais de invasão extrarenal ou em metástases; **(b3)** anaplasia focal que apresenta atipias nucleares em qualquer parte do tumor; **(b4)** presença de anaplasia em produtos de biópsia ou ressecção tumoral incompleta; **(b5)** anaplasia encontrada em mais de uma seção de diferentes áreas do espécime cirúrgico (FARIA *et al.*, 1996). Tumores de Wilms com anaplasia difusa estão relacionados a pior prognóstico, principalmente nos estádios II-IV (BECKWITH *et al.*, 1996). Enquanto isso, a anaplasia focal apresenta resultados controversos na literatura. Alguns estudos correlacionam a anaplasia focal a um prognóstico semelhante àquele dos tumores sem anaplasia, enquanto outros estudos não confirmam tal fato (FARIAS *et al.*, 1996; WEIRICH *et al.*; 2004; DOME *et al.*, 2006). No *National Wilms Tumor Study- 5*, tumores de Wilms unilaterais com anaplasia correspondiam a 18,6% dos tumores submetidos à quimioterapia pré-operatória e a 8,7% dos tumores submetidos à nefrectomia inicial, sem diferenças na evolução clínica entre os dois grupos (DOME *et al.*, 2006). Mutações do p53 são encontradas em

aproximadamente 75% dos tumores de Wilms com anaplasia. Alterações em outras moléculas da via do p53 também são encontradas (DOME *et al.*, 2006).

FIGURA 6 – TUMOR DE WILMS COM ANAPLASIA



FONTE: o autor (Hematoxilina-eosina, 400x).

3.6. SEQUELAS DO TRATAMENTO

O tratamento radioterápico e quimioterápico a que são submetidos os pacientes com tumor de Wilms podem causar efeitos secundários a outros órgãos e segunda neoplasia (GREEN *et al.*, 1996).

Em um estudo conduzido pelo *National Wilms Tumor Study* entre 1969 e 1995, a maioria dos óbitos em pacientes com menos de cinco anos de seguimento foram decorrentes da progressão da doença ou de efeitos agudos do tratamento (COTTON *et al.*, 2009). Entre as causas de óbito por efeitos tardios em pacientes com tumor de Wilms estão a segunda neoplasia, a insuficiência cardíaca congestiva, a doença renal terminal e as complicações pulmonares (COTTON *et al.*, 2009).

As complicações da quimioterapia relatadas são a neutropenia febril, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, doença veno-oclusiva hepática, toxicidade hepática e renal (CAPRA *et al.*, 1999; WEIRICH *et al.*; 2004; MITCHELL *et al.*,

2006). A cardiotoxicidade é efeito conhecido dos antracíclicos. Os antracíclicos são cardiotoxícos com potencial dano ao cardiomiócito resultando na progressão de casos assintomáticos para insuficiência cardíaca e arritmias (MARX *et al.*, 2002). Nos estudos *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique 09/GPOH* e *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique 93-01/GPOH* 2,5% dos pacientes apresentavam redução da contratilidade do ventrículo esquerdo e 5,6% alterações eletrocardiográficas 2,9 anos após o término da terapia (MARX *et al.*, 2002).

As complicações da radioterapia incluem escoliose, assimetria, atrofia e alterações endócrinas (CAPRA *et al.*, 1999; WEIRICH *et al.*; 2004). Hipoplasia mamária ocorre em pacientes submetidas à radioterapia torácica por metástases pulmonares (EHRLICH *et al.*, 2006).

Entre os efeitos colaterais secundários a quimioterapia e a radioterapia, o mais grave é a segunda neoplasia. Observa-se risco aumentado para o desenvolvimento de segundas neoplasias sólidas e leucemias relacionadas respectivamente ao campo irradiado e à dose do tratamento radioterápico e a quimioterapia com agentes alquilantes e epipodofilotoxinas (BRESLOW *et al.*, 1995; SHEARER *et al.*, 2001; TAYLOR *et al.*, 2008; NOURKAMI *et al.*, 2009).

É provável que pacientes que receberam os esquemas terapêuticos recentes apresentem risco de mortalidade por efeitos tardios do tratamento e segunda neoplasia reduzidos devido à otimização dos tratamentos quimio e radioterápicos. Os pacientes com tumor de Wilms têm sobrevida superior quando comparados a outras neoplasias da infância, mas o risco de óbito tardio em decorrência de efeitos tardios permanecem elevados 20 anos após o diagnóstico (COTTON *et al.*, 2009).

3.7. RECORRÊNCIA TUMORAL

Apesar da abordagem clínica para estratificação dos pacientes, 10 a 15% dos casos podem recorrer. Aproximadamente 20% dos pacientes nos estádios I e II, recorrem localmente (REINHARD *et al.*, 2008). As recorrências em tumores com histologia favorável estão relacionadas à invasão tumoral (invasão angiolímfática e crescimento tumoral a distância) e a resposta da doença residual a terapia (HUANG *et al.*, 2009; MESSAHEL *et al.*, 2009).

Os pacientes com recidivas são mais velhos, têm estágio clínico mais avançado, maior proporção de metástases à distância e tumores de alto risco (BRESLOW *et al.*, 1985; PRITCHARD-JONES *et al.*, 2003; REINHARD *et al.*, 2008). A correlação entre sexo, etnia e recorrências não foi comprovada estatisticamente (BRESLOW *et al.*, 1978).

3.8. FATORES PROGNÓSTICOS

Características clínico-patológicas têm sido estudadas com o objetivo de identificar variáveis de importância prognóstica e terapêutica, que contribuam para melhorar a estratificação dos pacientes em grupos de risco, permitindo tratamentos menos intensos.

Entre as inúmeras variáveis clínico-patológicas já estudadas, as que melhor se correlacionam com o prognóstico estão: a idade dos pacientes, o grupo de risco e o estadiamento dos mesmos; além de alguns aspectos histológicos, do peso tumoral, da invasão vascular e das metástases (BRESLOW *et al.*, 1978; WEIRICH *et al.*, 2001).

3. 8. 1. IDADE

Os estudos conduzidos têm demonstrado a relação entre o prognóstico e a idade ao diagnóstico em pacientes com tumor de Wilms. Observou-se no *National Wilms Tumor Study- 1* que pacientes com idade inferior a 2 anos tinham menor número de recidivas, principalmente a distância (BRESLOW *et al.*, 1978). Enquanto no *National Wilms Tumor Study- 2*, os resultados indicaram que o pior prognóstico em pacientes com mais de 2 anos refletia a associação com outras variáveis de pior prognóstico, como invasão da veia renal, disseminação abdominal, rotura tumoral e histologia (BRESLOW *et al.*, 1985). A análise dos dados do *National Wilms Tumor Study- 3* mostrou correlação entre idade superior a 2 anos e recorrência e óbito pela neoplasia (BRESLOW *et al.*, 1991).

O melhor prognóstico em pacientes menores de 2 anos está associado a presença de outras variáveis que predizem melhor prognóstico como histologia favorável e extensão da doença (BRESLOW *et al.*, 1978; BRESLOW *et al.*, 1985).

No estudo subsequente, *National Wilms Tumor Study- 4*, pacientes com idade inferior a 2 anos e peso tumoral inferior a 550g apresentaram diagnóstico favorável pela ausência de variáveis de microestadiamento (GREEN *et al.*, 1994). A partir destes achados, sugeriu-se que apenas a nefrectomia seria o suficiente para tratar este grupo de pacientes (GREEN *et al.*, 1994). Porém, no *National Wilms Tumor Study- 5* este grupo denominado de muito baixo risco, com estágio I, histologia favorável, idade inferior a 2 anos e peso tumoral inferior a 550g, após tratamento exclusivo com nefrectomia, recorreram em aproximadamente 10% dos casos (GREEN *et al.*, 2001). Inicialmente este protocolo de pesquisa foi fechado, mas com as taxas de sucesso obtidas com as terapias de resgate, os novos protocolos incluem como opção o tratamento cirúrgico exclusivo para os pacientes de muito baixo risco (SREDNI *et al.*, 2009).

Resultados semelhantes foram obtidos pelos grupos europeus que seguiram o protocolo da *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique- 9*. Pacientes com idade inferior a 2 anos, tumores pequenos e estágio I evoluíram com melhor prognóstico (PRITCHARD-JONES *et al.*, 2003; WEIRICH *et al.*, 2004).

3. 8. 2. GRUPO DE RISCO

Um dos grandes desafios dos patologistas é o correto diagnóstico histológico dos espécimes cirúrgicos que indicam o tipo de terapêutica a ser adotada (DE KRAKER *et al.*, 1999). Além da precisa avaliação dos componentes histológicos e extensão da neoplasia, o patologista diante de um caso de tumor de Wilms deve estar atento para as alterações secundárias à quimioterapia. Os dois grandes grupos de estudos em tumor de Wilms, *National Wilms Tumor Study* e *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique*, baseiam-se em critérios diagnósticos diferentes, pois preconizam abordagens terapêuticas diferentes. Os resultados dos estudos dirigidos pelo *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique* em tumores com alterações secundárias a quimioterapia pré-operatória permitiram a subclassificação destes

tumores em três grupos de risco: baixo risco, risco intermediário e alto risco como detalhado nos QUADROS 2 e 3 (VUJANIĆ *et al.*, 2002; VUJANIĆ *et al.*, 2009). A *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique Working Classification of Renal Tumors*, revisada em 2001, é a classificação atual da *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique*, utilizada pelo grupo brasileiro, e enfatiza a classificação em grupos de risco de acordo com o subtipo histológico (BOCCON-GIBOD *et al.*, 2000; VUJANIĆ *et al.*, 2009). Ao efetuar a análise histológica dos espécimes, deve-se atentar à proporção de necrose e/ou alterações regressivas causadas pela quimioterapia. Se ao avaliar um espécime, áreas de necrose e/ou alterações regressivas corresponderem à totalidade do tumor, confirmada após minuciosa avaliação macro e microscópica de diferentes áreas do tumor, este deve receber o nome de tumor de Wilms completamente necrótico. Nos casos em que as alterações regressivas perfazem mais de 2/3 da massa tumoral, o tumor deve ser denominado do tipo regressivo. Os tumores com pelo menos um terço de sua massa tumoral viável são subclassificados com base no componente viável (VUJANIĆ *et al.*, 2002).

**QUADRO 2 – SOCIÉTÉ INTERNATIONALE D'ONCOLOGIE PÉDIATRIQUE
WORKING CLASSIFICATION OF RENAL TUMORS**

I. TUMORES DE BAIXO RISCO
Nefroma mesoblástico Nefroblastoma diferenciado parcialmente cístico Nefroblastoma completamente necrótico
II. TUMORES DE RISCO INTERMEDIÁRIO
Nefroblastoma tipo epitelial Nefroblastoma tipo estromal Nefroblastoma tipo misto Nefroblastoma tipo regressivo Nefroblastoma tipo anaplasia focal
III. TUMORES DE ALTO RISCO
Nefroblastoma tipo blastematoso Nefroblastoma tipo anaplasia difusa Sarcoma de células claras renal Tumor rabdóide renal

FONTE: BOCCON-GIBOD *et al.* (2000).

QUADRO 3 – CRITÉRIOS HISTOLÓGICOS PARA SUBCLASSIFICAR TUMORES DE WILMS SEGUNDO SOCIÉTÉ INTERNATIONALE D'ONCOLOGIE PÉDIATRIQUE 2001

Tipo do tumor	Achados histológicos (% do tumor)			
	AIQ	Epitélio	Estroma	Blastema
Completamente necrótico	100%	0	0	0
Regressivo	> 66%	0 – 33%	0 – 33%	0 – 33%
Misto	< 66%	0 – 65%	0 – 65%	0 – 65%
Epitelial	< 66%	66 – 100%	0 – 33%	0 – 10%
Estromal	< 66%	0 – 33%	66 – 100%	0 – 10%
Blastematoso	< 66%	0 – 33%	0 – 33%	66 – 100%

FONTE: BOCCON-GIBOD *et al.* (2000).

NOTA: AIQ – alterações induzidas pela quimioterapia

O nefroblastoma tipo blastematoso é considerado como de alto risco, quando diagnosticado após quimioterapia, pois apresenta pior prognóstico quando comparado aos demais subtipos de risco intermediário (VUJANIĆ *et al.*, 2002).

O emprego da quimioterapia pré-operatória em tumores de Wilms estimulou a investigação das alterações sofridas pelo tumor em decorrência do efeito quimioterápico. Comparando-se a proporção de blastema em biópsias pré-operatórias e em espécimes cirúrgicos, observou-se a redução de nódulos blastematosos, que sofrem necrose ou maturação, frequentemente para estruturas rabdomiomatosas. A *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique 9/GPOH* demonstrou que a quimioterapia pré-operatória destrói o componente blastematoso e a resposta do blastema a quimioterapia está claramente associada à recorrência (BOCCON-GIBOD, 1998; BOCCON-GIBOD *et al.*, 2000). O crescente número de tumores do tipo estromal quando comparados aos tumores provenientes de nefrectomia inicial, sugerem que a quimioterapia pré-operatória induza alterações de maturação como as observadas no rabdomiossarcoma. Além disso, houve uma redução no número de tumores mistos, sugerindo que muitos destes tumores tenham se tornado tumores com predomínio estromal (WEIRICH *et al.*, 2001).

Além dos tumores de Wilms tipo blastematoso e com anaplasia difusa, pertencem ao grupo de tumores de alto risco o sarcoma de células claras e tumor rabdóide, correspondendo a 4% e 2% dos tumores renais em crianças, respectivamente (VUJANIĆ *et al.*, 2002).

3. 8. 3. ESTADIAMENTO

O principal fator prognóstico em tumores de Wilms é o estadiamento patológico, clínico e cirúrgico, que orienta o tratamento e indica quais pacientes devem receber intensificação do tratamento. Estádios iniciais com doença localizada (estádios I e II) têm melhor prognóstico quando comparados a estádios avançados (estádios III e IV). O estadiamento é definido principalmente pelos seguintes fatores:

(1) Linfonodos: A dissecação de linfonodos regionais e hilares são importantes para o estadiamento (KALAPURAKAL *et al.*, 2004). O comprometimento de linfonodos está associado ao estágio da doença, à extensão local do tumor e ao pior prognóstico (JEREB *et al.*, 1980). Metástases para linfonodos estão associadas a maiores taxas de metástases a distância e de mortalidade pela neoplasia (BRESLOW *et al.*, 1985). Parece que linfonodos positivos e êmbolos neoplásicos intrarrenais correlacionam-se a micrometástases, fato reforçado pela associação com metástases pulmonares (BRESLOW *et al.*, 1991). Pacientes não submetidos à biópsia de linfonodos no *National Wilms Tumor Study- 4* apresentaram maior recorrência abdominal (SHAMBERGER *et al.*, 1999).

(2) Disseminação peritoneal: a ruptura tumoral e disseminação peritoneal alteram as taxas de sobrevida e aumentam a probabilidade de disseminação e recorrência abdominal (SHAMBERGER *et al.*, 1999). A *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique* divulga como um dos principais benefícios da quimioterapia pré-operatória a redução do risco de ruptura tumoral durante a cirurgia (CAPRA *et al.*, 1999; KALAPURAKAL *et al.*, 2010). Como resultado da disseminação de células neoplásicas após ruptura tumoral em pacientes estágio II e histologia favorável do *National Wilms Tumor Study- 4*, houve redução da sobrevida global e 7,3% dos pacientes desenvolveram recorrência abdominal da doença (KALAPURAKAL *et al.*, 2010).

(3) Invasão vascular: trombo tumoral na veia cava inferior ou porção extrarenal da veia renal estava correlacionada ao aumento da taxa de metástases a distância no *National Wilms Tumor Study- 2* (BRESLOW *et al.*, 1985).

(4) Metástases: A doença metastática (estádio IV) é importante fator de pior prognóstico com sobrevida livre de evento em 5 anos de 75% para tumores de Wilms com histologia favorável (GREEN *et al.*, 1996; EHRLICH *et al.*, 2009). O tumor

de Wilms pode recorrer em locais como pulmões, fígado, rim contra-lateral e leito tumoral (GREEN *et al.*, 1996). As metástases são mais comuns para pulmões (40,5-44%), mas outros órgãos como fígado (2,12-10,7%), cérebro (1,2%) e ossos (2%) também podem ser comprometidos (LEMERLE *et al.*, 1976; PRITCHARD-JONES *et al.*, 2003; SZAVAY *et al.*, 2006). A ocorrência de metástases é mais comum em pacientes mais velhos e em tumores volumosos (BRESLOW *et al.*, 1986). Alguns indicadores estão relacionados à presença de metástases, como o comprometimento de linfonodos, a extensão regional da neoplasia e a presença de anaplasia à histologia (BRESLOW *et al.*, 1986; EHRLICH *et al.*, 2009). Aproximadamente 30% dos pacientes com metástases linfonodais têm metástases ao diagnóstico e 20% desenvolvem metástases durante o tratamento quimioterápico (BRESLOW *et al.*, 1986). Em tumores com extensão tumoral para vasos renais o risco aproximado para desenvolvimento de metástases é de 50% (BRESLOW *et al.*, 1986). Não há diferença quanto ao prognóstico entre metástases pulmonares e hepáticas nos estudos conduzidos pelo *National Wilms Tumor Study* e *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique* (BRESLOW *et al.*, 1986; EHRLICH *et al.*, 2009). Porém Varan *et al.* (2005) observaram sobrevida global em pacientes com metástases pulmonares de 50,2% e em pacientes com metástases hepáticas de 16,6%. Atualmente, não há consenso quanto ao tratamento e abordagem de doença metastática, tanto para metástases pulmonares quanto para hepáticas. Um dos objetivos dos grupos cooperativos é estabelecer a melhor abordagem para estes casos, buscando a estratificação dos pacientes (NICOLIN *et al.*, 2008).

O estadiamento empregado pela *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique* e pelo *National Wilms Tumor Study* está detalhado no QUADRO 4.

QUADRO 4 – ESTADIAMENTO SEGUNDO A SOCIÉTÉ INTERNATIONALE D'ONCOLOGIE PÉDIATRIQUE E A NATIONAL WILMS TUMOR STUDY

Estádio	NATIONAL WILMS TUMOR STUDY	SOCIÉTÉ INTERNATIONALE D'ONCOLOGIE PÉDIATRIQUE
I	Tumor limitado ao rim e completamente extirpado; superfície da cápsula renal intacta. O seio renal não pode estar envolvido	Tumor limitado ao rim e completamente extirpado; superfície da cápsula renal intacta. O seio renal não está envolvido
II	Tumor estende-se além do rim, mas foi completamente extirpado (margens negativas). Existe extensão regional do tumor: penetração nos tecidos perirenais através da cápsula renal. Vasos fora do rim podem estar soltos, totalmente retirados. Pode ter sido biopsiado e ocorrido rotura localizada no flanco. Nenhum linfonodo pode estar comprometido.	Tumor estende-se além do rim, mas foi completamente extirpado (margens negativas). Existe extensão regional do tumor: penetração nos tecidos perirenais através da cápsula renal. Vasos fora do rim podem estar infiltrados ou conter trombos soltos e totalmente retirados.
III	Tumor residual confinado ao abdome. Um dos seguintes itens pode ocorrer: <ul style="list-style-type: none"> • linfonodos comprometidos no hilo, cadeias peri-aórticas ou outros; • contaminação peritoneal por rotura tumoral; • implantes peritoneais; • vasos com embolo do tumor aderente à intima e não totalmente ressecados; • tumor não completamente ressecado; • biópsia prévia com contaminação peritoneal. 	Tumor residual confinado ao abdome, complicado por um dos seguintes itens: <ul style="list-style-type: none"> • tumor biopsiado; • rotura durante ou após a cirurgia; • metástases peritoneais; • comprometimento de linfonodos; • ressecção incompleta; • contaminação peritoneal por rotura tumoral; • implantes peritoneais; • presença de alterações necróticas induzidas pela quimioterapia em linfonodos ou nas margens de ressecção.
IV	Metástases hematogênicas (pulmão, fígado, osso, cérebro), ou metástases para linfonodos fora da região abdominal e pélvica	Metástases hematogênicas (pulmão, fígado, osso, cérebro), ou metástases para linfonodos fora da região abdominal e pélvica
V	Envolvimento bilateral	Envolvimento bilateral

FONTE: BOCCON-GIBOD *et al.* (2000).

A divisão em estádios é baseada em critérios multidisciplinares e orienta o tratamento pós-operatório. Conseqüentemente, o correto estadiamento é imprescindível para conduta terapêutica adequada (DE KRAKER *et al.*, 1999).

3. 8. 4. ASPECTOS HISTOLÓGICOS RELEVANTES PARA O PROGNÓSTICO

O aspecto histológico dos tumores de Wilms corresponde a um dos principais fatores prognósticos. A anaplasia está associada a pior prognóstico (BECKWITH *et al.*, 1996). Após a nova classificação da anaplasia em difusa e focal, comprovou-se que apenas a anaplasia difusa estava associada a pior prognóstico (BECKWITH *et al.*, 1996). No *National Wilms Tumor Study- 5*, para tumores de histologia desfavorável, a sobrevida livre de eventos e a sobrevida global em 4 anos foram de 69,5% e 82,6%, respectivamente (DOME *et al.*, 2006).

3. 8. 5. PESO TUMORAL

O peso, assim como a idade, é considerado fator prognóstico de interesse em tumores de Wilms. Esta foi uma das variáveis utilizadas por Cassady *et al.* para definir o estágio I em seu sistema de estadiamento. Estes autores definiram como estágio I tumores com peso inferior a 550g (CASSADY *et al.*, 1973). Baseados no excelente prognóstico obtido em pacientes que preenchem os critérios definidos por Cassady *et al.*, com peso inferior a 550g e idade inferior a 24 meses, o tratamento cirúrgico passou a ser sugerido como abordagem terapêutica isolada para este grupo de pacientes (LARSEN *et al.*, 1990).

Segundo os resultados do *National Wilms Tumor Study- 1*, pacientes com tumores de peso inferior a 250g apresentaram menores taxas de óbito e recaídas abdominais (BRESLOW *et al.*, 1978). Já no *National Wilms Tumor Study- 2* os resultados não corroboraram o efeito do peso tumoral sobre o prognóstico (BRESLOW *et al.*, 1985). O peso tumoral voltou a se correlacionar com as taxas de óbito e recaída no *National Wilms Tumor Study- 3* (BRESLOW *et al.*, 1991). Ao estudar pacientes no estágio I e histologia favorável o National Wilms Tumor Study Group observou que tumores com peso inferior a 550g estavam associados à ausência de variáveis de prognóstico desfavorável, como pseudocápsula

inflamatória, invasão do seio renal, invasão da cápsula e invasão de vasos intrarrenais (WEEKS; BECKWITH; LUCKEY, 1987).

3. 8. 6. VARIÁVEIS DE MICROESTADIAMENTO

Weeks, Beckwith e Luckey (1987) avaliaram a presença de invasão capsular, pseudocápsula inflamatória, invasão do hilo renal e invasão de vasos intrarrenais em tumores de Wilms estágio I e histologia favorável e denominaram este conjunto de aspectos histopatológicos com significado prognóstico de microestadiamento. No *National Wilms Tumor Study- 3* todos os casos de recorrência tumoral apresentavam ao menos um dos fatores de microestadiamento (WEEKS; BECKWITH; LUCKEY, 1987).

Pacientes estágio I com idade inferior a 2 anos têm menor probabilidade de exibirem variáveis de microestadiamento segundo o *National Wilms Tumor Study- 4* (GREEN *et al.*, 1994).

3. 9. MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS

3. 9.1. QSOX1

A QSOX1 humana foi identificada inicialmente como produto de gene quiescência Q6 (COPPOCK *et al.*, 1993). Coppock *et al.* (1993) identificaram genes expressos em fibroblastos pulmonares quiescentes de origem humana e os denominaram de “quiescências”, muitos dos quais codificam componentes da matriz extracelular e participam do programa de quiescência reversível. Entre os genes identificados, dois não haviam sido descritos, a quiescência Q6 e Q10 (COPPOCK *et al.*, 1993). A expressão do gene Q6 em humanos é baixa em fibroblastos em proliferação. Porém, sua expressão é induzida durante o processo de quiescência.

Cogita-se que a inibição da Q6 poderia levar a processos patológicos como câncer (COPPOCK; CINA-POPPE; GILLERAN, 1998).

Nos sistemas biológicos, o metabolismo aeróbico normal produz radicais livres, alguns altamente reativos (CASTAGNE *et al.*, 1999). Estes podem reagir e oxidar outras moléculas. Uma ampla variedade de antioxidantes ocorre naturalmente nos organismos. Na morte neuronal natural ou induzida por axotomia, por exemplo, há variações nos níveis de espécies reativas de oxigênio que sugerem a participação de estresse oxidativo. Além disso, há estudos que evidenciam o impedimento da morte neuronal por agentes antioxidantes (CASTAGNE *et al.*, 1999).

Logo, a direção de vários processos celulares depende do estado redox (nível de estresse oxidativo) intra e extracelulares. Portanto proteínas que modificam o estado redox (antioxidantes ou redutoras) de outras moléculas são moduladores críticos de fatores reguladores, envolvidos no controle da expressão gênica, sinalização celular e componentes da matriz extracelular (CASTAGNE *et al.*, 1999).

As sulfidril oxidases são enzimas que catalisam a geração de ligações dissulfeto com a redução de moléculas de oxigênio e a formação de peróxido de hidrogênio (HOOBER *et al.*, 1999).



Há duas classes de sulfidril oxidases: as metaloproteínas e as dependentes de flavina adenina dinucleotídio (FAD) (HECKLER *et al.*, 2008). Foram descritas duas famílias de sulfidril oxidases ligadas a FAD: a família quiescina sulfidril oxidase (QSOX) e a da ERV/ALR (essencial para respiração e crescimento vegetativo/augmenter of liver regeneration) (HOOBER *et al.*, 1999; HECKLER *et al.*, 2008).

A família QSOX contém dois domínios caracterizados por um domínio N-terminal tiorredoxina (Trx)/ proteína dissulfeto isomerase (PDI) e um domínio próximo ao C-terminal homólogo ao Erv1 (THORPE *et al.*, 2002; THORPE; COPPOCK, 2007).

As características biológicas da QSOX têm sido investigadas desde sua descrição no sistema reprodutivo masculino de roedores na década de 70. Desde então, novos membros da família QSOX foram descritos em humanos e em experimentos, como a Q6 em fibroblastos humanos, clara de ovo e fluido da vesícula seminal (COPPOCK *et al.*, 1993; HOOBER *et al.*, 1999; BENAYOUNT *et al.*, 2001; MATSUBA *et al.*, 2002).

O papel das sulfidril oxidases não está bem esclarecido, mas a sua distribuição celular ajuda a compreender quais seriam seus potenciais substratos e funções (TURY *et al.*, 2006). Alguns trabalhos demonstram a presença de QSOX1 no ambiente extracelular, como fluido de vesículas seminais (BENAYOUNT *et al.*, 2001), clara de ovo de galinha (HOOBER *et al.*, 1999), no sobrenadante de cultivo de fibroblastos quiescentes (COPPOCK *et al.*, 1993) e tecido conjuntivo e mesenquimal (PORTES *et al.*, 2007). A localização extracelular da QSOX1 sugere que esta possa estar envolvida na remodelação dos componentes da matriz extracelular ou na sinalização celular principalmente pelo favorecimento da formação de pontes dissulfeto dentro de uma mesma proteína ou entre proteínas distintas, pois proteínas secretadas e os domínios extracelulares de proteínas de membrana contêm ligações dissulfeto que são requeridas para o apropriado dobramento, função e estabilidade protéicas (THORPE *et al.*, 2002). A QSOX1 também é encontrada no ambiente intracelular em várias organelas, como retículo endoplasmático, complexo de Golgi e mitocôndrias, além de estar presente em vesículas secretórias e na superfície celular (THORPE *et al.*, 2002; THORPE; COPPOCK, 2007; CHAKRAVARTHI *et al.*, 2007).

A QSOX1 participa da formação de pontes dissulfeto em uma grande variedade de proteínas secretadas, algumas responsáveis pela formação de matriz extracelular (COPPOCK; CINA-POPPE; GILLERAN, 1998; HOOBER *et al.*, 1999; THORPE *et al.*, 2002; AMIOT *et al.*, 2004). A matriz extracelular desempenha importante papel nos mecanismos para controle do crescimento. As alterações nas interações entre células e matriz extracelular poderiam induzir apoptose (COPPOCK *et al.*, 2000). A participação da QSOX1 no mecanismo de apoptose pode estar relacionada ao fato de que a superexpressão de QSOX1 mantenha a mitocôndria polarizada sintetizando ATP. Durante a apoptose, a fosforilação oxidativa favorece o mecanismo de hidrólise de ATP, desencadeando a disfunção de processos dependentes de ATP, ativação de enzimas com ação de degradação e a liberação de moléculas pró-apoptóticas, como o citocromo c pela mitocôndria (MOREL *et al.*, 2007).

Em humanos foram descritos dois genes para as enzimas QSOX. Estes genes são encontrados em cromossomos distintos e são denominados QSOX1 (Q6) e QSOX2 (QSOXN) localizados nos cromossomos 1q24 e 9q34.3, respectivamente (COPPOCK *et al.*, 1993; THORPE *et al.*, 2002).

Provavelmente a QSOX1 participa dos mecanismos secretórios em vários tecidos, regulando as atividades biológicas através da oxidação de receptores de membrana e sua co-secreção com seus substratos poderia estar associada à perpetuação de sua atividade oxidativa (TURY *et al.*, 2006; AMIOT *et al.*, 2004).

A QSOX1 é expressa em vários tecidos humanos como miocárdio, placenta, estômago, pulmão, fígado, cérebro, rim, músculo esquelético e pâncreas (COPPOCK *et al.*, 2000). Já em camundongos, a expressão imunoistoquímica em fetos e em animais recém nascidos foi encontrada tanto em tecidos derivados da ectoderme quanto mesoderme (PORTES *et al.*, 2007). Também é relatada a expressão de QSOX1 no endométrio de porquinho da Índia (MUSARD *et al.*, 2001).

Em 2003, Wittke *et al.* descreveram um gene parálogo a QSOX humana (hQSOX) encontrado em neuroblastomas, localizado no cromossomo 9 e denominado QSOX2 ou QSOXN, com aproximadamente 35% de similaridade a QSOX, denominada QSOX1 (TURY *et al.*, 2004; WITTKKE *et al.*, 2003). A expressão de QSOXN em neuroblastomas está associada à resposta pró-apoptótica a agentes citostáticos (THORPE; COPPOCK , 2007). A inativação da QSOX2 possibilita aumento relativo da ação das enzimas antioxidantes, diminui o estresse oxidativo em células do neuroblastoma e confere resistência à apoptose induzida por interferon gama. Por sua vez, a super expressão de QSOX2 sensibiliza as células à morte celular induzida (WITTKKE *et al.*, 2003). Um dos mecanismos de resistência à terapêutica medicamentosa inclui as disfunções apoptóticas (WITTKKE *et al.*, 2003).

A expressão da QSOX1 parece estar correlacionada a apoptose induzida por estresse oxidativo semelhante ao descrito para a QSOX2. Porém, a superexpressão da QSOX1 parece estar associada à maior sobrevivência celular. Este comportamento contraditório da QSOX1 e QSOX2 pode estar relacionado aos diferentes substratos, aos tipos celulares e ao indutor de apoptose presente (MOREL *et al.*, 2007).

Há duas isoformas da QSOX1: a QSOX1a e QSOX1b (HECKLER *et al.*, 2008). A QSOX1a representa a forma longa encontrada no complexo de Golgi, enquanto a QSOX1b representa a forma curta dispensável a atividade enzimática. A função da QSOX1b é desconhecida (CHAKRAVARTHI *et al.*, 2007; HECKLER *et al.*, 2008).

3. 9. 2. O WT1

O *gene do tumor de Wilms (WT1)* foi clonado em pacientes com tumor de Wilms no contexto da síndrome WAGR (LITTLE *et al.*, 2004). Estes pacientes carregam a deleção germinativa do cromossomo 11p13 e para o desenvolvimento do tumor de Wilms acrescenta-se uma mutação ou deleção do alelo remanescente (LOEB; SUKUMAR, 2002). O *gene WT1* foi inicialmente descrito como gene supressor tumoral, pois sua inativação através de mutação está associada ao tumor de Wilms. Porém, atualmente numerosos estudos sugerem o papel oncogênico do *WT1* (WAGNER *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2009). O *gene WT1* consiste de 10 éxons e codifica um fator de transcrição do tipo “zinc fingers” (dedos de zinco) de 55kDa, ligado ao DNA e homólogo ao *EGR1* e *EGR2*, com distribuição nuclear (NAKATSUKA *et al.*, 2006). Entre os genes alvos da ação transcricional do *WT1* há genes importantes para o metabolismo e crescimento celular, fatores de crescimento e outros fatores transcricionais importantes na tumorigênese de vários sistemas (YANG *et al.*, 2007).

O *gene WT1* codifica 24 isoformas, geradas a partir de dois eventos *splicing* alternativos e do uso de translação de múltiplos locais de inicialização (NAKATSUKA *et al.*, 2006). Um dos eventos *splicing* alternativos inclui três aminoácidos chamados KTS (lisina, tirosina e serina) entre os dedos 3 e 4 (KIM *et al.*, 2007).

Em concordância com a ação supressora do *WT1* observou-se que este gene participa dos mecanismos de regulação do crescimento celular e apoptose. O papel do *WT1* sobre a apoptose apresenta resultados variáveis, dependentes do tipo celular e isoforma de *WT1*. Enquanto alguns autores relatam a atividade antiapoptótica decorrente da supressão de genes pró-apoptóticos ou ativação de genes indispensáveis para apoptose, outros descrevem o favorecimento do mecanismo de apoptose através da alteração da razão entre os membros da família BCL-2 (MAYO *et al.*, 1999; MORRISON; ENGLISH; LICHT, 2005).

O *WT1* é encontrado nos podócitos glomerulares, em células mesoteliais e precursores hematopoiéticos, principalmente mielóides (LEE; HABER, 2001; CARPENTIERI *et al.*, 2002). A expressão de *WT1* é descrita em uma grande variedade de neoplasias humanas como tumores do sistema gastrointestinal, pâncreas, trato biliar, mama, tumores de células pequenas redondas e azuis,

sistemas urogenital, respiratório, nervoso, hemolinfopoiético e do tecido mesenquimal (LEE; HABER, 2001; CARPENTIERI *et al.*, 2002; NAKATSUKA *et al.*, 2006). A constatação da expressão de WT1 em vasos de uma variedade de neoplasias sugere a participação do WT1 na migração de células endoteliais e proliferação vascular (WAGNER *et al.*, 2008).

O papel do *WT1* sobre o desenvolvimento renal e diferenciação gonadal é essencial (RIVERA; HABER, 2005). O fator de transcrição codificado pelo WT1 controla os estádios iniciais da nefrogênese e os genes que atuam sobre a transição mesênquimo-epitelial (FUKUZAWA *et al.*, 2004). A nefrogênese envolve a interação entre o broto uretérico, que se origina no ducto mesonéfrico, e o mesênquima metanéfrico, caracterizando a transição mesênquimo-epitelial (HASTIE, 1994). Os tumores de Wilms se originam do mesênquima metanéfrico (blastema) que condensa em resposta ao estímulo do broto uretérico e origina células epiteliais que formam os túbulos contornado proximal e distal e o glomérulo (HASTIE, 1994). O *WT1* parece ter ação antiapoptótica sobre as células do mesênquima metanéfrico (KIM *et al.*, 2007). Durante a nefrogênese, o *WT1* participa da indução de 23 genes conhecidos que atuam como fatores de crescimento ou secreção, proteínas de membrana e sinalizadoras, fatores transcricionais e fatores de *splicing* (KIM *et al.*, 2007). Entre os alvos de atuação do *WT1* durante a nefrogênese está o *Wnt4* que desempenha seu papel na via sinalizadora do Wnt, essencial para a nefrogênese, pois atua sobre transição epitélio-mesenquimal (KIM *et al.*, 2009).

Entre as anormalidades do *WT1* em tumores de Wilms incluem-se as mutações intragênicas e deleções, encontradas em proporções que variam de 10,4% a 26,7% dos tumores de Wilms (LEE; HABER, 2001; YANG *et al.*, 2007; ROYER-POKORA *et al.*, 2008; RUTESHOUSER; ROBINSON; HUFF, 2008). As alterações do *WT1* estão presentes tanto em tumores de Wilms associados a síndromes quanto em tumores esporádicos sugerindo a implicação do *WT1* na tumorigênese do tumor de Wilms (ZHUANG *et al.*, 1997).

Mutações específicas do *WT1* causam anormalidades genitourinárias que caracterizam as síndromes de Denys-Drash, Frasier e WAGR (LEE; HABER, 2001; HOHENSTEIN; HASTIE, 2006). Em pacientes portadores de tumor de Wilms, as mutações do *WT1* na linhagem germinativa estão associadas com maior frequência a doença bilateral, associação a síndromes e idade precoce ao diagnóstico (ROYER-POKORA *et al.*, 2008). Já as mutações constitucionais em pacientes não

sindrômicos são pouco freqüentes, ocorrem em idade precoce e em geral são *de novo* (LITTLE *et al.*, 2004). Algumas características sugerem a predisposição para desenvolvimento de tumor de Wilms associados a anormalidades do *WT1*: tumores bilaterais, malformação genitourinária, restos nefrogênicos, história familiar de tumor de Wilms, segunda neoplasia após tratamento para tumor de Wilms, idade precoce e predomínio estromal à histologia (SCHUMACHER *et al.*, 1997; LITTLE *et al.*, 2004).

A presença de mutações do *WT1* na linhagem germinativa favorece o desenvolvimento de tumores de Wilms independentes associados a mutações adquiridas do *CTNNB1*, gene que codifica a β -catenina (ROYER-POKORA *et al.*, 2008). A associação da mutação do *CTNNB1* e *WT1* sugere que a ablação do *WT1* estabiliza a β -catenina e/ou é necessária para a viabilidade da *CTNNB1* mutante (RUTESHOUSER; ROBINSON; HUFF, 2008). As mutações do *WT1* em restos nefrogênicos e as mutações do *CTNNB1* em tumores de Wilms confirmam a atuação do *WT1* como fator precoce e do *CTNNB1* como fator tardio na tumorigênese do tumor de Wilms (FUKUZAWA *et al.*, 2007). O *WT1* selvagem parece inibir a via Wnt. Os tumores de Wilms nulos para o *WT1*, frequentemente têm mutações da β -catenina e predomínio estromal à histologia. Enquanto os tumores de Wilms com *WT1* são trifásicos, predomínio epitelial ou blastematoso (KIM *et al.*, 2009).

Os tumores de Wilms com predomínio estromal e componente muscular esquelético estão associados a mutações do *WT1*. Pacientes com mutações germinativas possuem apenas uma cópia intacta do *WT1*, resultando em níveis reduzidos da proteína normal nas células do mesênquima. Sabe-se que níveis elevados de *WT1* estimulam a via de diferenciação epitelial. A associação de tumores de Wilms com predomínio estromal e mutações do *WT1* pode ser explicada através de dois mecanismos. O primeiro mecanismo é a perda do segundo alelo do *WT1*, que induz um bloqueio precoce do processo de diferenciação e conseqüente proliferação celular. O segundo mecanismo possivelmente decorre da ausência de expressão de *WT1* que leva a via de diferenciação estromal, pois a via epitelial não pode ser avançada (SCHUMACHER *et al.*, 1997).

A presença de rabiomiogênese é achado histológico comum em tumores de Wilms e está associada a melhor prognóstico, embora a resposta a quimioterapia pré-operatória seja pequena ou nula (CARPENTIERI *et al.*, 2002; LITTLE *et al.*, 2004; FUKUZAWA *et al.*, 2004; FUKUZAWA *et al.*, 2007; ROYER-POKORA *et al.*, 2008). Tumores de Wilms com diferenciação muscular com freqüência apresentam

nestas áreas perda completa do alelo selvagem do *WT1* e imunoexpressam *WT1*. O efeito da perda de função do *WT1* sobre a rabiomiogênese do componente estromal sugere a importância do *WT1* para o programa miogênico privilegiando a miogênese, enquanto a diferenciação epitelial está prejudicada (MIYAGAWA *et al.*, 1998; SCHUMACHER *et al.*, 2003). A associação entre a rabiomiogênese no tumor de Wilms e *WT1* mutante poderia ser atribuída a alterações na β -catenina e BCL-2 (FUKUZAWA *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2009). A mutação do *WT1* está relacionada à ativação da via Wnt e expressão de BCL-2 no componente muscular, sugerindo que a expressão destas proteínas desencadeia a rabiomiogênese (CARPENTIERI *et al.*, 2002; FUKUZAWA *et al.*, 2004; FUKUZAWA *et al.*, 2007).

Aproximadamente 90% dos tumores de Wilms expressam *WT1* selvagem (MAYO *et al.*, 1999). A proteína *WT1* é expressa em altos níveis na maioria dos tumores de Wilms com *WT1* selvagem e histologia com predomínio dos componentes blastematoso e epitelial (FUKUZAWA *et al.*, 2004). Essa alta expressão de *WT1* selvagem pode refletir a regulação anormal do *WT1* decorrente da perda da infraregulação vista no desenvolvimento normal (LOEB; SUKUMAR, 2002).

Observa-se em tumores de Wilms com mutação do *WT1* pouca redução volumétrica do tumor secundária a quimioterapia pré-operatória, porém sem correlacioná-la a sobrevida global ou sobrevida livre de evento. A mutação do *WT1* parece identificar pacientes com pouca resposta a terapêutica pré-operatória e prognóstico favorável, pois raramente evoluem com doença metastática. Em síntese, as mutações do *WT1* acarretariam a maturação acompanhada por diferenciação o que explicaria a pouca redução volumétrica do tumor induzida pela quimioterapia pré-operatória. Porém, não se sabe se estas células diferenciadas poderiam reativar a capacidade de divisão após a interrupção da quimioterapia pré-operatória (ROYER-POKORA *et al.*, 2008).

Tanto a positividade no componente epitelial quanto blastematoso se correlacionaram com o estágio patológico (GHANEM *et al.*, 2000). A expressão imunoistoquímica de *WT1* é positiva no blastema e epitélio, mas negativa no estroma refletindo os baixos níveis de expressão de *WT1* neste componente (ZHUANG *et al.*, 1997; FUKUZAWA *et al.*, 2004).

3. 9. 3. A PROTEINA p53

Inúmeros fatores ambientais e intrínsecos agem sobre as células causando danos celulares. Em algumas situações, o dano pode ser intenso o suficiente para desencadear potencial oncogênico. Mecanismos de defesa são ativados para erradicar estas células através do programa de morte celular pela via apoptótica. Porém, se estes mecanismos de defesa falharem a evolução para câncer poderá ocorrer. A resposta celular a tal situação depende de uma via sinalizadora complexa da qual faz parte uma das mais importantes proteínas supressoras tumoral, o p53 (AYLON; OREN, 2007).

O p53, descoberto há 30 anos, foi inicialmente descrito como um proto-oncogene, superexpresso em tumores e envolvido na imortalização celular (CADWELL; ZAMBETTI, 2001). A proteína p53 é uma proteína de ligação ao DNA e desempenha a função de fator de transcrição de genes com funções no ciclo celular e no reparo de danos ao DNA em resposta a situações de estresse. Como respostas a estas situações, o p53 pode desencadear a apoptose, a senescência e a autofagia e atuar no controle do metabolismo celular e no reparo do DNA (KRUSE; GU, 2009).

O *TP53* humano, gene da proteína p53, está localizado no cromossomo 17p13 e origina uma fosfoproteína nuclear com 393 aminoácidos (ISOBE *et al.*, 1986; MCBRIDE; MERRY; GIVOL, 1986). A família do p53 apresenta outros membros com propriedades semelhantes, o p73 e p63, e suas isoformas (BOURDON, 2007).

A proteína p53 apresenta um domínio transativacional amino-terminal, um domínio de ligação do DNA, tetramerização carboxi-terminal e domínios regulatórios. A p53 é uma proteína com estrutura tetramérica de resposta ao estresse que funciona como fator de transcrição com atividade regulatória sobre grande número de genes envolvidos na resposta a insultos celulares, como por exemplo, oncogênese e dano ao DNA (BROSH; ROTTER, 2009). A proteína p53 se liga a sequência específica do DNA e transativa uma variedade de genes que atuam sobre o ciclo celular em funções como apoptose e metabolismo (GREEN; KROEMER, 2009).

A ativação do p53 depende de três etapas: estabilização através da fosforilação, antirrepressão e ativação por promotor específico (KRUSE; GU, 2009).

Caso ocorra dano ao DNA, os níveis de p53 aumentam, o que impede a passagem da célula da fase G1 ou G2 para a fase S e permite o reparo do DNA danificado (FUSTER *et al.*, 2007). Além disso, a p53 citoplasmática induz apoptose através da interação com membros da família BCL-2. A p53 reprime a atividade da BCL-2, promove a oligomerização de fatores pró-apoptóticos como o BAX, desencadeia a permeabilização da membrana externa da mitocôndria (CADWELL; ZAMBETTI, 2001; FUSTER *et al.*, 2007; KRUSE; GU, 2009; GREEN; KROEMER, 2009). Logo, a inativação do p53 leva a exacerbação da atividade do BCL-2, prejudicando a resposta apoptótica aos estímulos danosos (CADWELL; ZAMBETTI, 2001). A p53 também suprime a autofagia (GREEN; KROEMER, 2009).

A atividade supressora tumoral do p53 é decorrente de sua atuação sobre diversos genes envolvidos no controle de processos de crescimento celular e apoptose (FUSTER *et al.*, 2007). Em células isentas de fatores de estresse, a p53 é mantida em baixos níveis devido a curta meia-vida decorrente da ativação da ubiquitinação e do gene *MDM2* que inibe a atividade transcricional (KRUSE; GU, 2009; BROSH; ROTTER, 2009).

As mutações do *TP53* conferem a proteína mutante atividade dominante negativa sobre a proteína p53 selvagem, além de acrescentar novas propriedades oncogênicas, denominada de hipótese do ganho de função (BROSH; ROTTER, 2009). A proteína p53 mutante adquire funções que não são transativadas pelos genes alvo habituais da proteína p53 (DITTMER *et al.*, 1993; CADWELL; ZAMBETTI, 2001). Outros membros da família p53 também são inibidos pela p53 mutante através da modulação da transcrição gênica (BROSH; ROTTER, 2009). A proteína p53 mutante ativa através da transcrição o *MDR1*, associado à resistência a drogas e interfere na atividade apoptótica (BROSH; ROTTER, 2009).

A p53 tem meia-vida curta de 20-30 minutos e está presente em baixos níveis em células sem situação de estresse (FUSTER *et al.*, 2007). As mutações do *TP53* estabilizam a p53 e ampliam a meia-vida desta proteína em comparação ao tipo selvagem, permitindo a visualização através de estudo imunistoquímico do acúmulo da proteína mutante (SREDNI, 2001). A detecção da p53 em células tumorais pode indicar a mutação do *TP53* (BROSH; ROTTER, 2009). Porém, a expressão imunistoquímica do p53 deve ser interpretada com cautela, pois alguns tumores acumulam proteína p53 selvagem funcional devido a sinais de estresse persistentes (HALL; LANE, 1994). Além disso, o estudo imunistoquímico avalia a

expressão de algumas isoformas do p53, mas não as identifica especificamente. A imunolocalização desta proteína nos diferentes compartimentos subcelulares pode estar associada a marcadores clínicos (BOURDON, 2007). A localização subcelular também afeta as propriedades oncogênicas. A proteína p53 mutante se acumula frequentemente no núcleo, mas pode ser encontrada no citoplasma (BROSH; ROTTER, 2009).

As mutações do *TP53*, que em geral resultam na inativação da função de supressor tumoral, são encontradas em mais da metade dos cânceres relatados e em associação ao câncer familiar na síndrome de Li-Fraumeni (CADWELL; ZAMBETTI, 2001; KRUSE; GU, 2009). As mutações somáticas do *TP53* levam a câncer esporádico enquanto as mutações germinativas levam a síndrome de Li-Fraumeni (BROSH; ROTTER, 2009). A expressão da p53 pode ser empregada como indicador biológico de agressividade tumoral ou pior prognóstico em pacientes adultos. Porém, em tumores pediátricos, as mutações do p53 não são comuns (KUSAFUKA *et al.*, 1997).

As mutações do gene *TP53* são incomuns em tumores de Wilms (WABER; CHEN; NISEN, 1993). Nestes tumores as mutações do *TP53* são encontradas em tumores com anaplasia e raramente em tumores sem anaplasia (LEMOINE; HUGHES; COWELL, 1992; BARDEESY *et al.*, 1994; BARDEESY; BECKWITH; PELLETIER, 1995; PERES *et al.*, 2004). Tal fato sugere a relação entre a progressão para anaplasia e as mutações do *TP53* (BARDEESY; BECKWITH; PELLETIER, 1995). Os tumores de Wilms progrediriam para anaplasia após adquirirem mutações do *TP53*, mas este não seria um evento isolado. Outros eventos seriam necessários para a progressão, como por exemplo, a perda do alelo normal do *TP53* (BARDEESY; BECKWITH; PELLETIER, 1995).

A associação entre mutações do *TP53* e anaplasia sugere que tais mutações estejam associadas ao pior prognóstico, resistência a quimioterapia e a expansão clonal de células neoplásicas que adquiriram as mutações do *TP53* (SREDNI *et al.*, 2001; D'ANGELO *et al.*, 2003).

A positividade imunoistoquímica para p53 em tumores de Wilms é relatada em pacientes que apresentam anaplasia, recaída, agressividade tumoral, evolução desfavorável e óbito (LAHOTI *et al.*, 1996; GOVENDER *et al.*, 1998; SKOTNICKA-KLONOWICZ *et al.*, 2001; HILL *et al.*, 2003). A presença de imunoexpressão de p53 é encontrada em 4 a 20% dos tumores de Wilms com histologia favorável

(D'ANGELO *et al.*, 2003). Porém, neste grupo de pacientes, o papel das mutações do *TP53* é desconhecido (SREDNI *et al.*, 2001).

A proteína p53 selvagem atua sobre a síntese de trombospondina 1 (TSP-1), supressor endógeno da angiogênese, e sobre o fator de crescimento endotelial (VEGF), mediador da angiogênese em muitas neoplasias. As disfunções do TSP-1 e VEGF foram associadas à densidade vascular em tumores de Wilms com histologia desfavorável e podem contribuir para achados clínicos que dependem da angiogênese como metástases e crescimento tumoral (HUANG *et al.*, 2002).

3. 9. 4. A PROTEINA BCL-2

A apoptose ou morte celular programada é essencial para o desenvolvimento normal e homeostasia tecidual (ANTONSSON; MARTINOU, 2000) e está sob o controle de genes supressores tumorais e oncogenes (GHANEM *et al.*, 2005). A apoptose está envolvida em uma série de condições patológicas como doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares e câncer (ANTONSSON; MARTINOU, 2000). A apoptose também é alvo de drogas quimioterápicas empregadas no tratamento do câncer e atua sobre a permeabilidade da membrana mitocondrial, liberando citocromo c e desencadeando o mecanismo de apoptose (KIM *et al.*, 2004).

A complexa via apoptótica é composta pela mitocôndria, citocromo c, caspases e proteínas da família *B-cell lymphoma protein 2* (BCL-2) (ANTONSSON; MARTINOU, 2000). Esta família de proteínas regula os mecanismos de morte celular através da apoptose, necrose e autofagia e as alterações na função e expressão destas proteínas contribuem para a patogênese e progressão do câncer (YIP; REED, 2008). Os membros da família BCL-2 têm pequena homologia na sequência de aminoácidos, mas têm estrutura terciária semelhante (LALIER *et al.*, 2007). Esta família é composta por quatro domínios conservados denominados de domínios de homologia à BCL-2 (BH1, BH2, BH3 e BH4) (ANTONSSON; MARTINOU, 2000).

As proteínas relacionadas ao *BCL-2* são agrupadas em três categorias distintas: as proteínas anti-apoptóticas (BCL-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-N e A1/Bfl-1), pró-apoptóticas (BAX, BAK e BOK) e *BH3-only proteins* (Bid, Bik e Bim) (ANTONSSON;

MARTINOU, 2000; GALONEK; HARDWICK, 2006). Estas proteínas estão localizadas no citosol ou associadas à membrana e interagem entre si para promover ou inibir a morte celular programada a partir da formação de homodímeros ou heterodímeros (KIM *et al.*, 2004; GALONEK; HARDWICK, 2006).

O gene *B-cell lymphoma protein 2 (BCL-2)* foi descrito como produto da translocação cromossômica, observada em linfomas foliculares, entre o segmento 18q21 e 14q32, uma região próxima ao loci de promotores da cadeia pesada de imunoglobulinas com consequente superexpressão da proteína BCL-2 (RE *et al.*, 1999; ANTONSSON; MARTINOU, 2000; YIP; REED, 2008). BCL-2 é uma proteína integral de membrana com 26 kDa, localizada nas membranas do retículo endoplasmático, da mitocôndria e nuclear (GHANEM *et al.*, 2001). A proteína BCL-2 impede a ação das proteínas pró-apoptóticas através da formação de heterodímeros com BAX e BAK (KIM *et al.*, 2004).

Durante o desenvolvimento embrionário, a apoptose desempenha papel ativo, adequando o número de células às necessidades do organismo em formação. Sabe-se que a BCL-2 é indispensável para a nefrogênese e maturação renal (CAREV *et al.*, 2006; SHEIBANI *et al.*, 2007). A BCL-2 atua ativamente sobre o mesênquima estimulando a formação do néfron (CAREV *et al.*, 2006). Sabe-se que o BCL-2 é um oncogene que promove a tumorigênese inibindo o mecanismo de apoptose (GALONEK; HARDWICK, 2006). A perda deste mecanismo prolonga a sobrevivência celular, favorece a progressão neoplásica e a resistência a quimioterapia e radioterapia (GHANEM *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2004). As alterações da BCL-2 são estimadas em aproximadamente 50% dos cânceres. A presença de alterações tanto no BCL-2 quanto BAX, e suas funções no mecanismo de morte celular, tornaram estas duas proteínas alvos potenciais de agentes quimioterápicos e de terapia alvo (YIP; REED, 2008). A expressão de BCL-2 em neoplasias apresenta correlação variável com o prognóstico. Em uma variedade de tumores sólidos e hematológicos a expressão de BCL-2 se correlaciona a pior prognóstico (RE *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2004).

A participação da BCL-2 na nefrogênese e na resistência a tratamentos oncológicos, como quimioterapia e radioterapia, estimularam a pesquisa de BCL-2 em tumores de Wilms. A expressão imunohistoquímica de BCL-2 em tumores de Wilms se correlacionou ao pior prognóstico e a progressão da doença. Porém, o

mecanismo pelo qual o BCL-2 contribui para a progressão do tumor de Wilms é desconhecido (GHANEM *et al.*, 2001).

A imunoeexpressão de BCL-2 em tumores de Wilms é variável e heterogênea nos componentes histológicos do tumor (blastema, epitélio e estroma) (RE *et al.*, 1999; TANAKA *et al.*, 1999; GHANEM *et al.*, 2001; FUKUZAWA *et al.*, 2004). Em tumores com histologia desfavorável, a imunoeexpressão estava ausente ou fraca (RE *et al.*, 1999; TANAKA *et al.*, 1999). Não se observou a influência da quimioterapia pré-operatória sobre a expressão imunohistoquímica de BCL-2 (TANAKA *et al.*, 1999).

A expressão do gene *BCL-2*, avaliada através de RT-PCR, se correlacionou a resposta a quimioterapia com redução de mais de 50% do volume tumoral em tumores de Wilms (WITTMANN *et al.*, 2008).

Além da relação entre BCL-2 com as outras proteínas da família BCL-2, estudos mostram a influência de outras proteínas como WT1 e p53 sobre a atividade da BCL-2 em tumores de Wilms. A BCL-2 tem a expressão endógena de RNA mensageiro aumentada pelo *WT1* através da ativação transcricional do *BCL-2*. Estudo *in vitro* correlacionou o *WT1* e o aumento da expressão da *BCL-2* e subsequente resistência a apoptose (MAYO *et al.*, 1999).

Tumores de Wilms esporádicos expressam tanto *WT1* quanto *BCL-2* (MAYO *et al.*, 1999). A regulação do *BCL-2* pelo *WT1* em tumores de Wilms é um fenômeno relacionado a tipos celulares específicos. Em tumores de Wilms com expressão de *WT1* selvagem, há coexpressão de *WT1* e *BCL-2* nos componentes epitelial e blastema. Já nos tumores com mutação do *WT1*, a expressão de BCL-2 é reduzida nestes componentes, mas alta no componente rabdomiomasioso, indicando que o *WT1* regula positivamente o *BCL-2* na via epitelial, mas negativamente na via miogênica (FUKUZAWA *et al.*, 2004). A p53 atua como regulador negativo do BCL-2. A superexpressão de *BCL-2* pode bloquear o mecanismo de apoptose induzido pelo p53 (KIM *et al.*, 2004).

3. 9. 5. A PROTEINA BAX

A proteína pró-apoptótica *BCL-2 associated X protein* (BAX) pertencente à família BCL-2, foi identificada em associação a BCL-2 através de ensaios de coimunoprecipitação (OLTVAI *et al.*, 1993). A proteína BAX de 21 kDa é codificada pelo gene localizado na região cromossômica 19q13.3-q13.4. Sob estímulo apoptótico, a BAX localizada no citossol, se aproxima da mitocôndria, onde forma oligômeros que penetram a membrana mitocondrial externa e desencadeia a liberação de citocromo c.

Há dois estados conformacionais da BAX ativa: a nativa e a completamente ativada. A BAX é composta por nove α -hélices, com as duas alças centrais $\alpha 5$ e $\alpha 6$ hidrofóbicas envolvidas pelas demais hélices anfipáticas. Quando a BAX é ativada a mudança conformacional expõe os domínios hidrofóbicos, aumentando a afinidade por membranas biológicas. Após o estímulo apoptótico a BAX não muda apenas sua localização, mas também sua conformação (LALIER *et al.*, 2007).

A BAX *in vivo* homodimeriza ou heterodimeriza com a BCL-2. A formação de homodímeros e heterodímeros com a BCL-2 gera a razão entre BCL-2 e BAX que determina a susceptibilidade da célula a apoptose. Quando há excesso de BCL-2, a célula está protegida do mecanismo de apoptose. Porém, quando predominam o excesso de BAX e seus homodímeros, a célula está suscetível a apoptose (OLTVAI *et al.*, 1993).

Não há consenso sobre os mecanismos que desencadeiam a ativação da BAX durante o estresse apoptótico. As inúmeras pesquisas e questionamentos que cercam os mecanismos de ativação da BAX receberam o rótulo de “Santo Graal da pesquisa da apoptose” (GAVATHIOTIS *et al.*, 2008). Entre os possíveis mecanismos de ativação, está a atividade desempenhada pelas BH3-only proteins. Estas proteínas se ligariam e inativariam os componentes anti-apoptóticos da família BCL-2, que conseqüentemente liberariam a BAX seqüestrada em sua estrutura ou as BH3-only proteins se ligariam diretamente a BAX ativando-a (GALONEK; HARDWICK, 2006). A BAX ativada atua sobre a membrana externa da mitocôndria tornando-a permeável ao citocromo c, desencadeando a ativação das caspases e ao final apoptose (GALONEK; HARDWICK, 2006; GAVATHIOTIS *et al.*, 2008; BLEICKEN *et al.*, 2010).

A atividade apoptótica é alvo de agentes quimioterápicos. Após o estímulo apoptótico por agentes quimioterápicos, há aumento da ativação do gene *BAX*, que leva a aumento da quantidade da proteína BAX em forma de homodímeros que se desloca do citoplasma para a mitocôndria (KIM *et al.*, 2002).

A expressão de BAX também pode ser diretamente induzida pelo p53, radiação e drogas em células de cultivo celular sensíveis, mas não resistentes (KRAJEWSKI *et al.*, 1995).

Krajewski *et al.* (1995) observaram maior resistência a apoptose induzida por droga em carcinomas mamários com redução da expressão imunohistoquímica de BAX. Semelhante ao encontrado por Addeo *et al.* (2007) em tumores de células germinativas em crianças que demonstraram através da imunohistoquímica a correlação entre a ausência de expressão de BAX, pior prognóstico e necessidade de terapia mais agressiva para este grupo de pacientes.

Estudos *in vitro*, mostram que a elevação da relação BCL-2/BAX não previne a apoptose induzida por quimioterapia, mas desloca a curva de resposta para a direita. Desta forma, maiores concentrações são necessárias para induzir a morte celular (KRAJEWSKI *et al.*, 1995).

A expressão imunohistoquímica de BAX em tumores de Wilms foi observada em células dos componentes blastematoso e epitelial com padrão de expressão citoplasmático. Ghanem *et al.* (2001) não obtiveram em seu estudo a correlação entre a expressão de BAX e pior prognóstico. A expressão imunohistoquímica de BAX reduziu gradualmente quanto maior o estadiamento, desta forma tumores de Wilms com maior estágio apresentaram redução da expressão de BAX. Além disso, a relação entre BCL-2/BAX foi útil em prever a progressão clínica (GHANEM *et al.*, 2001).

Já em estudos com RT-PCR, a expressão do gene *BAX* não se correlacionou com dados clínicos como metástases, resposta à quimioterapia e recidivas ou histologia de baixo ou alto risco (WITTMANN *et al.*, 2008). Porém, Li *et al.* (2005) correlacionaram a superexpressão do gene *BAX* à recaída tumoral.

3. 9. 6. O RECEPTOR VEGFR1

A angiogênese é indispensável para o crescimento tumoral e está sob os efeitos regulatórios de uma variedade de moléculas angiogênicas (GHANEM *et al.*, 2003). Sabe-se que tumores com tamanho superior a 1-2mm são dependentes de angiogênese. A manutenção das células tumorais com aporte de oxigênio e nutrientes adequados a distâncias maiores se faz apenas se houver neovascularização. O crescimento tumoral desacompanhado de neovascularização torna-se insustentável, pois a hipóxia gerada induz a apoptose. O processo de neovascularização decorrente da ativação, proliferação e migração de células endoteliais a partir de estruturas vasculares pré-existentes é regulado por fatores de crescimento específicos secretados pelas células tumorais e pelas células circunjacentes, como por exemplo, macrófagos que infiltram o tumor. Dentre estes fatores angiogênicos está o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), uma citocina pertencente à família VEGF, com funções críticas na angiogênese fisiológica e patológica (SHIBUYA, 2006; SLONGO *et al.*, 2007).

A família VEGF e seus receptores atuam no desenvolvimento, manutenção e remodelamento vascular (MAC GABHANN; POPEL, 2008). Os membros desta família agem como agentes mitogênicos em células endoteliais, modulam a angiogênese neoplásica, influenciam a progressão e disseminação tumoral e disseminação vascular e estão associados a pior prognóstico em uma série de neoplasias (GHANEM *et al.*, 2003; ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, , 2006; NOWICKI, 2007). Os vasos sanguíneos que permeiam os tumores constituem uma estrutura caótica com fluxo sanguíneo lento e alta pressão de fluido no interstício, que resultam em áreas de hipóxia e perpetuam a produção de VEGF. Acredita-se que diferentes tumores utilizam diferentes vias angiogênicas para estabelecer a neovascularização (NOWICKI, 2007).

A família VEGF é composta pelo VEGF-A ou apenas VEGF, VEGF-B, fator de crescimento da placenta (PlGF), VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e VEGF-F e seus receptores denominados VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3, expressos em células endoteliais, células neuronais, osteoclastos, ductos pancreáticos, células progenitoras da retina, megacariócitos, células tronco hematopoiéticas, células epiteliais dos túbulos renais e em grande número de neoplasias, como melanoma,

carcinomas de ovário, mama, próstata, cólon, pâncreas e sarcoma de Kaposi (MASOOD *et al.*, 2001; TAMMELA *et al.*, 2005; NOWICKI, 2007).

A relação entre VEGF e seus receptores é componente crucial no complexo processo de angiogênese que inclui muitos outros agentes moduladores (ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006). O VEGF age sobre as células endoteliais promovendo proliferação, brotamento, migração e formação de túbulos, além de induzir a expressão de proteínas antiapoptóticas, de estimular a atração de células inflamatórias e promover a expressão de proteases que atuam na degradação da matriz extracelular durante a angiogênese (TAMMELA *et al.*, 2005).

A expressão de VEGFR1s em células de linhagem tumoral e a atividade mitogênica do VEGF sugerem uma alça autócrina na atividade do VEGF, que suporta o efeito de sobrevida e migração celular. A atividade autócrina do VEGF sobre diferentes linhagens celulares pode resultar em efeito proliferativo ou não proliferativo (DIAS *et al.*, 2001; SLONGO *et al.*, 2007). Há evidências de que a massa vascular formada pelo efeito do VEGF sobre as células endoteliais libera fatores de crescimento que atuam sobre as células tumorais de forma parácrina. Desta forma, são descritas duas alças de atividade do VEGF: a alça VEGF/VEGFR1 autócrina independente do endotélio e a alça VEGF/VEGFR1 parácrina dependente do endotélio, ambas as alças contribuindo para o crescimento tumoral (DIAS *et al.*, 2001).

A angiogênese é fundamental para o desenvolvimento normal dos tecidos. O VEGF medeia a angiogênese não apenas no desenvolvimento tumoral, mas também em condições inflamatórias e atua na vasculogênese durante a embriogênese. A vasculogênese é imprescindível para o desenvolvimento renal. O VEGF é expresso continuamente nos rins desde a embriogênese até a fase adulta. O desenvolvimento renal inicia com a tubulogênese, através da diferenciação de células epiteliais pela indução do broto uretérico sobre o mesênquima imaturo, dando origem aos túbulos renais imaturos. A porção cortical destes túbulos imaturos forma a cápsula de Bowman, que receberá o tufo capilar para formar o glomérulo. Sabe-se que o epitélio glomerular expressa VEGF, enquanto seus receptores são expressos nas células endoteliais glomerulares (KITAMOTO *et al.*, 2002). A função do VEGF na morfogênese renal é coordenar o desenvolvimento dos túbulos e arquitetura vascular de forma parácrina (KITAMOTO; TOKUNAGA; TOMITA, 1997; NOWICKI, 2007). O desenvolvimento de estruturas tubulares e glomerulares é indispensável

para o desenvolvimento renal. A ausência de glomérulos pode estar associada a alterações tubulares como túbulos displásicos (NOWICKI, 2007).

A participação da família VEGF na angiogênese e crescimento tumoral estimula o desenvolvimento de terapias antiangiogênicas para tratamento do câncer disponível para neoplasias como o câncer colônico (MASOOD *et al.*, 2001; TAMMELA *et al.*, 2005).

O VEGFR1 ou tirosina quinase fms-símile (Flt-1), cujo gene está localizado no cromossomo 13q12-q13, é um receptor transmembrana da família da tirosina quinase, de 180 kDa, identificado como receptor do VEGF, VEGFB e PlGF, composto por sete domínios extracelulares de homologia a imunoglobulina, uma região transmembrana e um domínio intracelular tirosina quinase interrompido por um domínio de inserção da quinase (GHANEM *et al.*, 2003; TAMMELA *et al.*, 2005). O VEGFR1 transmite às células endoteliais um fraco sinal mitogênico, mas pode formar heterodímeros com o VEGFR2 com propriedades sinalizadoras mais potentes (TAMMELA *et al.*, 2005). A ativação do VEGFR1 induz a expressão de diferentes genes e a fosforilação de resíduos de tirosina distintos do VEGFR1 (TAMMELA *et al.*, 2005; SLOGO *et al.*, 2007). A expressão de VEGFR1 é aumentada durante a angiogênese e em estados de hipóxia (ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006). Há uma forma solúvel de VEGFR1 (sVEGFR1) que consiste em um domínio extracelular do VEGFR1 capaz de inibir a ação do VEGFR1 e está relacionada a pré-eclampsia (ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006).

O VEGFR1 é expresso em células endoteliais, osteoblastos, monócitos/macrófagos, pericitos, trofoblasto, células mesangiais renais e células tronco hematopoiéticas (TAMMELA *et al.*, 2005; ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006). O significado da expressão de VEGFR1 em células não endoteliais é desconhecido (NOWICKI, 2007).

As inúmeras pesquisas desenvolvidas para esclarecer as funções biológicas do VEGFR1 revelaram que este receptor suprime sinais angiogênicos durante a embriogênese, é regulador positivo de macrófagos, estimula o crescimento tumoral e metástases, está envolvido na progressão da aterosclerose e doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide (SHIBUYA, 2006).

O *VEGFR1* é expresso em neoplasias pediátricas como meduloblastoma, neuroblastoma e rabdomyossarcoma, e está relacionado a pior prognóstico nestes tumores (MEISTER *et al.*, 1999; FAKHARI *et al.*, 2002; GEE *et al.*, 2005; SLOGO

et al., 2007). Os relatos de associação entre a expressão de VEGF e VEGFR1 e pior prognóstico em neoplasias pediátricas impulsionaram a avaliação destes fatores em tumores de Wilms. Ghanem *et al.* (2003) avaliaram a expressão imunoistoquímica de VEGF e VEGFR1 em tumores de Wilms. Estes dois marcadores se correlacionaram com a densidade de microvasos tumoral e ao pior prognóstico. A expressão de VEGFR1 foi encontrada nos três componentes histológicos do tumor, com expressão crescente em relação ao estadiamento (GHANEM *et al.*, 2003). No blastema, a expressão de VEGFR1 se correlacionou com a progressão clínica e óbito relacionado ao tumor (GHANEM *et al.*, 2003). Estes achados sugerem a participação destas moléculas na neovascularização tumoral (GHANEM *et al.*, 2003).

Kayton *et al.* (1999) observaram, em modelo experimental, a expressão de VEGF na matriz extracelular do tumor de Wilms através de imunoistoquímica e a presença de VEGF detectada a partir do cultivo celular pelo método de ELISA em associação ao desenvolvimento de metástases. A expressão do gene *VEGF* analisada através de RT-PCR está associada a tumores de Wilms de alto risco, sugerindo uma provável via hipóxia/angiogênese na progressão e disseminação do tumor de Wilms (WITTMANN *et al.*, 2008). A superexpressão do gene *VEGF* e a expressão imunoistoquímica de VEGF no tumor de Wilms também se correlacionam a recaída tumoral (LI *et al.*, 2005).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Selecionamos para este estudo 29 pacientes portadores de tumor de Wilms tratados no Hospital Infantil Pequeno Príncipe (HIPP) e no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR) após autorização dos Comitês de Ética. Do total, 15 casos foram diagnosticados no Hospital Infantil Pequeno Príncipe (HIPP) durante o período de 1998 a 2007 e 14 casos foram diagnosticados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) do período de 1994 a 2007.

4.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos todos os casos de pacientes de ambos os sexos com diagnóstico de tumor de Wilms entre os anos de 1994 a 2007 de ambos os hospitais que participaram do estudo. Todos os pacientes tiveram seus prontuários, bem como as lâminas histológicas (em hematoxilina-eosina) de seus espécimes cirúrgicos (biópsias diagnósticas pré-tratamento e/ou produtos de ressecção completa dos tumores pré ou pós-tratamento) revisados. A amostra destinada ao estudo foi composta pelos blocos de parafina contendo amostras dos produtos de ressecção e das biópsias dos tumores de Wilms (tanto pré como pós-tratamento) oriundas dos Serviços de Anatomia Patológica dos hospitais que participaram do estudo.

4.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo casos que apresentavam blocos de parafina não disponíveis ou em condições inadequadas para o estudo imunoistoquímico (necrose, material escasso, alterações decorrentes de má fixação), além daqueles casos cujo prontuário não estava disponível nos hospitais participantes.

4.3. SELEÇÃO DE LÂMINAS E BLOCOS

As lâminas histológicas em hematoxilina-eosina foram revisadas sendo que àquelas mais representativas dos tumores foram selecionadas. A partir destas lâminas foram selecionados os blocos teciduais parafinados contendo as amostras de nefroblastomas previamente escolhidas nas lâminas. Estes blocos foram separados dos arquivos dos Serviços de Anatomia Patológica dos hospitais participantes do estudo.

4.4. CLASSIFICAÇÃO DA AMOSTRA

As lâminas contendo cortes do nefroblastoma foram revisadas e o material foi classificado quanto: **(a)** tipo histológico e; **(b)** conforme este quanto ao seu grupo de risco; **(c)** presença ou não de anaplasia e se presente, se focal ou difusa; **(d)** presença ou não de necrose/alterações regressivas e se presente a porcentagem em relação a amostra; **(e)** presença ou não de restos nefrogênicos e se presente o tipo (perilobar ou intralobar).

4.5. PREPARAÇÃO DE LÂMINAS POR ARRANJO TECIDUAL EM MATRIZ (TMA) ARTESANAL

A técnica consistiu na montagem de blocos de parafina, com múltiplas amostras, para confecção de lâminas histológicas multi-amostrais a fim de realizar técnicas imunohistoquímicas em vários tecidos de uma só vez, barateando o custo do estudo. Este método se inicia a partir da separação de múltiplas amostras e a junção de todas em um bloco comum. A técnica completa, desde o início até a realização dos cortes histológicos, consiste de alguns passos: **(a)** a partir dos blocos de parafina já previamente selecionados para o estudo (blocos-doadores) foram obtidos

cortes, corados em coloração de rotina (hematoxilina-eosina); **(b)** as lâminas confeccionadas são dirigidas ao patologista, para observação da amostra em questão e localização das regiões mais representativas do tumor e marcação com caneta de retroprojeção (foram selecionadas três regiões neoplásicas que representassem os três componentes da neoplasia, quando possível, e uma região de rim sem neoplasia); **(c)** através do sistema de espelho, a lâmina marcada foi utilizada para localização das regiões mais representativas do tumor no bloco-doador; **(d)** para que as amostras fossem posteriormente localizadas no bloco-receptor, conforme sua identificação inicial, foi então confeccionado um mapa em plano cartesiano, sendo que as linhas foram identificadas com números e as colunas com letras; **(e)** uma vez montado o mapa, os blocos-doadores foram organizados para montagem dos cinco bloco-receptores finais que ficaram com cerca de 7 pacientes em cada um identificados nas linhas com os números de 1 a 7, cada um com 4 amostras identificadas nas colunas pelas letras A, B, C e D; **(f)** os blocos receptores finais foram montados com 3 amostras de tumor e uma amostra de rim normal (sem tumor) retiradas dos blocos doadores com pinça tipo punch de pele número 3 **(g)** após a confecção dos bloco-receptores, foram confeccionadas lâminas histológicas convencionais (hematoxilina-eosina), onde a imagem formada era um espelho do mapa e, posteriormente, foram realizadas as provas imunoistoquímicas (FIGURAS 7, 8 E 9).

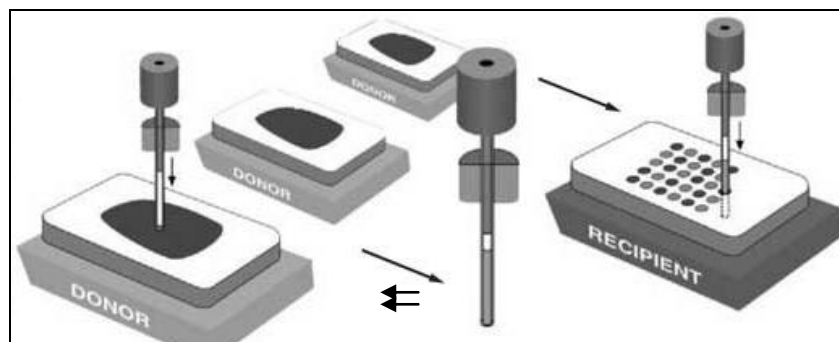


FIGURA 7 – ESQUEMA DEMONSTRATIVO DA MONTAGEM DE UM TISSUE MICROARRAY COM SEUS BLOCOS DOADORES (DONOR) ORGANIZADOS, A PINÇA DE *PUNCH* SOBRE A ÁREA DA AMOSTRA A SER RETIRADA E A MESMA CONTENDO O *CORE* DE TECIDO (SETA DUPLA), ALÉM DA CONTRUÇÃO DO BLOCO RECEPTOR (RECIPIENT) COM SUAS LINHAS E CÔLUNAS PREVIAMENTE IDENTIFICADAS POR UMA MAPA EM PLANO CARTESIANO

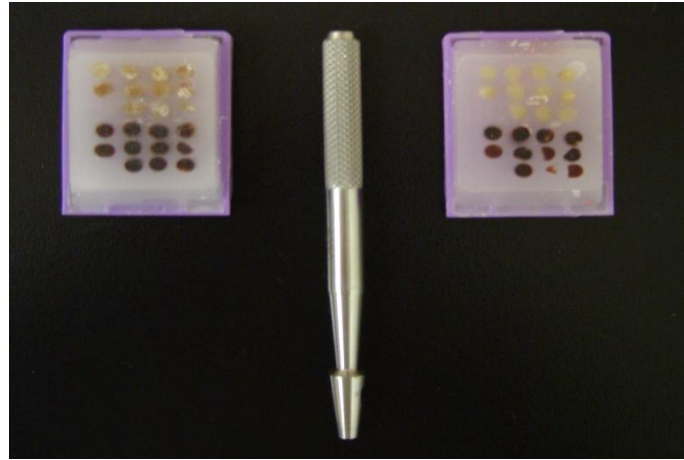


FIGURA 8 – FOTOGRAFIA DE DOIS BLOCOS DE TISSUE MICROARRAYS E DA PINÇA DE *PUNCH* NÚMERO 3 UTILIZADA PARA A SUA CONSTRUÇÃO

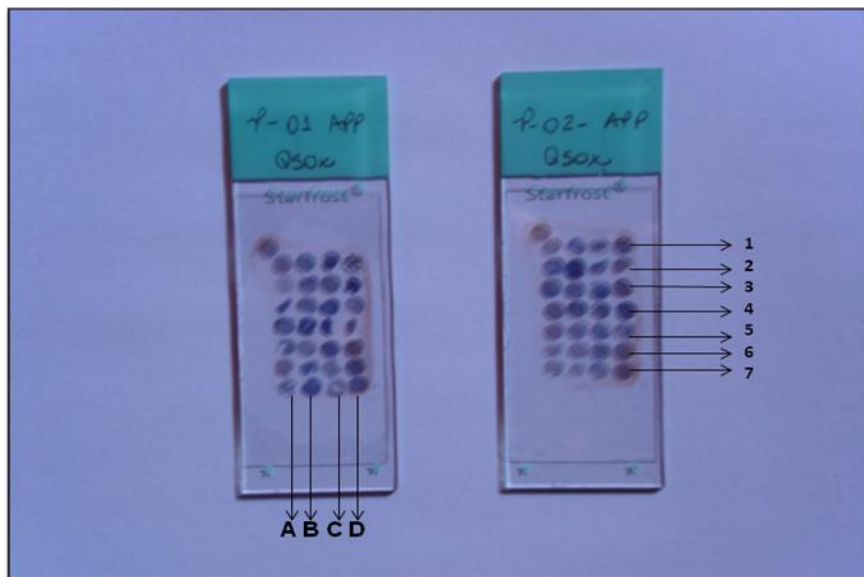


FIGURA 9 – FOTOGRAFIA DE DUAS LAMINAS EM TISSUE MICROARRAYS CORADAS PELO MÉTODO DA IMUNOISTOQUÍMICA COM O ANTICORPO ANTI-QSOX1 APRESENTANDO AS IDENTIFICAÇÕES DOS CASOS NAS LINHAS NUMERADAS E DAS QUATRO AMOSTRAS DE CADA CASO NAS COLUNAS A, B, C E D

4.6. REALIZAÇÃO DOS TESTES DE IMUNOISTOQUÍMICA

Seis cortes de parafina dos cinco blocos receptores obtidos a partir da técnica de TMA foram obtidos com 4µm de espessura. As lâminas preparadas foram submetidas ao processo de imunoistoquímica, sendo submetidas à desparafinização com xilol quente (37°C), à desidratação com banhos sucessivos de álcool e à rehidratação com água. Utilizou-se o álcool metílico e H₂O₂ para o primeiro bloqueio da peroxidase endógena e a água destilada e H₂O₂ para o segundo bloqueio. Procedeu-se à incubação com os seis anticorpos primários escolhidos para o estudo camundongo anti-oncoproteína BCL-2 humana Dako® clone 124 diluição de 1:200, policlonal de coelho BAX anti-humana Dako® diluição de 1:50, monoclonal de camundongo anti-WT1 humana (proteína tumoral 1 de Wilms) Dako® clone 6F-H2 diluição 1:100, anti-VEGFR1 policlonal de rato diluição 1:50 e monoclonal de camundongo proteína p53 anti-humana Dako® clone DO-7 diluição de 1:200 colocar as marcas dos anticorpos e as diluições) nas diluições determinadas, com duração de uma hora, em câmara úmida e temperatura ambiente. O anticorpo secundário (Advance™ HRP Dako®), associado ao polímero dextrana, foi incubado com o material por 30 minutos, também em temperatura ambiente. Para a revelação, foi adicionado complexo DAB e substrato (DAB + líquido DakoCytomation® sistema substrato-cromógeno Dako®) sobre as lâminas e a contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Mayer, seguida de desidratação com banhos de álcool etílico 100% e da clarificação com xilol. Para a montagem das lâminas utilizou-se o Bálsamo do Canadá.

Procederam-se reações concomitantes com controles externos positivos e negativos, estes últimos obtidos através da omissão do anticorpo primário, para cada anticorpo.

4.7. LEITURA DAS LÂMINAS DE IMUNOISTOQUÍMICA

A expressão imunoistoquímica foi avaliada da seguinte maneira:

(a) A expressão das proteínas p53, BCL-2 e BAX foi avaliada contando-se o número de núcleos/áreas perinucleares positivos em 100 células tumorais e no rim normal não tumoral, utilizando-se objetiva de 40x em microscópio Olympus BX30. Para cada um dos componentes histológicos do tumor de Wilms (blastema, epitélio e estroma) 5 campos foram selecionados e avaliados quanto ao número de células positivas em 100 células do componente por campo de grande aumento. A média dos núcleos/áreas perinucleares positivos em cada caso foi calculada considerando-se cada componente isoladamente somando-se o número de células positivas por componente histológico e dividindo-se o produto por 5 e para cada caso como um todo, somando-se o número de células positivas em todos os componentes e dividindo-se o produto por 15.

(b) A expressão das proteínas WT-1 e VEGF-R foi avaliada contando-se todas as células positivas, com citoplasma imunocorado em 100 células tumorais e no rim normal não tumoral, utilizando-se objetiva de 40x em microscópio Olympus BX30. Para cada um dos componentes histológicos do tumor de Wilms (blastema, epitélio e estroma) 5 campos foram selecionados e avaliados quanto ao número de células positivas em 100 células do componente por campo de grande aumento. A média dos núcleos/áreas perinucleares positivos em cada caso foi calculada considerando-se cada componente isoladamente somando-se o número de células positivas por componente histológico e dividindo-se o produto por 5 e para cada caso como um todo, somando-se o número de células positivas em todos os componentes e dividindo-se o produto por 15.

(c) A expressão da QSOX1 por se tratar de um anticorpo de matriz foi avaliada através da morfometria de cores pelo programa analisador de imagem Image Proplus® em computador Dell ® acoplado a uma câmera Sony® e a um microscópio Olympus BX50®. Foram capturadas 12 imagens das três amostras tumorais, sendo seis de áreas blastematosas/epiteliais e seis de áreas estromais, todas em objetiva de 40x. Depois estas 12 imagens foram analisadas pelo software Image Proplus® através do aplicativo morfometria de cores, onde uma amostra da cor a ser analisada era fornecida ao programa, neste caso, a cor castanha, característica da positividade da reação imunoistoquímica. Esta fase realizada, o programa fornecia automaticamente a área corada de castanho, em micrômetros quadrados, isto é, a área positiva para o anticorpo anti-QSOX1. As áreas de cada campo foram compiladas e uma média e somatória dos 12 campos foi calculada.

4.8. COLETA DE DADOS CLÍNICOS E DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS CLINICO-PATOLÓGICAS DO ESTUDO

Os prontuários foram revisados e os seguintes dados clínicos-patológicos foram obtidos para serem somados àqueles os dados microscópicos que foram compilados após as revisões das lâminas histológicas:

- 1 – gênero dos pacientes;
- 2 – idade ao diagnóstico em anos ou meses;
- 3 – os sinais clínicos dos pacientes
- 4 – estadiamento clínico dos pacientes no momento do diagnóstico;
- 5 – a presença ou não de metástases no momento do diagnóstico;
- 6 – a lateralidade da lesão (rim direito ou esquerdo ou ambos);
- 7 – tipo de tratamento efetuado, se cirúrgico isolado, se quimioterápico neoadjuvante seguido de tratamento cirúrgico ou se tratamento cirúrgico seguido de quimioterapia;
- 8 – o peso do tumor;
- 9 – evolução clínica dos pacientes; se vivo e livre de doença ou se foi a óbito/recidiva;
- 10 – tipo histológico da neoplasia;
- 11 – grupo de risco dos pacientes;
- 12 – presença ou não de anaplasia;
- 13 – presença ou não de necrose/alterações regressivas;
- 14 – presença ou não de restos nefrogênicos.

Este estudo conta ainda com seis variáveis imunoistoquímicas:

- 1 – expressão da QSOX1;
- 2 – expressão da proteína p53;
- 3 – expressão do WT1;
- 4 – expressão do BCL-2;
- 5 – expressão do BAX;
- 6 – expressão do VEGFR.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a coleta dos dados clínico-patológicos e imunoistoquímicos procedeu-se à análise estatística. Para a comparação entre dois grupos em relação a variáveis quantitativas empregou-se o método não-paramétrico de Mann-Whitney, enquanto para a comparação de mais grupos foi empregado o teste não-paramétrico de Kruskal- Wallis por tratar-se de uma população com distribuição não normal. Para a avaliação da associação entre variáveis quantitativas foi estimado o coeficiente de correlação de Spearman. Valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística. Os dados foram organizados em planilha Excel e analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

5. RESULTADOS

5.1. DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

A tabela 1 abaixo demonstra alguns dados clínico-patológicos dos pacientes do estudo incluindo os mais relevantes do ponto de vista prognóstico (idade dos pacientes, estadiamento e grupo de risco dos mesmos), que serão posteriormente comparados com os dados de expressão imunoistoquímica dos biomarcadores avaliados neste estudo (QSOX1, p53, WT1, BCL2, BAX e VEGFR1), além disso, a tabela 2 relaciona a estatística descritiva destas variáveis clínico-patológicas.

TABELA 1 – DADOS CLÍNICOS DA POPULAÇÃO EM ESTUDO

	IDADE	G	SINAIS CLÍNICOS	E	TIPO HISTOLÓGICO	RISCO	EVOLUÇÃO
1	51m	F	Massa abdominal	III	Nefroblastoma com anaplasia	Alto	Livre de doença
2	38m	F	Dor abdominal/ vômito/ febre	III	Nefroblastoma misto	Intermediário	Livre de doença
3	22m	F	Aumento de volume abdominal	III	Nefroblastoma misto	Intermediário	Livre de doença
4	17m	F	Massa abdominal	III	Nefroblastoma misto	Intermediário	Livre de doença
5	8m	M	Massa abdominal	I	Nefroblastoma misto	Intermediário	Transferido
6	25m	M	Aumento de volume abdominal	II	Nefroblastoma misto	Intermediário	Livre de doença
7	28m	M	Aumento de volume abdominal	IV	Nefroblastoma misto	Intermediário	Óbito
8	35m	M	Massa abdominal	IV	Nefroblastoma misto	Intermediário	Livre de doença
9	14m	F	Massa abdominal	II	Nefroblastoma tipo blastematoso	Intermediário	Livre de doença
10	108m	M	Massa abdominal	III	Nefroblastoma tipo blastematoso	Alto	Livre de doença
11	7m	F	Massa abdominal	I	Nefroblastoma tipo epitelial	Intermediário	Livre de doença

12	54m	M	Massa abdominal	I	Nefroblastoma tipo blastematoso	Intermediário	Livre de doença
13	35m	F	Massa abdominal	III	Nefroblastoma misto	Intermediário	Óbito
14	52m	F	Massa abdominal	IV	Nefroblastoma misto	Intermediário	Livre de doença
15	17m	M	Febre	I	Nefroblastoma tipo regressivo	Intermediário	Livre de doença
16	12m	F	Massa abdominal	III	Nefroblastoma misto	Intermediário	Livre de doença
17	5 m	F	Inaptência/ aumento de volume abdominal	I	Nefroblastoma tipo epitelial	Intermediário	Óbito
18	7m	F	Massa abdominal	IV	Nefroblastoma tipo blastematoso	Alto	Óbito
19	22m	M	Massa abdominal	IV	Nefroblastoma misto	Intermediário	Livre de doença
20	50m	M	Aumento de volume abdominal	I	Nefroblastoma misto	Intermediário	Livre de doença
21	48m	F	Dor abdominal	II	Nefroblastoma tipo blastematoso	Intermediário	Livre de doença
22	59m	F	Dor abdominal/ aumento de volume abdominal	II	Nefroblastoma tipo blastematoso	Intermediário	Livre de doença
23	60m	F	Aumento de volume abdominal	III	Nefroblastoma tipo regressivo	Intermediário	Livre de doença
24	80m	M	Aumento de volume abdominal	IV	Nefroblastoma com anaplasia difusa	Alto	Óbito
25	50m	M	Hematúria	I	Nefroblastoma misto	Intermediário	Livre de doença
26	24m	F	Aumento de volume abdominal	III	Nefroblastoma misto	Intermediário	Livre de doença
27	21m	M	Não relatado	I	Nefroblastoma misto	Intermediário	Livre de doença
28	30m	M	Aumento de volume abdominal/ vômito	IV	Nefroblastoma tipo epitelial	Intermediário	Livre de doença
29	60m	F	Massa abdominal	III	Nefroblastoma tipo estromal	Intermediário	Transferido

LEGENDA: G – gêneros F/M feminino/masculino, M – metástases.

TABELA 2 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DE TODAS AS VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DO ESTUDO

GÊNERO	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
F	16	55,2
M	13	44,8
TOTAL	29	100,0
IDADE (MESES)	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
≥ 24	18	62,1
< 24	11	37,9
TOTAL	29	100,0
ESTADIAMENTO	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
I	8	27,6
II	4	13,8
III	10	34,5
IV	7	24,1
TOTAL	29	100,0
GRUPO DE RISCO	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
ALTO	4	13,8
INTERMEDIÁRIO	25	86,2
TOTAL	29	100,0
EVOLUÇÃO CLÍNICA	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
LIVRE DE DOENÇA	22	81,5
ÓBITO/RECÍDIVA	5	18,5
TOTAL	27*	100,0
METÁSTASE	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
NÃO	25	86,2
SIM	4	13,8
TOTAL	29	100,0
QT PRE-OP	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
SIM	18	62,1
NÃO	11	37,9
TOTAL	29	100,0
LATERALIDADE	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
UNI	27	93,1
BI	2	6,9
TOTAL	29	100,0
ANAPLASIA	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
PRESENTE E DIFUSA	2	6,9
AUSENTE	27	93,1
TOTAL	29	100,0
NECROSE	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
0	1	3,6
< 65%	22	78,6
65-99%	5	17,9
TOTAL	28**	100,0
RESTOS NEFROGÊNICOS	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
SIM	6	20,7
NÃO	23	79,3
TOTAL	29	100,0
PESO TUMORAL (g)	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
≥ 550	10	40,0

< 550	15	60,0
TOTAL	25**	100,0

LEGENDA: QT PRE-OP = quimioterapia pré-operatória; LATERALIDADE = UNI/BI = tumor unilateral ou bilateral; * = dois casos foram transferidos para outro hospital durante o estudo e o seguimento foi perdido; ** dado que não pode ser recuperado.

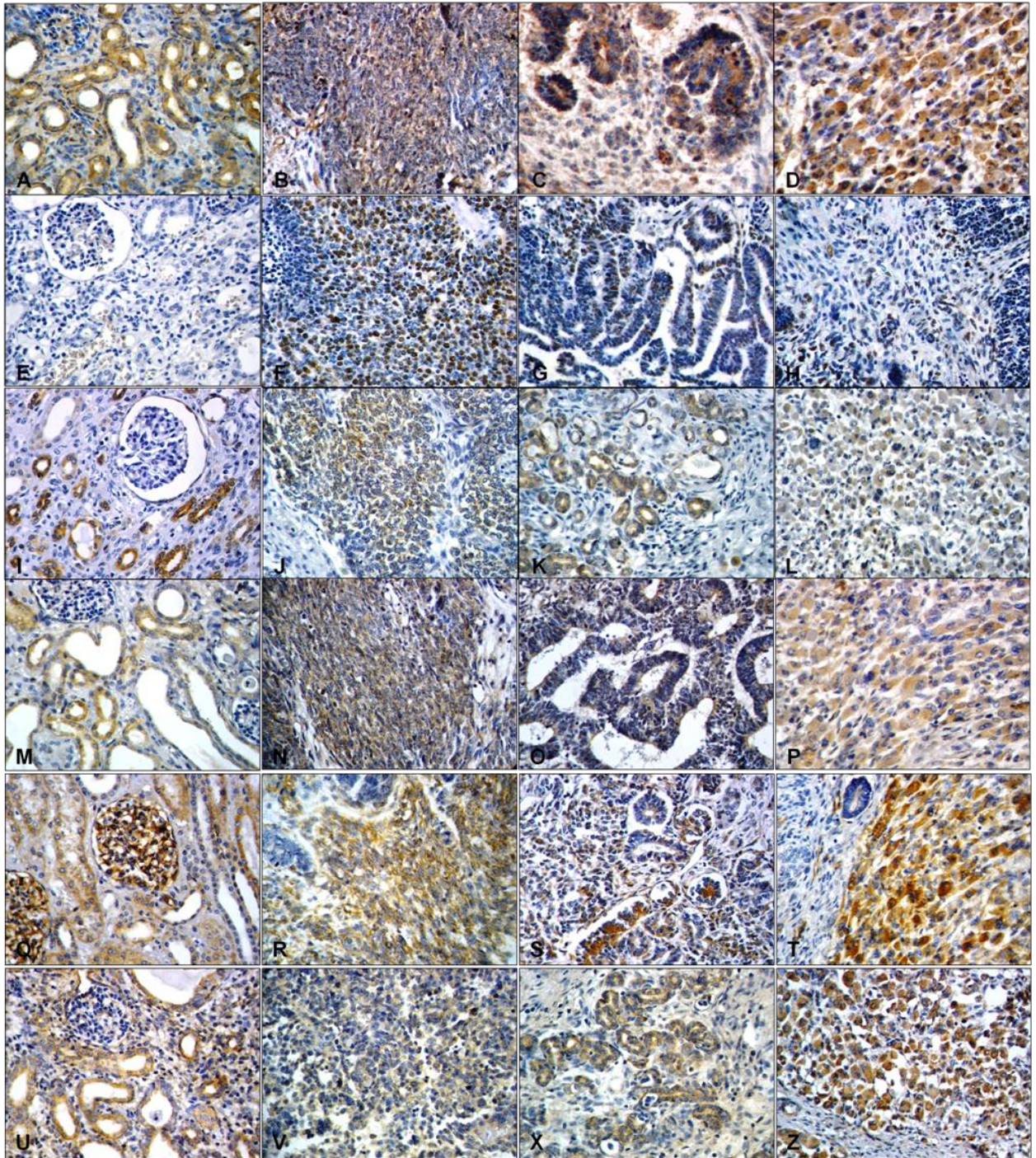
5.2. EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA QSOX1, p53, WT1, BCL2, BAX E VEGFR1

A tabela 3 demonstra os níveis de expressão de cada marcador imunistoquímico estudado com seus valores médios, medianos, máximos e mínimos, além do desvio padrão. A figura 5 demonstra a expressão imunistoquímica dos marcadores em cada componente histológico e na amostra de rim normal não neoplásico.

TABELA 3 – VALORES DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA QSOX1, p53, WT1, BCL2, BAX E VEGFR1

MARCADORES	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO
QSOX1*	15108	14501	3768	27420	5432
p53**	3,2	0,0	0,0	46,5	9,0
BCL-2**	11,6	7,7	0,0	58,8	13,9
BAX**	21,2	17,6	0,5	66,6	18,6
WT1**	12,9	12,5	0,0	32,5	9,6
VEGFR1**	16,1	14,4	0,0	58,2	14,7

NOTA: * valores de área corada pela imunistoquímica em micrômetros quadrados; ** número de células positivas em 15 campos de grande aumento (400x).

FIGURA 10 – IMUNOEXPRESSÃO DE QSOX, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1

LEGENDA: Imunoexpressão de QSOX no tecido renal (A), blastema (B), epitélio (C) e estroma (D); imunoexpressão de p53 no tecido renal (E), blastema (F), epitélio (G) e estroma (H); imunoexpressão de BCL-2 no tecido renal (I), blastema (J), epitélio (K) e estroma (L); imunoexpressão de BAX no tecido renal (M), blastema (N), epitélio (O) e estroma (P); imunoexpressão de WT1 no tecido renal (Q), blastema (R), epitélio (S) e estroma (T); imunoexpressão de VEGFR1 no tecido renal (U), blastema (V), epitélio (X) e estroma (Z) (400x).

5.3. CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA QSOX1 COM AQUELA DOS OUTROS BIOMARCADORES DE PROGRESSÃO TUMORAL (p53, WT1, BCL2, BAX E VEGFR1)

Para avaliação da associação entre QSOX1 e p53, BCL-2, BAX, WT-1 e VEGFR1, estimou-se o coeficiente de correlação de Spearman, testando-se a hipótese nula de inexistência de associação (correlação igual a zero), versus a hipótese alternativa de existência de associação (correlação diferente de zero). Na tabela 4 abaixo são apresentados os resultados obtidos.

TABELA 4 – AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE QSOX1 E p53, BCL-2, BAX, WT-1 E VEGFR1

VARIÁVEIS	N	COEF DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN	VALOR DE <i>p</i>
QSOX1 x p53	29	-0,01	0,979
QSOX1 x BCL-2	29	0,13	0,487
QSOX1 x BAX	29	-0,25	0,197
QSOX1 x WT1	29	-0,17	0,379
QSOX1 x VEGFR1	29	-0,12	0,549

5.4. CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA QSOX1, P53, WT1, BCL2, BAX E VEGFR1 COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA, COM A IDADE DOS PACIENTES, ESTADIAMENTO E GRUPO DE RISCO DOS MESMOS

Foi avaliada a existência de relação entre os resultados imunoistoquímicos e a idade da criança, estadiamento, grupo de risco e evolução clínica das mesmas (vide tabelas 5, 6, 7, 8).

5.4.1. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS EM RELAÇÃO À IDADE DOS PACIENTES

Para cada um dos marcadores, testou-se a hipótese nula de resultados iguais nas duas faixas etárias, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Na tabela 5 abaixo são apresentadas estatísticas descritivas e os valores de p dos testes estatísticos.

TABELA 5 – RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 E A IDADE DOS PACIENTES DIVIDIDA EM MENORES DE 24 MESES OU MAIORES/IGUAIS A 24 MESES

MARCADOR	IDADE	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE P*
QSOX1 MÉDIA	< 24	14000	12735	4393	22586	5391	
	≥ 24	15785	15223	3768	27420	5498	0,412
MÉDIA p53	< 24	2,2	0,0	0,0	16,8	5,0	
	≥ 24	3,7	0,0	0,0	46,5	10,9	0,842
MÉDIA BCL-2	< 24	12,2	7,7	0,0	58,8	16,6	
	≥ 24	11,3	7,0	0,0	40,4	12,5	0,982
MÉDIA BAX	< 24	25,6	19,9	3,0	66,6	21,9	
	≥ 24	18,6	14,8	0,5	58,5	16,4	0,465
MÉDIA WT1	< 24	14,6	12,5	0,0	32,5	9,6	
	≥ 24	11,8	12,2	0,0	29,5	9,7	0,521
MÉDIA VEGFR1	< 24	17,5	16,5	0,0	41,4	13,8	
	≥ 24	15,2	10,5	0,0	58,2	15,6	0,550

* Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$

5.4.2. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS EM RELAÇÃO AO ESTADIAMENTO DOS PACIENTES

Para cada um dos marcadores, testou-se a hipótese nula de resultados iguais em todas as classificações de estadiamento, versus a hipótese alternativa de pelo menos uma classificação de estadiamento com resultados diferentes das demais. Na tabela 6 abaixo são apresentadas estatísticas descritivas e os valores de p dos testes estatísticos.

TABELA 6 – RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE MARCADORES QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 E O ESTADIAMENTO

MARCADOR	ESTÁDIO	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE P*
QSOX1	I	13085	12499	4393	22586	5667	0,189
	II	17180	16560	13178	22422	4193	
	III	17148	17103	3768	27420	6387	
	IV	13319	12822	9227	18562	3353	
p53	I	2,4	0	0	16,8	5,9	0,562
	II	1,9	1,8	0	4,2	2,2	
	III	5,7	0	0	46,5	14,5	
	IV	1,1	0	0	4,2	1,9	
BCL-2	I	16,2	9,0	0	58,8	4,9	0,260
	II	1,6	0,8	0	4,9	6,9	
	III	11,4	11,9	0	20,6	4,4	
	IV	12,6	4,3	0	40,4	5,2	
BAX	I	32,9	34,1	9,2	66,6	19,2	0,054
	II	12,6	4,1	1,1	40,9	19,1	
	III	11,3	10,7	0,5	24,2	8,5	
	IV	27	19,9	1,7	58,5	21,4	
WT1	I	17,6	18,9	9,4	23,6	5,3	0,113
	II	5,2	4,2	0	12,5	6,3	
	III	12,3	12,6	0	29,5	11	
	IV	12,6	11,3	0,6	32,5	11,2	
VEGFR1	I	21,2	21,6	1,8	36,4	11,9	0,079
	II	5,2	2,1	0	16,5	7,7	
	III	9,8	10,5	0	20,9	7,3	
	IV	25,4	29,2	0	58,2	18,8	

* Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$

5.4.3. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS EM RELAÇÃO AO GRUPO DE RISCO DOS PACIENTES

Para cada um dos marcadores, testou-se a hipótese nula de resultados iguais nas duas classificações de grupo de risco, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Na tabela 7 abaixo são apresentadas estatísticas descritivas e os valores de p dos testes estatísticos.

TABELA 7 – RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 E O GRUPO DE RISCO

MARCADOR	GRUPO DE RISCO	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE P*
QSOX1	Intermediário	14845	14501	3768	27420	5525	0,647
	Alto	16751	15289	12724	23704	5196	
p53	Intermediário	1,8	0,0	0,0	16,8	3,6	0,879
	Alto	11,6	0,0	0,0	46,5	23,3	
BCL-2	Intermediário	12,6	8,4	0,0	58,8	14,4	0,227
	Alto	5,6	1,9	0,0	18,7	8,9	
BAX	Intermediário	22,7	17,6	1,1	66,6	19,2	0,341
	Alto	12,1	11,5	0,5	25,0	12,2	
WT1	Intermediário	13,7	12,7	0,0	32,5	9,6	0,253
	Alto	7,6	6,2	0,0	17,8	8,5	
VEGFR1	Intermediário	15,9	15,6	0,0	41,4	12,5	0,444
	Alto	17,2	5,3	0,0	58,2	27,8	

* Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$

5.4.4. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS EM RELAÇÃO À EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES

Para cada um dos marcadores, testou-se a hipótese nula de resultados iguais nas duas classificações de evolução clínica, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Na tabela 8 abaixo são apresentadas estatísticas descritivas e os valores de p dos testes estatísticos.

TABELA 8 – RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 E A EVOLUÇÃO CLÍNICA

MARCADOR	EVOLUÇÃO CLÍNICA	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE P*
QSOX1	Livre de doença	14732	14471	3768	23704	4781	
	Óbito/Recidiva	12802	12822	4393	18126	5219	0,564
P53	Livre de doença	4,0	0,0	0,0	46,5	10,2	
	Óbito/Recidiva	0,8	0,0	0,0	3,8	1,7	0,411
BCL-2	Livre de doença	13,6	9,4	0,0	58,8	15,1	
	Óbito/Recidiva	4,3	0,0	0,0	17,1	7,4	0,075
BAX	Livre de doença	22,2	11,7	0,5	66,6	21,2	
	Óbito/Recidiva	19,0	19,9	9,2	25,0	6,2	0,786
WT1	Livre de doença	11,6	10,9	0,0	32,5	9,8	
	Óbito/Recidiva	15,2	19,0	1,2	23,6	9,1	0,344
VEGFR1	Livre de doença	15,6	15,2	0,0	41,4	12,9	
	Óbito/Recidiva	16,5	6,9	0,0	58,2	24,1	0,564

* Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$

5.5. CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA QSOX1, P53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 COM AS OUTRAS VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DO ESTUDO (PESO TUMORAL, PRESENÇA DE ANAPLASIA E PRESENÇA DE QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE)

5.5.1. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS EM RELAÇÃO AO PESO TUMORAL

Para cada um dos marcadores, testou-se a hipótese nula de resultados iguais nas duas classificações do peso tumoral, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Na tabela 9 abaixo são apresentadas estatísticas descritivas e os valores de p dos testes estatísticos.

TABELA 9 – RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 E O PESO TUMORAL

MARCADOR	PESO TUMORAL	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE P*
QSOX1 MÉDIA	< 550g	15029,9	13178,2	8914,5	22586,2	4479,4	
	≥ 550g	15169,7	15892,0	3767,7	23703,6	5490,0	0,617
MÉDIA p53	< 550g	2,2	0	0	16,8	4,4	
	≥ 550g	5,9	1,0	0	46,5	14,3	0,625
MÉDIA BCL-2	< 550g	17,2	13,2	0	58,8	16,7	
	≥ 550g	6,6	4,0	0	18,6	6,7	0,095
MÉDIA BAX	< 550g	29,9	25	1,1	66,6	20,6	
	≥ 550g	12,4	10,9	0,5	35,9	11,6	0,026
MÉDIA WT1	< 550g	14,6	12,5	0	32,5	9,4	
	≥ 550g	9,7	8,2	0	21,6	9,4	0,243
MÉDIA VEGFR1	< 550g	24,2	25,5	0	58,2	15,6	
	≥ 550g	9,1	8,7	0	17,7	6,6	0,008

* Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$

5.5.2. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS EM RELAÇÃO À ANAPLASIA

Para cada um dos marcadores, testou-se a hipótese nula de resultados iguais nas duas classificações de anaplasia, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Na tabela 10 abaixo são apresentadas estatísticas descritivas e os valores de p dos testes estatísticos.

TABELA 10 – RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 E A ANAPLASIA

MARCADOR	ANAPLASIA	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE P*
QSOX1 MÉDIA	Ausente	15094,6	14500,9	3767,7	27420,3	1064,5	
	Presente	15289,1	15289,1	12822,3	17755,9	3911,4	0,931
MÉDIA p53	Ausente	1,6	0	0	16,8	3,5	
	Presente	23,2	23,2	0	46,5	32,9	0,401
MÉDIA BCL-2	Ausente	11,8	7,7	0	58,8	14,1	
	Presente	9,3	9,3	0	18,6	13,1	0,730
MÉDIA BAX	Ausente	21,7	17,6	0,5	66,6	3,6	
	Presente	14,0	14	3	25	13,3	0,763
MÉDIA WT1	Ausente	13,1	12,5	0	32,5	9,6	
	Presente	9,5	9,5	1,2	17,8	11,7	0,730
MÉDIA VEGFR1	Ausente	14,7	14,4	0	41,4	12,7	
	Presente	34,4	34,4	10,6	58,2	33,6	0,301

* Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$

5.5.3. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS EM RELAÇÃO À QUIMIOTERAPIA PRÉ-OPERATÓRIA

Para cada um dos marcadores, testou-se a hipótese nula de resultados iguais nas duas classificações de quimioterapia pré-operatória, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Na tabela 11 abaixo são apresentadas estatísticas descritivas e os valores de p dos testes estatísticos.

TABELA 11 – RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 E A QUIMIOTERAPIA PRÉ-OPERATÓRIA

MARCADOR	QT PRÉ-OPERATÓRIA	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE P*
QSOX1 MÉDIA	Não	15886,2	15945,3	3767,7	22586,2	5733,0	
	Sim	14632,4	13263,7	4392,7	27420,3	5351,1	0,356
MÉDIA p53	Não	2,2	2,2	0	6,2	2,0	
	Sim	3,7	0	0	46,5	11,4	0,020
MÉDIA BCL-2	Não	6,9	4,8	0	20,6	4,1	
	Sim	14,4	11,0	0	58,8	3,2	0,321
MÉDIA BAX	Não	13,5	10,6	1,2	40,9	11,2	
	Sim	25,9	23,8	0,5	66,6	20,8	0,115
MÉDIA WT1	Não	10,0	7,5	0	29,5	10,2	
	Sim	14,6	15,1	0	32,5	8,9	0,177
MÉDIA VEGFR1	Não	12,0	14,4	0	31,2	9,5	
	Sim	18,6	13,2	0	58,2	16,8	0,457

* Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$

LEGENDA: QT PRÉ-OPERATÓRIA: quimioterapia pré-operatória

5.6. CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA QSOX1, P53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS TUMORAIS (BLASTEMA, EPITÉLIO E ESTROMA) COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA, ESTADIAMENTO E GRUPO DE RISCO DOS MESMOS E AS VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DO ESTUDO (PRESENÇA DE ANAPLASIA E PRESENÇA DE QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE)

Foi avaliada a existência de relação entre os resultados imunoistoquímicos e estadiamento, grupo de risco, evolução clínica das mesmas e variáveis clínico patológicas, como presença de anaplasia e quimioterapia neoadjuvante (vide tabelas 12, 13, 14, 15 e 16).

5.6.1. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS EM RELAÇÃO AO GRUPO DE RISCO DOS PACIENTES

Para cada um dos marcadores, testou-se a hipótese nula de resultados iguais nas duas classificações de grupo de risco, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Na tabela 12 abaixo são apresentadas estatísticas descritivas e os valores de p dos testes estatísticos.

TABELA 12 – RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS E O GRUPO DE RISCO

MARCADOR	GRUPO DE RISCO	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE P*
QSOX1							
Blastema/epitélio	Intermediário	9700,5	9163,1	2423,7	27634,0	5067,3	0,486
	Alto	7914,3	8160,0	5653,1	9684,2	1999,2	
Estroma	Intermediário	20639,4	20272,5	4912,6	36350,7	8208,3	0,293
	Alto	25588,5	24246,2	16138,4	37723,0	9657,2	
p53							
Blastema	Intermediário	2,0	0	0	10,6	3,2	0,874
	Alto	15,2	0	0	60,8	30,4	
Epitélio	Intermediário	1,3	0	0	16,8	3,5	0,317
	Alto	23,2	23,2	0	46,4	32,8	
Estroma	Intermediário	0,9	0	0	13,8	2,9	0,572
	Alto	10,8	0	0	32,4	18,7	
BCL-2							
Blastema	Intermediário	6,0	2,5	0	33,2	9,1	0,771
	Alto	13,8	9,6	0	36,2	17,4	
Epitélio	Intermediário	19,0	4,8	0	86,2	26,4	0,694
	Alto	8,6	8,6	0	17,2	12,1	
Estroma	Intermediário	8,3	1,6	0	37,2	12,1	0,613
	Alto	10,2	10,2	0,8	19,6	13,2	
BAX							
Blastema	Intermediário	18,3	3,2	0	80,8	26,1	0,886
	Alto	14,4	12,5	0	32,8	16,9	
Epitélio	Intermediário	36,4	34	0	83,2	25,9	0,295
	Alto	16,5	16,5	0	33	23,3	
Estroma	Intermediário	12,5	8	0	68	14,8	0,376
	Alto	4,8	4,4	1	9	4,0	

WT1							
Blastema	Intermediário	11,4	2,6	0	54,4	16,6	0,726
	Alto	7,8	3,2	0	24,8	11,7	
Epitélio	Intermediário	8,9	3,1	0	41,6	11,7	0,519
	Alto	3,3	3,3	0	6,6	4,6	
Estroma	Intermediário	18,8	12,4	0	81,8	22,6	0,646
	Alto	15,6	0	0	46,8	27,0	
VEGFR1							
Blastema	Intermediário	0,0	0	0	0	0,0	0,016
	Alto	14,5	0	0	58,2	29,1	
Epitélio	Intermediário	35,0	36,5	0	86	28,8	0,444
	Alto	5,6	5,6	5,6	5,6	-	
Estroma	Intermediário	11,8	0,6	0	74,6	19,5	0,637
	Alto	8,8	0	0	26,4	15,2	

* Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$

5.6.2. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS EM RELAÇÃO AO ESTADIAMENTO DOS PACIENTES

Para cada um dos marcadores, testou-se a hipótese nula de resultados iguais em todas as classificações de estadiamento, versus a hipótese alternativa de pelo menos uma classificação de estadiamento com resultados diferentes das demais. Na tabela 13 abaixo são apresentadas estatísticas descritivas e os valores de p dos testes estatísticos.

TABELA 13 – RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS E O ESTADIAMENTO

MARCADOR	ESTÁDIO	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE P*
QSOX1							
Blastema/	I	9286	9263	4393	12916	2742	0,678
	II	10549	11409	6379	13001	3115	
epitélio	III	10121	8295	2424	27634	7165	
	IV	8068	7925	3086	14184	3478	

Estroma	I	18668	15675	4913	36351	10039	
	II	23810	22174	19048	31844	5837	
	III	24179	24562	5112	37723	9315	
	IV	18570	16138	11103	27962	6015	0,210
p53							
Blastema	I	0,8	0	0	4,8	1,9	
	II	4,5	3,7	0	10,6	5,3	
	III	7,4	0	0	60,8	18,9	
	IV	1,7	0	0	8,4	3,2	0,302
Epitélio							
Estroma	I	2,1	0	0	16,8	5,9	
	II	0,7	0	0	3	1,5	
	III	6,4	0,6	0	46,4	16,2	
	IV	1,2	0	0	4,6	2	0,622
BCL-2							
Blastema	I	0,3	0	0	1,6	0,6	
	II	0,6	0,2	0	2	0,9	
	III	4,6	0	0	32,4	10,7	
	IV	0,8	0	0	3,4	1,4	0,785
Epitélio							
Estroma	I	9,6	7,3	0	33,2	12,2	
	II	0,7	0	0	3	1,5	
	III	10,1	3,5	0	36,2	11,8	
	IV	4,4	0	0	25,6	10,4	0,057
Epitélio							
Estroma	I	19,8	8	0	60,4	25,2	
	II	0	0	0	0	0	
	III	19,2	14,6	0	58,6	21,8	
	IV	27,1	7,9	0	86,2	36,9	0,096
BAX							
Blastema	I	9,1	2,3	0	29,8	12,8	
	II	4	0,8	0	14,6	7,1	
	III	9,8	3	0	37,2	13	
	IV	8,9	0,8	0	34	14,5	0,709
Epitélio							
Estroma	I	27,8	21,4	0	62	28,1	
	II	17,6	0	0	70,4	35,2	
	III	6,9	0	0	35,4	11,6	
	IV	24,9	25	0	80,8	28,7	0,229
Epitélio							
Estroma	I	52,1	49,3	18	80,4	19,7	
	II	8,1	3	0	21,2	11,5	
	III	19,1	17,4	0	53,6	18,2	
	IV	43,4	39,7	5	83,2	27,4	0,016
WT1							
Blastema	I	15,3	14,9	7	25,8	7,3	
	II	4,4	3,2	0	11,4	4,9	
	III	10,1	7,4	0	31,4	10,1	
	IV	15,6	5,4	0	68	25,9	0,167
Blastema	I	28,6	27,7	4,8	54,4	20,8	0,002

	II	0	0	0	0	0	
	III	4,2	0,1	0	34	10,6	
	IV	11,6	11,6	0	24,8	9,5	
Epitélio	I	13,6	14,1	0	32,6	11,4	
	II	2,9	0	0	11,75	5,9	
	III	5,8	3,3	0	24	8,3	
	IV	9,1	0,3	0	41,6	16,7	0,182
Estroma	I	10,4	6,2	0	36,6	14,3	
	II	13	7,2	0	37,6	17,7	
	III	24,2	22,6	0	57	23	
	IV	20,5	5,4	0	81,8	32,3	0,588
VEGFR1							
Blastema	I	0	0	0	0	0	
	II	0	0	0	0	0	
	III	0	0	0	0	0	
	IV	8,3	0	0	58,2	22	0,414
Epitélio	I	47	46,8	1,8	82,6	26,4	
	II	15,9	6,9	0	49,6	22,8	
	III	19,7	5,6	0	59,4	24,7	
	IV	50,1	49,6	19,6	86	30,4	0,090
Estroma	I	11,6	3,7	0	35,4	15,6	
	II	0	0	0	0	0	
	III	12,1	3,9	0	46,8	15,9	
	IV	17,9	1,1	0	74,6	30,3	0,263

* Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$

5.6.3. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS EM RELAÇÃO À EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES

Para cada um dos marcadores, testou-se a hipótese nula de resultados iguais nas duas classificações de evolução clínica, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Na tabela 14 abaixo são apresentadas estatísticas descritivas e os valores de p dos testes estatísticos.

TABELA 14 – RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS E A EVOLUÇÃO CLÍNICA

MARCADOR	EVOLUÇÃO CLÍNICA	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE P*
QSOX1							
Blastema/epitélio	Livre de doença	8959,1	9312,3	2423,7	14184,3	3345,9	0,574
	Óbito/Recidiva	8122,7	6961,3	4392,7	14100,2	3840,7	
Estroma	Livre de doença	20505,8	19710,4	4912,6	37723,0	8716,2	0,776
	Óbito/Recidiva	20753,6	20973,2	16138,4	24929,3	3724,3	
p53							
Blastema	Livre de doença	5,0	0	0	60,8	13,2	0,357
	Óbito/Recidiva	0,8	0	0	3,4	1,7	
Epitélio	Livre de doença	3,7	0	0	46,4	10,7	0,817
	Óbito/Recidiva	1,1	0	0	4,6	2,3	
Estroma	Livre de doença	2,4	0	0	32,4	7,4	0,785
	Óbito/Recidiva	1,1	0	0	3,4	1,9	
BCL-2							
Blastema	Livre de doença	9,0	3,2	0	36,2	11,6	0,130
	Óbito/Recidiva	0,6	0,3	0	2	0,9	
Epitélio	Livre de doença	6,2	0,8	0	34	10,0	0,782
	Óbito/Recidiva	18,6	18,6	0	37,2	26,3	
Estroma	Livre de doença	6,2	0,8	0	34	10,0	0,782
	Óbito/Recidiva	18,6	18,6	0	37,2	26,3	
BAX							
Blastema	Livre de doença	18,2	0	0	80,8	26,9	0,163
	Óbito/Recidiva	24,1	28,9	3,2	35,4	14,6	
Epitélio	Livre de doença	33,7	26,6	0	83,2	28,5	0,684
	Óbito/Recidiva	36,0	39,5	18,8	46,4	13,0	
Estroma	Livre de doença	11,5	7	0	68	15,4	0,895
	Óbito/Recidiva	7,8	4,4	3,2	16	7,0	
WT1							
Blastema	Livre de doença	9,1	1,6	0	54,4	14,8	0,378
	Óbito/Recidiva	13,1	13,8	0	24,8	11,8	
Epitélio	Livre de doença	7,7	5,8	0	32,6	9,3	0,690
	Óbito/Recidiva	16,3	11,8	0	41,6	20,2	
Estroma	Livre de doença	17,2	10,8	0	81,8	22,0	0,818
	Óbito/Recidiva	19,0	0	0	57	32,9	
VEGFR1							
Blastema	Livre de doença	0,0	0	0	0	0,0	0,021
	Óbito/Recidiva	14,5	0	0	58,2	29,1	
Epitélio	Livre de doença	38,3	41,8	0	86	28,5	0,067
	Óbito/Recidiva	7,4	1,8	0	20,6	11,4	
Estroma	Livre de doença	9,2	0	0	74,6	18,0	0,962
	Óbito/Recidiva	15,6	0	0	46,8	27,0	

* Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, p<0,05

5.6.4. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS EM RELAÇÃO À ANAPLASIA

Para cada um dos marcadores, testou-se a hipótese nula de resultados iguais nas duas classificações de anaplasia, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Na tabela 15 abaixo são apresentadas estatísticas descritivas e os valores de p dos testes estatísticos.

TABELA 15 – RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS E A ANAPLASIA

MARCADOR	ANAPLASIA	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE P*
QSOX1							
Blastema/epitélio	Ausente	9550,0	9163,1	2423,7	27634,0	4930,4	
	Presente	8160,0	8160,0	6813,8	9506,2	1903,7	0,667
Estroma	Ausente	21264,0	20272,5	4912,6	37723,0	8560,6	
	Presente	22418,2	22418,1	16138,4	28697,9	8880,8	0,721
p53							
Blastema	Ausente	1,9	0	0	10,6	3,1	
	Presente	30,4	30,4	0	60,8	42,9	0,392
Epitélio	Ausente	1,2	0	0	16,8	3,4	
	Presente	46,4	46,4	46,4	46,4	-	0,041
Estroma	Ausente	0,9	0	0	13,8	2,8	
	Presente	32,4	32,4	32,4	32,4	-	0,032
BCL-2							
Blastema	Ausente	7,0	2,5	0	36,2	10,7	
	Presente	9,6	9,6	0	19,2	13,5	1,0
Epitélio	Ausente	18,3	3,4	0	86,2	26,1	
	Presente	17,2	17,2	17,2	17,2	-	0,540
Estroma	Ausente	8,0	1,2	0	37,2	12,0	
	Presente	19,6	19,6	19,6	19,6	-	0,327
BAX							
Blastema	Ausente	18,2	3,2	0	80,8	25,5	
	Presente	12,5	12,5	0	25	17,6	0,808
Epitélio	Ausente	36,2	33	0	83,2	25,3	
	Presente	0,0	0	0	0	-	0,129
Estroma	Ausente	11,8	7	0	68	14,4	
	Presente	9,0	9	9	9	-	0,789

WT1							
Blastema	Ausente	11,5	2,6	0	54,4	16,3	
	Presente	3,2	3,2	0	6,4	4,5	0,601
Epitélio	Ausente	8,6	1,2	0	41,6	11,6	
	Presente	6,6	6,6	6,6	6,6	-	0,836
Estroma	Ausente	17,3	10,8	0	81,8	22,3	
	Presente	46,8	46,8	46,8	46,8	-	0,187
VEGFR1							
Blastema	Ausente	0,0	0	0	0	0,0	
	Presente	29,1	29,1	0	58,2	41,1	0,0004
Epitélio	Ausente	35,0	36,5	0	86	28,8	
	Presente	5,6	5,6	5,6	5,6	-	0,444
Estroma	Ausente	10,8	0	0	74,6	18,9	
	Presente	26,4	26,4	26,4	26,4	-	0,285

* Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$

5.6.5. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS EM RELAÇÃO À QUIMIOTERAPIA PRÉ-OPERATÓRIA

Para cada um dos marcadores, testou-se a hipótese nula de resultados iguais nas duas classificações de quimioterapia pré-operatória, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Na tabela 16 abaixo são apresentadas estatísticas descritivas e os valores de p dos testes estatísticos.

TABELA 16 – RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE QSOX1, p53, BCL-2, BAX, WT1 E VEGFR1 NOS COMPONENTES HISTOLÓGICOS E A QUIMIOTERAPIA PRÉ-OPERATÓRIA

MARCADOR	QT PRÉ-OPERATÓRIA	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE P*
QSOX1							
Blastema/epitélio	Não	8313,3	7924,8	2423,7	13001,1	3528,5	
	Sim	10151,4	9483,9	3085,9	27634,0	5378,0	0,418
Estroma	Não	23459,1	24929,3	5111,8	36350,7	9702,5	
	Sim	19979,4	19794,6	4912,6	37723,0	7463,2	0,289
p53							
Blastema	Não	3,4	3,8	0	8,4	3,0	
	Sim	4,4	0	0	60,8	15,2	0,010
Epitélio	Não	1,4	1,2	0	4,6	1,5	
	Sim	4,2	0	0	46,4	12,4	0,075
Estroma	Não	1,8	0	0	13,8	4,1	
	Sim	2,2	0	0	32,4	8,3	0,118
BCL-2							
Blastema	Não	2,5	0,6	0	10,8	3,6	
	Sim	10,6	3,6	0	36,2	12,8	0,176
Epitélio	Não	14,3	2,4	0	58,6	20,1	
	Sim	21,1	6,2	0	86,2	29,3	0,652
Estroma	Não	3,9	0,4	0	20,2	6,9	
	Sim	12,1	5,4	0	37,2	14,0	0,087
BAX							
Blastema	Não	8,2	0	0	70,4	20,8	
	Sim	24,3	21,1	0	80,8	25,7	0,109
Epitélio	Não	25,5	19,6	0	53,6	18,5	
	Sim	41,3	42,1	0	83,2	28,8	0,177
Estroma	Não	5,5	3,6	0	16	5,6	
	Sim	16,2	9	1	68	16,8	0,019
WT1							
Blastema	Não	10,6	1,6	0	49,6	16,9	
	Sim	11,0	4,3	0	54,4	15,5	0,879
Epitélio	Não	9,2	1,2	0	41,6	13,5	
	Sim	8,0	5	0	32,6	10,0	0,893
Estroma	Não	10,1	3,4	0	37,6	13,2	
	Sim	24,5	14,4	0	81,8	26,3	0,257
VEGFR1							
Blastema	Não	0,0	0	0	0	0,0	
	Sim	3,6	0	0	58,2	14,5	0,407
Epitélio	Não	31,3	40,4	0	59,4	22,0	
	Sim	35,9	31,5	0	86	33,9	0,890
Estroma	Não	4,6	0	0	35,4	10,4	
	Sim	16,4	1,6	0	74,6	22,1	0,331

* Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, p<0,05

6. DISCUSSÃO

6.1. O ARRANJO TECIDUAL EM MATRIZ (TMA)

O arranjo tecidual em matriz (TMA) é uma técnica de construção de blocos de parafina (blocos receptores) compostos por fragmentos cilíndricos de tecidos ou tumores obtidos a partir dos blocos de parafina originais (blocos doadores), descrita por Kononen *et al.* (1998). Através desta técnica, um único bloco receptor pode ser formado por dezenas a centenas de tumores (HOOS *et al.*, 2001).

O TMA foi desenhado com o propósito de facilitar a análise de tecidos de forma rápida e eficiente (HOOS *et al.*, 2001). Vários estudos validam a utilização do TMA em pesquisas de fatores prognósticos e de progressão tumoral, com inúmeras vantagens das quais se destacam a economia de reagentes nas reações imunoistoquímicas, a uniformização das reações, a facilitação do trabalho em linhas de pesquisa, a preservação do bloco de parafina e o fornecimento de amostras teciduais para estudo (HOOS *et al.*, 2001; BUBENDORF *et al.*, 2001; SIMON; MIRLACHER; SAUTER, 2004; ANDRADE *et al.*, 2007). Se em nosso trabalho tivéssemos optado por realizar o estudo imunoistoquímico nas amostras convencionais, teríamos realizado entre 174 e 696 reações imunoistoquímicas. Porém, ao utilizar os cinco blocos de TMA obtidos dos casos em estudo, apenas 30 reações foram realizadas.

A seleção da área de interesse no bloco doador deve conter regiões com variação do aspecto morfológico que facilitem a avaliação de elementos representativos do tumor, reflitam seu imunofenótipo e atendam aos objetivos do estudo (KONONEN *et al.*, 1998; HOOS *et al.*, 2001). Tumores com áreas morfológicamente distintas são freqüentes e para este grupo de tumores há necessidade de identificar as diferentes áreas separadamente, como ocorre em carcinomas prostáticos, carcinomas de células renais e tumores de células germinativas (CHANDLER; HOULSTON; LANDBERG, 2011). O mesmo ocorre nos tumores de Wilms selecionados para o nosso estudo. Os tumores de Wilms são compostos por proporções variáveis dos três componentes histológicos (blastema,

epitélio e estroma). Para obtermos blocos de TMA representativos dos três componentes, selecionamos áreas compostas por cada um dos componentes isoladamente, semelhante à metodologia utilizada por Maschietto *et al.* (2008), e adicionamos uma área de rim não tumoral. Desta forma, representamos em nossos blocos de TMA a heterogeneidade dos tumores de Wilms e incluímos excelente controle interno para as reações imunoistoquímicas através das amostras de rim não tumoral.

A construção de TMAs pode ser feita através de equipamentos manuais ou automáticos disponíveis comercialmente, porém de alto custo. Equipamentos e técnicas alternativas são descritas na literatura para reduzir os custos (ROCHA *et al.*, 2006). Para a construção dos TMAs em nosso trabalho utilizamos um aparelho de punch de pele número 3. Os cilindros das amostras tumorais foram orientados e organizados em molde metálico graticulado para inclusão em parafina. Os cortes dos cinco TMAs resultantes para a realização da reação imunoistoquímica apresentaram alinhamento adequado dos cilindros e preservação dos discos nas lâminas confeccionadas.

6.2. MÉTODO

O estudo imunoistoquímico é uma importante ferramenta para a avaliação de biomarcadores e sofre variações de fatores técnicos e de interpretação das reações. A avaliação das reações inclui a localização celular (membrana, citoplasma e/ou núcleo) ou estromal da marcação, a intensidade e extensão da positividade (WALKER, 2006).

A avaliação da heterogeneidade da positividade é variável e pode ser efetuada contando-se 1000 células positivas em dez campos de grande aumento para fornecer uma porcentagem de células positivas. Porém, contagens menos precisas de células positivas e subdivisões em grupos de diferentes variações percentuais são utilizadas com frequência, dificultando as comparações entre os resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisa. Recomenda-se que em

arranjos teciduais em matriz contagens mais precisas e categóricas sejam aplicadas, por se tratar de amostras menores (WALKER, 2006).

Para proceder à leitura de cinco marcadores imunoistoquímicos (WT1, p53, BCL-2, BAX e VEGFR-1) incluídos neste trabalho foram selecionados cinco campos de grande aumento por componente histológico do tumor de Wilms. Por tratar-se o tumor de Wilms de uma neoplasia heterogênea na sua composição histológica, estes cinco campos foram selecionados para garantir a uniformidade do número de campos representativos de cada componente.

A leitura da QSOX1 foi realizada com o auxílio de um capturador e analisador de imagens por se tratar de um marcador de matriz de difícil quantificação em microscópio convencional.

6.3. ASPECTOS CLÍNICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS

O tumor de Wilms é a neoplasia renal mais comum na faixa etária pediátrica e de acordo com outros estudos, 80% dos casos são diagnosticados antes dos cinco anos de idade (BRESLOW *et al.*, 1988). Os esforços dos grupos cooperativos melhoraram drasticamente o prognóstico dos pacientes portadores de tumor de Wilms. Porém, de 10 a 15% dos tumores de Wilms podem recorrer com redução da sobrevida a índices inferiores a 30%. A exposição dos pacientes a agentes radio e quimioterápicos não é inócuo e pode trazer seqüelas a curto e longo prazo. Para evitar a exposição desnecessária a estes agentes, os pacientes são estratificados segundo o estágio e o grupo de risco, que orientam o tratamento a ser realizado. Mas, nem todos os pacientes incluídos em um mesmo estágio ou grupo de risco evoluem da mesma forma. Enquanto alguns recidivam mesmo em estádios precoces, outros em estágio avançado não. Pacientes de baixo risco poderiam receber tratamento menos intenso, reduzindo a exposição destes pacientes a essas modalidades de tratamento. A pesquisa de biomarcadores pode contribuir para definir grupos de risco e orientação do tratamento (REINHARD *et al.*, 2008).

Segundo o registro de dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), entre 1998 e 2002, dez novos casos de nefroblastoma foram diagnosticados em Curitiba com incidência ajustada de 4,67 casos por milhão de crianças e adolescentes. Considerando-se a incidência de nefroblastomas em Curitiba, os 29 casos selecionados para este estudo abrangem todos os casos diagnosticados no período incluído no estudo.

Na população selecionada para este trabalho 86,21% dos pacientes tinham idade inferior a 5 anos corroborando os achados da literatura. A idade média por ocasião do diagnóstico é semelhante à relatada na literatura (2,98 anos) (WEIRICH *et al.*, 2004; BRESLOW *et al.*, 1993; REINHARD *et al.*, 2008).

A frequência de nefroblastomas é aproximadamente igual em ambos os sexos, sendo que alguns estudos mostram discreto predomínio no sexo feminino, o que também foi visto em nossa população de estudo (BRESLOW *et al.*, 1988; BRESLOW *et al.*, 1993). Porém, ao contrário dos relatos da literatura, a idade média ao diagnóstico dos pacientes do sexo masculino foi de 40,6 meses, enquanto para o sexo feminino foi de 31,9 meses (FRANCO *et al.*, 1991; BRESLOW *et al.*, 1988).

O tumor de Wilms pode apresentar-se bilateralmente em 5,6% dos pacientes (RITCHEY *et al.*, 2005), dado concordante com os 2 pacientes englobados neste estudo (6,9%). Destes, 1 paciente apresentava associação com síndrome de Denny-Drash. Os tumores de Wilms bilaterais podem ser metacrônicos ou sincrônicos. O manejo de tumores metacrônicos e sincrônicos é desafiador e inclui procedimentos terapêuticos que visam reduzir ao máximo a extensão da ressecção, tentando preservar parênquima renal funcionante. A conduta nestes casos varia conforme os centros e a experiência da equipe médica e emprega quimioterapia e radioterapia pré-operatória para reduzir o volume tumoral permitindo cirurgias mais conservadoras como nefrectomias parciais e tumorectomias (RITCHEY *et al.*, 2005; SHAMBERGER *et al.*, 2006; DAVIDOFF *et al.*, 2008).

Entre as apresentações clínicas a presença de massa abdominal foi predominante, estando presente em 82,76% dos casos de forma isolada (55,17%) ou associada a sintomas/sinais como dor abdominal, febre, emagrecimento e vômitos. Tal achado está em consonância com a literatura (GREEN *et al.*, 1996; KALAPURAKAL *et al.*, 2004).

Em nossa amostra, restos nefrogênicos foram encontrados em 6 casos (20,7%). Os restos nefrogênicos representam células embrionárias ou seus

derivados que persistem na vida pós-natal e são consideradas lesões precursoras de tumores de Wilms com diferentes aspectos clínicos e epidemiológicos (BECKWITH, 1998; RIVERA; HABER, 2005). Embora os restos nefrogênicos sejam relatados em associação com até 42% dos tumores de Wilms, não foi encontrada relação entre a presença de restos nefrogênicos e as taxas de recaída tumoral (BRESLOW *et al.*, 2006).

A história evolutiva dos restos nefrogênicos é bastante variável. Os restos nefrogênicos podem desaparecer ou sofrer indução neoplásica originando tumores de Wilms (BECKWITH, 1998). A associação entre os tumores de Wilms e restos nefrogênicos pode refletir a predisposição genética a este tumor devido à mutação constitucional de genes com penetrância variável ou mutações embrionárias pós-zigóticas (PRITCHARD-JONES; VUJANIĆ, 2006). Coppes *et al.* (1999) observou que crianças menores de 12 meses com restos nefrogênicos têm maior probabilidade de apresentarem tumores bilaterais metacrônicos.

Estes remanescentes embrionários podem ser divididos em dois grupos que diferem em sua morfologia e epidemiologia: os restos nefrogênicos perilobares (RNPL) e os restos nefrogênicos intralobares (RNIL). Os RNPL são compostos por blastema ou células epiteliais embrionárias, têm limites bem definidos e estão confinados a periferia do lobo renal. Os RNIL contêm múltiplos tipos celulares entremeados por nefrons normais, têm limites indistintos com o tecido renal adjacente e ocorrem em qualquer local do lobo renal e podem ser encontrados junto ao seio renal e à parede do sistema pielocalicial (BECKWITH, 1998).

A prevalência de RNPL em necrópsias pediátricas encontrada por Beckwith (1975) foi de 0,53%, enquanto raros foram os casos de RNIL. Sabe-se que síndromes com predisposição para tumor de Wilms, como síndrome de Beckwith-Wiedemann, síndrome de Denys-Drash e WAGR, têm maior prevalência de restos nefrogênicos (BECKWITH, 1998). Na população asiática, tumores de Wilms estão associados à maior frequência de RNIL e relativa ausência de RNPL, enquanto na população européia, os restos nefrogênicos são menos frequentes quando comparado aos dados do *National Wilms Tumor Study*. Os autores do grupo europeu acreditam que esta diferença possa estar relacionada a diferentes critérios para diagnóstico de restos nefrogênicos, a amostra submetida à revisão histológica ou a variações étnicas (BRESLOW *et al.*, 1994; PRITCHARD-JONES; VUJANIĆ, 2006).

Segundo Breslow *et al.* (2006) os restos nefrogênicos podem definir dois tipos distintos de tumor de Wilms: **(a)** tipo I caracterizado por RNIL, histologia favorável com predomínio estromal e freqüente relação com malformações urogenitais no sexo masculino associados a mutações do WT1 em 22% dos pacientes e; **(b)** tipo II caracterizado por RNPL, histologia desfavorável ou histologia favorável com predomínio de blastema ou epitélio, associado à perda do imprinting do gene do *fator de crescimento insulina-símile 2 (IGF2)* no locus 11p15 na síndrome de Beckwith-Wiedemann.

Entretanto, esta divisão não explica a presença de restos nefrogênicos em pacientes que não se encaixam nos tipos I e II. Há um terceiro grupo de tumores de Wilms (tipo III) que não está associado a restos nefrogênicos e representam 60% dos tumores de Wilms (PRITCHARD-JONES; VUJANIĆ, 2006).

Estudos moleculares tentam desvendar as alterações genéticas dos restos nefrogênicos. Deleções e mutações do WT1 no locus 11p13 em tumores de Wilms e restos nefrogênicos indicam que a inativação do WT1 esteja relacionada à imortalização das células-tronco renais e corrobora o papel dos restos nefrogênicos como lesões precursoras (PARK *et al.*, 1993). Encontrou-se perda da heterozigose (LOH) no 11p13 (WT1) nos RNILs e alterações no 11p15 (locus WT2) nos RNPLs (CHARLES; BROWN; BERRY, 1998). Vuononvirta *et al.* (2008) ao compararem as alterações genéticas encontradas nos RNPL e tumores de Wilms correspondentes, comprovaram os relatos de autores anteriores sobre a não obrigatoriedade da progressão dos restos nefrogênicos para tumores de Wilms. Além disso, estes autores encontraram amplo espectro de alterações cromossômicas nos RNPL ao contrário do encontrado nos tumores de Wilms, caracterizando tais alterações como os eventos "precoces" e "tardios", respectivamente. A partir destes achados, destacaram a existência de um modelo de tumorigênese com múltiplas etapas. Este trabalho também ressaltou a importância da via IGF2/RNPL na tumorigênese do tumor de Wilms (VUONONVIRTA *et al.*, 2008).

Com relação aos óbitos, 5 pacientes tiveram tal evolução. Entre suas histórias clínicas encontramos 2 óbitos por complicações cirúrgicas (um deles tendo evoluído a óbito durante o procedimento cirúrgico de ressecção tumoral), 1 óbito decorrente de segunda neoplasia (leucemia mieloide) e 1 óbito relacionado à complicações secundárias ao tumor ou seu tratamento (complicações pulmonares, pancitopenia e lesões esofágicas). O último caso de óbito (caso 7) possuía estadiamento IV e risco

intermediário (nefroblastoma misto). Esse paciente evoluiu com recidiva de massa tóraco-abdominal e houve perda de seguimento. Portanto, além de fatores como estadiamento e grau histológico envolvidos na progressão da doença, ainda temos que considerar a importância do seguimento, uma vez que esse paciente poderia ter tido evolução favorável se o seguimento após o tratamento tivesse sido realizado corretamente, à semelhança do paciente 8, que pertencia ao mesmo grupo de risco e estadiamento e encontra-se livre de doença.

Entre os tipos histopatológicos de nefroblastomas, os anaplásicos perfazem 5 a 10,1%, podendo apresentar-se de forma difusa ou focal (BONADIO *et al.*, 1985; BECKWITH *et al.*, 1996; FARIA *et al.*, 1996; VUJANIĆ *et al.*, 1999; WEIRICH *et al.*, 2004; DOME *et al.*, 2006). Em nosso estudo, observamos 2 casos com tal histologia, correspondendo a 6,9% do total dos casos.

Segundo a literatura apenas 15% dos pacientes com histologia favorável apresentaram recidiva da doença, comparado com uma taxa de 50% dos casos com histologia anaplásica (VARAN *et al.*, 2008). Encontramos, em nosso estudo, 2 casos de recidiva, sendo que 1 paciente incluía-se no grupo de risco intermediário sem anaplasia e o outro no grupo de alto risco, apresentando como laudo histopatológico anaplasia difusa. Assim, entre os casos sem anaplasia (n=27) encontramos 3,7% de recidivas e entre os doentes com anaplasia (n=2), 50% destes apresentaram recidiva do tumor.

Apesar do sucesso terapêutico amplamente descrito na literatura, o tratamento para tumores de Wilms está estagnado. Durante décadas, foram estudadas e relatadas características clínico-patológicas relacionadas ao comportamento biológico do tumor de Wilms, o que contribuiu sobremaneira para melhorar o prognóstico destes pacientes. Os avanços na compreensão da complexa patogênese do tumor de Wilms estão estimulando a procura por biomarcadores que permitam melhor avaliação do grupo de risco destes pacientes.

6.4. QSOX1

Para este estudo, elencamos um grupo de possíveis biomarcadores, alguns amplamente difundidos na literatura e a QSOX1, recentemente descrita e pela primeira vez relatada em nefroblastomas.

A QSOX1 é uma sulfidril oxidase expressa em uma variedade de tecidos humanos e está envolvida no estado redox de proteínas, além de participar da formação da matriz extracelular e das interações entre células e matriz extracelular. A expressão de QSOX1 e QSOX2 está associada ao desencadeamento de apoptose por estresse oxidativo (COPPOCK; CINA-POPPE; GILLERAN, 1998; COPPOCK *et al.*, 2000; HOOBER *et al.*, 1999; THORPE *et al.*, 2002; AMIOT *et al.*, 2004). Portes *et al.* (2007) imbuídos de evidências do possível envolvimento do estado redox no desenvolvimento e a expressão da QSOX em tecidos fetais, avaliaram a expressão imunoistoquímica deste marcador em tecidos fetais de camundongos. Dentre os tecidos fetais avaliados no estudo, aqueles que imunoexpressaram QSOX1 tinham origem mesodérmica e ectodérmica. Os rins dos fetos de camundongos avaliados por estes autores imunoexpressaram QSOX no mesênquima, enquanto nos camundongos neonatos os túbulos urinários e o mesênquima foram positivos à imunoistoquímica (PORTES *et al.*, 2007).

Não apenas a semelhança entre o aspecto histológico, mas as semelhantes biológicas entre o rim em desenvolvimento e o tumor de Wilms estimulam pesquisas que correlacionem tais eventos. Estas semelhanças se devem às propriedades das células precursoras renais pluripotentes e envolvem genes em comum, como o *WT1*. As pesquisas revelaram que a tumorigênese do tumor de Wilms está relacionada principalmente às fases iniciais do desenvolvimento renal. O desenvolvimento renal é um processo complexo e envolve interações entre dois derivados do mesoderma intermediário, o ducto de Wolff e o mesênquima metanéfrico. O apropriado desenvolvimento renal depende da formação da transição mesênquimo-epitelial entre o broto uretérico derivado do ducto de Wolff e o mesênquima metanéfrico. Acredita-se que para a formação da transição mesênquimo-epitelial a matriz extracelular desempenhe papel fundamental permitindo a interação entre as células mesenquimais e epiteliais (RIVERA; HABER, 2005).

A atividade da QSOX sobre a apoptose e a preparação da matriz extracelular permitiria a formação da transição mesênquimo-epitelial, fato corroborado pelos achados de expressão imunohistoquímica em rins de fetos e camundongos recém-natos (PORTES *et al.*, 2007). Em nosso estudo, observamos a imunoposição de QSOX nos túbulos renais e tecido conjuntivo nas amostras obtidas do tecido renal peritumoral, achados semelhantes aos relatados em camundongos. Nas amostras tumorais, a imunoposição de QSOX1 foi observada em todos os casos, distribuída nos três componentes histológicos do tumor de Wilms (blastema, epitélio e estroma).

Apesar da relação entre a expressão de QSOX2 em neuroblastomas e a resposta pró-apoptótica a agentes citostáticos tenha sido relatada, em nosso estudo, a expressão imunohistoquímica da média da QSOX1 não discriminou grupos com estádios, grupos de risco e evoluções clínicas diferentes (WITTKE *et al.*, 2003). Os três componentes histológicos do tumor de Wilms imunoposaram QSOX1, e semelhante ao obtido na avaliação do valor médio de expressão da QSOX1, a comparação entre a imunoposição por componente e as variáveis clínico-patológicas não demonstrou correlação estatística. O mesmo ocorreu na comparação entre a imunoposição de QSOX1 e os demais marcadores em estudo (WT1, p53, BCL-2, BAX e VEGFR1).

6.5. O WT1

Embora o WT1 tenha sido descrito em pacientes com tumor de Wilms, poucos são os estudos publicados na literatura que avaliam a correlação entre a imunoposição de WT1 e o prognóstico neste grupo de pacientes. As alterações do WT1 são encontradas em 10,4% a 26,7% dos tumores de Wilms esporádicos (PARK, 1993; LEE; HABER, 2001; ROYER-POKORA *et al.*, 2008; RUTESHOUSER; ROBINSON; HUFF, 2008). Zhuang *et al.* (1997) relataram a identificação da perda da heterozigose do WT1 nos componentes histológicos do tumor de Wilms. As alterações do gene e a imunoposição do WT1 foram encontradas em maior intensidade nos componentes blastematoso e epitelial, enquanto o componente estromal e os elementos heterólogos revelaram menores níveis de expressão e

imunoexpressão, sugerindo que os elementos heterólogos tenham a mesma origem dos demais (ZHUANG *et al.*, 1997).

Em nosso trabalho observamos a imunoexpressão de WT1 em 25 casos (86,2%), distribuída entre os componentes blastematoso (17/27 casos), epitelial (16/26 casos) e elementos heterólogos rabiomatosos do componente estromal (15/26 casos). A imunoexpressão foi predominantemente citoplasmática, mas em 2 casos (8%) positiva em núcleos de blastema (estádios I e V) e em 1 caso (4%) positiva em núcleos do componente epitelial (estádio III). Ghanem *et al.* (2000) identificaram no blastema e epitélio imunoexpressão em 59 e 57% dos pacientes, respectivamente. Em nosso estudo, a expressão imunoistoquímica de WT1 no componente blastematoso se correlacionou com o estágio, semelhante ao relatado por Ghanem *et al.* (2000). Não houve correlação entre a imunoexpressão média de WT1 e as variáveis clínico-patológicas avaliadas. Nas amostras não tumorais obtidas do tecido renal adjacente ao tumor a expressão imunoistoquímica do WT1 foi intensa no epitélio visceral glomerular e fraca nos túbulos, resultado semelhante ao previamente relatado (GHANEM *et al.*, 2000).

Fukuzawa *et al.* (2004) descreveu a expressão imunoistoquímica de WT1 nas áreas de diferenciação miogênica comuns em tumores de Wilms. A mutação do WT1 está associada a tumores de Wilms predominantemente estromais com componente heterólogo miogênico e pouca redução volumétrica a quimioterapia pré-operatória refletindo o efeito da mutação do WT1 sobre a diferenciação miogênica (ROYER-POKORA *et al.*, 2008).

6.6. A PROTEÍNA p53

A expressão imunoistoquímica de p53 é relatada na literatura como biomarcador em tumores de Wilms com anaplasia (histologia desfavorável), enquanto em tumores com histologia favorável os resultados são conflitantes (LAHOTI *et al.*, 1996; SKOTNICKA-KLONOWICZ *et al.*, 2001; SREDNI *et al.*, 2001; D'ANGELO *et al.*, 2003). Em nosso estudo, a expressão imunoistoquímica de p53 foi encontrada em 37,9% dos casos, sendo que destes, 1 caso (9%) apresentava

anaplasia difusa a histologia. Sredni *et al.* estudaram 97 pacientes com tumor de Wilms em estádios I-V, dos quais 84 foram negativos e 13 positivos (13,4%) para a expressão imunohistoquímica de p53. Dentre os casos positivos, 2 tumores (15,4%) apresentavam anaplasia a histologia (SREDNI *et al.*, 2001).

A expressão da proteína p53 foi encontrada nos componentes epitelial, estromal e blastematoso com distribuição variável nos estudos (CHEAH; LOOI; CHAN, 1996; LAHOTI *et al.*, 1996; SKOTNICKA-KLONOWICZ *et al.*, 2001). Em nosso estudo, não identificamos imunopositividade restrita a um elemento histológico.

Apesar da pequena representatividade de tumores de Wilms com anaplasia em nossa amostragem (2 casos), observamos a imunopositividade de p53 em 1 dos casos com anaplasia difusa e em expressão superior a encontrada nos demais casos positivos, dados semelhantes aos reportados por outros autores (GOVENDER *et al.*, 1998; SKOTNICKA-KLONOWICZ *et al.*, 2001; D'ANGELO *et al.*, 2003). Além disso, a expressão imunohistoquímica do p53 nos componentes epitelial e estromal se correlacionou a anaplasia. Porém, ao contrário do relatado na literatura, a imunopositividade de p53 não se correlacionou estatisticamente com o estágio, grupo de risco ou evolução clínica, mas se correlacionou a quimioterapia pré-operatória tanto na imunopositividade média quanto isolada nos componentes blastematoso e epitelial (GOVENDER *et al.*, 1998; SKOTNICKA-KLONOWICZ *et al.*, 2001; SREDNI *et al.*, 2001; D'ANGELO *et al.*, 2003). Dos 11 casos positivos, 3 foram submetidos a quimioterapia pré-operatória, sendo 1 tumor de Wilms com anaplasia, 1 tumor de Wilms predominantemente epitelial e 1 tumor de Wilms misto, todos com comportamento clínico favorável evoluíram para cura. Os efeitos da quimioterapia pré-operatória sobre a imunopositividade de p53 são discutidos na literatura. Acredita-se que, a quimioterapia pré-operatória selecione linhagens celulares com imunopositividade para p53, causando necrose das células imunonegativas (SREDNI *et al.*, 2001; D'ANGELO *et al.*, 2003). Por outro lado, Sredni *et al.* (2001) não obtiveram positividade em tumores submetidos à quimioterapia pré-operatória e Lahoti *et al.* (1996) não observaram diferença na expressão imunohistoquímica em espécimes antes e após a quimioterapia.

A imunopositividade de p53 ocorre em 4 a 20% dos tumores de Wilms com histologia favorável com correlação variável entre a imunopositividade de p53, o

estadimento e o prognóstico (CHEAH; LOOI; CHAN, 1996; GOVENDER *et al.*, 1998; SREDNI *et al.*, 2001; SKOTNICKA-KLONOWICZ *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2002; D'ANGELO *et al.*, 2003).

6.7. A PROTEÍNA BCL-2

A imunoexpressão de BCL-2 no componente blastematoso avaliada por Ghanem *et al.* (2001) em tumores de Wilms submetidos a quimioterapia pré-operatória mostrou-se útil na correlação com a evolução clínica. Em nosso estudo, a expressão imunoistoquímica média do BCL-2 se mostrou diferente entre os grupos de evolução clínica (livre de doença ou óbito/recidiva). Isto é, havia maior expressão de BCL-2 no grupo livre de doença do que naquele que foi a óbito ou apresentou recidivas. Este resultado não está de acordo com a literatura revisada que mostra resultados contrários, porém é semelhante ao relatado em outras neoplasias como carcinomas colônicos e mamários (GHANEM *et al.*, 2001). A expressão imunoistoquímica de BCL-2 aumentou progressivamente em relação ao estágio em especial entre os componentes blastematoso e epitelial. A BCL-2 é uma proteína anti-apoptótica e sua expressão pode estar associada à histologia desfavorável, como relatado em carcinomas colônicos, ou a histologia favorável, a exemplo do linfoma folicular (ANTONSSON; MARTINOU, 2000). A BCL-2 quando superexpressa promove a tumorigênese inibindo o mecanismo de apoptose (GALONEK, 2006). A perda da morte celular programada prolongaria a sobrevivência celular e favoreceria a progressão neoplásica e a resistência a radioterapia e quimioterapia (GHANEM *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2004). Porém, é sabido também, que a expressão de BCL-2 aumenta conforme aumenta o grau de diferenciação das lesões, sendo assim, altas taxas de células expressando BCL-2 poderiam estar presentes em lesões mais bem diferenciadas, as quais por si só, teriam melhor prognóstico (RE *et al.*, 1999; ANTONSSON; MARTINOU, 2000). Vale lembrar, que neste estudo, apenas dois casos apresentavam anaplasia, isto é, eram pouco diferenciados e sua presença

não se correlacionou a expressão imunoistoquímica de BCL-2, seja em seu valor médio ou isolado por componente histológico. Além disso, a participação do BCL-2 na indução do broto uretérico durante a nefrogênese poderia explicar a elevada expressão de BCL-2 nos tumores de Wilms clássicos e a baixa expressão de BCL-2 nos tumores com anaplasia (RE *et al.*, 1999).

A expressão imunoistoquímica de BCL-2 no estroma do tumor de Wilms é relatada nas áreas de diferenciação rabdomiomatosa. Em nossa série, observamos tendência estatística entre a positividade no estroma e a quimioterapia pré-operatória. A positividade no componente estromal foi superior nos tumores submetidos à quimioterapia pré-operatória.

A positividade média de BCL-2 foi superior em tumores com peso inferior a 550g. Estes tumores estão associados a prognóstico favorável principalmente pela ausência de variáveis relacionadas a pior prognóstico (WEEKS; BECKWITH; LUCKEY, 1987).

6.8. A PROTEÍNA BAX

A expressão imunoistoquímica do BAX se mostrou diferente (tendência estatística) entre os grupos de estadiamento clínicos, sendo que as maiores taxas de positividade deste marcador foram encontradas no grupo de estágio I, semelhante ao descrito por Ghanem *et al.* (2001). Em especial a positividade no componente epitelial se associou a estádios clínicos mais precoces. Kralewski *et al.* (1995) observaram pior evolução prognóstica em carcinomas mamários correlacionada com redução da expressão imunoistoquímica de BAX. Tumores de células germinativas em crianças demonstraram correlação entre a ausência de expressão de BAX e pior prognóstico (ADDEO *et al.*, 2007). Tumores de Wilms com maior estágio apresentaram redução da expressão de BAX (GHANEM *et al.*, 2001).

Semelhante ao encontrado para o BCL-2, a expressão imunoistoquímica do BAX no estroma se correlacionou a quimioterapia pré-operatória e a expressão imunoistoquímica média de BAX foi superior em tumores com peso inferior a 550g.

6.9. O RECEPTOR VEGFR1

A imunexpressão de VEGFR1 nos tumores de Wilms selecionados para este estudo comportou-se de maneira semelhante ao relatado por Ghanem *et al.* (2003). A expressão imunohistoquímica de VEGFR1 foi maior nos estádios mais avançados, em especial no componente epitelial. Tais achados são compatíveis com a atividade angiogênica desencadeada pelo VEGFR1 que permite o crescimento e disseminação tumoral (GHANEM *et al.*, 2003; ROY; BHARDWAJ; YLÄHERTTUALA, 2006; NOWICKI, 2007).

A avaliação da expressão imunohistoquímica de VEGFR1 no blastema se correlacionou ao grupo de risco, evolução clínica e anaplasia. A expressão imunohistoquímica de VEGFR1 no blastema tem correlação estatística com a evolução clínica. Nos casos que evoluíram para óbito/recidiva a expressão imunohistoquímica de VEGFR1 foi superior aos tumores com evolução favorável. Já a expressão imunohistoquímica no componente epitelial apresentou tendência a se correlacionar a evolução clínica. Nos casos livres de doença a expressão imunohistoquímica de VEGFR1 no componente epitelial foi superior. O papel do VEGFR1 na progressão dos tumores de Wilms já havia sido descrita por Ghanem *et al.* (2003) que correlacionaram a expressão imunohistoquímica de VEGFR1 a progressão clínica e óbito relacionado ao tumor. Estes achados sugerem a participação destas moléculas na neovascularização tumoral (GHANEM *et al.*, 2003).

7. CONCLUSÕES

1. Os dados clínico-patológicos da população do estudo são concordantes com os achados da literatura.
2. A expressão de QSOX1 foi positiva nos três componentes histológicos (blastema, epitélio e estroma) do tumor de Wilms.
3. A expressão imunoistoquímica dos biomarcadores p53, WT1, BCL-2, BAX e VEGFR1 nos componentes histológicos do tumor de Wilms foi variável.
4. A expressão imunoistoquímica média da QSOX1 não se associou com àquela dos outros biomarcadores de progressão tumoral do estudo.
5. A expressão imunoistoquímica média da QSOX1 não se associou com a evolução clínica dos pacientes ou fatores prognósticos.
6. A expressão imunoistoquímica da QSOX1 por componente histológico do tumor de Wilms não se associou com a evolução clínica dos pacientes ou fatores prognósticos.
- 7.1. A expressão imunoistoquímica média do BCL-2 apresentou p 25% maior que a significância estatística com relação à separação em grupos com evoluções clínicas diferentes, sendo mais positivo no grupo livre de doença ($p = 0,075$).
- 7.2. A expressão imunoistoquímica média do BAX apresentou p 4% maior que a significância estatística com relação aos grupos de estágio diferentes, sendo que foi mais positivo nos pacientes com estágio I ($p = 0,054$).
- 7.3. A expressão imunoistoquímica média do VEGFR1 apresentou p 29% maior que a significância estatística com relação aos grupos de estágio diferentes, sendo mais positivo nos pacientes com estágio IV/V ($p = 0,079$).
- 7.4. A expressão imunoistoquímica média do BAX e VEGFR1 apresentou significância estatística com relação ao peso tumoral, sendo que ambos foram mais positivos em tumores com peso $< 550g$ ($p = 0,026$ e $p = 0,008$, respectivamente), enquanto a expressão de BCL-2 apresentou p 45% maior que a significância estatística com relação ao peso tumoral.
- 7.5. A expressão imunoistoquímica média de p53 e WT1 não se associou com a evolução clínica dos pacientes ou fatores prognósticos

- 8.1. A expressão imunoistoquímica de BCL-2 no blastema apresentou p 7% maior que a significância estatística com relação ao estadiamento ($p = 0,057$).
- 8.2. A expressão imunoistoquímica de WT1 no blastema apresentou correlação estatística com relação ao estadiamento, sendo maior no estágio I ($p = 0,002$).
- 8.3. A expressão imunoistoquímica de VEGFR1 no blastema mostrou significância estatística para discriminar grupos de risco ($p = 0,016$), evolução clínica ($p = 0,021$) sendo mais expresso no óbito/recidiva, e presença de anaplasia ($p = 0,0004$) sendo mais expresso em tumores com anaplasia.

REFERÊNCIAS

ADDEO, R.; CRISCI, S.; D'ANGELO, V.; VINCENZI, B.; CASALE, F.; PETTINATO, G.; DONOFRIO, V.; BOLDRINI, R.; ALAGGIO, R.; COLLINI, P.; BERTORELLE, R.; DI TULLIO, M. T.; CARAGLIA, M.; TEREZIANI, M.; LO CURTO, M.; INDOLFI, P. Bax mutation and overexpression inversely correlate with immature phenotype and prognosis of childhood germ cell tumors. **Oncology Reports**, v. 17, n. 5, p. 1155-1161, 2007.

ANDRADE, V. P.; CUNHA, I. W.; SILVA, E. M.; AYALA, F.; SATO, Y.; FERREIRA, S. S.; NASCIMENTO, C. F.; SOARES, F. A. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 1, p. 55-60, 2007.

ANTONSSON, B.; MARTINOU, J. C. The Bcl-2 protein family. **Experimental cell research**, v. 256, n. 1, p. 50-57, 2000.

AMIOT, C.; MUSARD, J. F.; HADJIYASSEMIS, M.; JOUVENOT, M.; FELLMANN, D.; RISOLD, P. Y.; ADAMI, P. Expression of the secreted FAD-dependent sulfhydryl oxidase (QSOX) in the guinea pig central nervous system. **Molecular Brain Research**, v. 125, n. 1-2, p. 13-21, 2004.

AYLON, Y.; OREN, M. Living with p53, dying of p53. **Cell**, v. 130, n.4. p. 597-600, 2007.

BARDEESY, N.; FALKOFF, D.; PETRUZZI, M. J.; NOWAK, N.; ZABEL, B.; ADAM, M.; AGUIAR, M. C.; GRUNDY, P.; SHOWS, T.; PELLETIER, J. Anaplastic Wilms' tumour, a subtype displaying poor prognosis, harbours p53 gene mutations. **Nature Genetics**, v. 7, n. 1, p. 91-97, 1994.

BARDEESY, N.; BECKWITH, J. B.; PELLETIER, J. Clonal expansion and attenuated apoptosis in Wilms' tumors are associated with p53 gene mutations. **Cancer Research**, v. 55, n. 2, p. 215-219, 1995.

BECKWITH, J. B.; PALMER, N. F. Histopathology and prognosis of Wilms tumor. Results from the First National Wilms' tumor Study. **Cancer**, v. 41, n. 5, p. 1937-1948, 1978.

BECKWITH, J. B. Wilms' tumor and other renal tumors of childhood: a selective review from the National Wilms' Tumor Study pathology center. **Human Pathology**, v. 14, n. 6, p. 481-492, 1983.

BECKWITH, J. B.; ZUPPAN, C. E.; BROWNING, N. G.; MOKSNESS, J.; BRESLOW, N. E. Histological analysis of aggressiveness and responsiveness in Wilms' tumor. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 27, n. 5, p. 422-428, 1996.

BECKWITH, J. B. Nephrogenic rests and the pathogenesis of Wilms tumor: developmental and clinical considerations. **American Journal of Medical Genetics**, v. 79, n. 4, p. 268-273, 1998.

BENAYOUNT, B.; ESNARD-FÈRVE, A.; CASTELLA, S.; COURTY, Y.; ESNARD, F. Rat seminal vesicle FAD-dependent sulphhydryl oxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 17, p. 13830-13837, 2001.

BLEICKEN, S.; CLASSEN, M.; PADMAVATHI, P. V. L.; ISHIKAWA, T.; ZETH, K.; STEINHOFF, H. J.; BORDIGNON, E. Molecular details of Bax activation, oligomerization and membrane insertion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 9, p. 6636-6647, 2010.

BOCCON-GIBOD, L. A. Pathological evaluation of renal tumors in children: International Society of Pediatric Oncology approach. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 1, n. 3, p. 243-248, 1998.

BOCCON-GIBOD, L.; REY, A.; SANDSTEDT, B.; DELEMARRE, J.; HARMS, D.; VUJANIĆ, G.; DE KRAKER, J.; WEIRICH, A.; TOURNADE, M. F. 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. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 34, n. 4, p. 183-190, 2000.

BONADIO, J. F.; STORER, B.; NORKOOL, P.; FAREWELL, V. T.; BECKWITH, J. B.; D'ANGIO, G. J. Anaplastic Wilms' tumor: clinical and pathologic studies. **Journal of Clinical Oncology**, v. 3, n. 4, p. 513-520, 1985.

BOURDON, J. C. p53 and its isoforms in cancer. **British Journal of Cancer**, v. 97, n. 3, p. 277-282, 2007.

BRESLOW, N. E.; PALMER, N. F.; HILL, L. R.; BURING, J.; D'ANGIO, G. J. Wilms' tumor: prognostic factors for patients without metastases at diagnosis. Results of the National Wilms' Tumor Study. **Cancer**, v. 41, n. 4, p. 1577-1589, 1978.

BRESLOW, N. E.; BECKWITH, J. B. Epidemiological features of Wilms' tumor: results of the National Wilms' Tumor Study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 68, n. 3, p. 429-436, 1982.

BRESLOW, N. E.; CHURCHILL, G.; BECKWITH, J. B.; FERNBACH, D. J.; OTHERSON, H. B.; TEFFT, M.; D'ANGIO, G. J. Prognosis for Wilms' tumor patients with nonmetastatic disease at diagnosis – results of the Second National Wilms' tumor Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 3, n. 4, p. 521-531, 1985.

BRESLOW, N. E.; CHURCHILL, G.; NESMITH, B.; THOMAS, P. R. M.; BECKWITH, J. B.; OTHERSEN, H. B.; D'ANGIO, G. J. Clinicopathologic features and prognosis for Wilms' tumor patients with metastases at diagnosis. **Cancer**, v. 58, n. 11, p. 2501-2511, 1986.

BRESLOW, N. E.; BECKWITH, J. B.; CIOL, M.; SHARPLES, K. Age distribution of Wilms' tumor: report from the National Wilms' tumor Study. **Cancer Research**, v. 48, n.6, p. 1653-1657, 1988.

BRESLOW, N. E.; SHARPLES, K.; BECKWITH, J. B.; TAKASHIMA, J.; KELALIS, P. P.; GREEN, D. M.; D'ANGIO, G. J. Prognostic factors in nonmetastatic, favorable histology Wilms' tumor. **Cancer**, v. 68, n. 11, p. 2345-2353, 1991.

BRESLOW, N.; OLSHAN, A.; BECKWITH, J. B.; GREEN, D. Epidemiology of Wilms tumor. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 21, n. 3, p. 172-181, 1993.

BRESLOW, N. E.; OLSHAN, A.; BECKWITH, J. B.; MOKSNESS, J.; FEIGL, P.; GREEN, D. Ethnic variation in the incidence, diagnosis, prognosis, and follow-up of children with Wilms' tumor. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 86, n. 1, p. 49-51, 1994.

BRESLOW, N. E.; TAKASHIMA, J. R.; WHITTON, J. A.; MOKSNESS, J.; D'ANGIO, G. J.; GREEN, D. M. Second malignant neoplasms following treatment for Wilms'

tumor: a report from the National Wilms' tumor Study Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 13, n. 8, p. 1851-1859, 1995.

BRESLOW, N. E.; BECKWITH, J. B.; PERLMAN, E. J.; REEVE, A. E. Age distributions, birth weights, nephrogenic rests and heterogeneity in the pathogenesis of Wilms tumor. **Pediatric blood & cancer**, v. 47; n. 3, p. 260-267, 2006.

BROSH, R.; ROTTER, V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nature Reviews*. **Cancer**, v. 9, n. 10, p. 701-713, 2009.

BUBENDORF, L.; NOCITO, A.; MOCH, H.; SAUTER, G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput *in situ* studies. **Journal of Pathology**, v. 195, n. 1, p. 72-79, 2001.

CADWELL, C.; ZAMBETTI, G. P. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. **Gene**, v. 277, n. 1-2, p. 15-30, 2001.

CAPRA, M. L.; WALKER, D. A.; MOHAMMED, W. M.; KAPILA, L.; BARBOR, P. R.; SOKAL, M.; ROBSON, K.; HEWITT, M.; STEWART, R. Wilms' tumor: a 25 – year review of the role of preoperative chemotherapy. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 34, n. 4, p. 579-582, 1999.

CAREV, D.; KRNIĆ, D.; SARAGA, M.; SAPUNAR, D.; SARAGA-BABIĆ, M. Role of mitotic, pro-apoptotic and anti-apoptotic factors in human kidney development. **Pediatric nephrology**, v. 21, n. 5, p. 627-636, 2006.

CARPENTIERI, D. F.; NICHOLS, K.; CHOU, P. M.; MATTHEWS, M.; PAWEL, B.; HUFF, D. The expression of WT1 in the differentiation of rhabdomyosarcoma from other pediatric small round blue cell tumors. **Modern Pathology**, v. 15, n. 10, p. 1080-1086, 2002.

CASSADY, J. R.; TEFFT, M.; FILLER, R. M.; JAFFE, N.; PAED, D.; HELLMAN, N. S. Considerations in the radiation therapy of Wilms' tumor. **Cancer**, v. 32, n. 3, p. 598-608, 1973.

CASTAGNE, V.; GAUTSCHI, M.; LEFEVRE, K.; POSADA, A.; CLARKE, P. G. H. Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system. **Progress in neurobiology**, v. 59, n. 4, p. 397-423, 1999.

CHAKRAVARTHI, S.; JESSOP, C. E.; WILLER, M.; STIRLING, C. J.; BULLEID, N. J. Intracellular catalysis of disulfide bond formation by the human sulfhydryl oxidase, QSOX1. **The Biochemical Journal**, v. 404, n. 3, p. 403-411, 2007.

CHANDLER, I.; HOULSTON, R.; LANDBERG, G. A practical guide to constructing and using tissue microarrays. **Methods in Molecular Biology**, v. 675, p. 363-373, 2011.

CHARLES, A. K.; BROWN, K. W.; BERRY, P. J. Microdissecting the genetic events in nephrogenic rests and Wilms' tumor development. **American Journal of Pathology**, v. 153, n. 3, p. 991-1000, 1998.

CHEAH, P. L.; LOOI, L. M.; CHAN, L. L. Immunohistochemical expression of p53 proteins in Wilms' tumour: a possible association with the histological prognostic parameter of anaplasia. **Histopathology**, v. 28, n. 1, p. 49-54, 1996.

COPPES, M. J.; ARNOLD, M.; BECKWITH, J. B.; RITCHEY, M. L.; D'ANGIO, G. J.; GREEN, D. M.; BRESLOW, N. E. Factors affecting the risk of contralateral Wilms tumor development. A report from the National Wilms tumor Study Group. **Cancer**, v. 85, n. 7, p. 1616-1625, 1999.

COPPOCK, D. L.; CINA-POPPE, D.; GILLERAN, S. The quiescin Q6 gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: thioredoxin and ERV1. **Genomics**, v. 54, n. 3, p. 460-468, 1998.

COPPOCK, D. L.; KOPMAN, C.; SCANDALIS, S.; GILLERAN, S. Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. **Cell Growth & Differentiation**, v. 4, n. 6, p. 483-493, 1993.

COPPOCK, D. L.; KOPMAN, C.; GUDAS, J.; CINA-POPPE, D. A. Regulation of the quiescence-induced genes: quiescin Q6, decorin, and ribosomal protein S29. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 269, n. 2, p. 604-610, 2000.

COTTON, C. A.; PETERSON, S.; NORKOOL, P. A.; TAKASHIMA, J.; GRIGORIEV, Y.; BRESLOW, N. E. Early and late mortality after diagnosis of Wilms tumor. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 8, p. 1304-1309, 2009.

D'ANGELO, M. F.; KAUSIK, S. J.; SEBO, T. J.; RATHBUN, S. R.; KRAMER, S. A.; HUSMANN, D. A. p53 immunopositivity in histologically favorable Wilms tumor is not related to stage at presentation or to biological aggression. **The Journal of Urology**, v. 169, n. 5, p. 1815-1817, 2003.

DAVIDOFF, A. M.; GIEL, D. W.; JONES, D. P.; JENKINS, J. J.; KRASIN, M. J.; HOFFER, F. A.; WILLIAMS, M. A.; DOME, J. S. The feasibility and outcome of nephron-sparing surgery for children with bilateral Wilms tumor. The St. Jude Children's Research Hospital Experience: 1999-2006. **Cancer**, v. 112, n. 9, p. 2060-2070, 2008.

DE CAMARGO, B.; FRANCO, E. L. A randomized clinical trial of single-dose versus fractionated-dose dactinomycin in the treatment of Wilms' tumor. Results after extended follow-up. Brazilian Wilms' Tumor Study Group. **Cancer**, v. 73, n. 12, p. 3081-3086, 1994.

DE CAMARGO, B.; DE OLIVEIRA SANTOS, M.; REBELO, M. S.; DE SOUZA REIS, R.; FERMAN, S.; NORONHA, C. P.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: first report of 14 population-based cancer registries. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 3, p. 715-720, 2010.

DE KRAKER, J.; DELEMARRE, J. F. M.; LILIEN, M. R.; TOURNADE, M. F. Misstaging in nephroblastoma. Causes and consequences. A report of the sixth nephroblastoma trial and study of the International Society of Paediatric Oncology. **European Journal of Pediatric Surgery**, v. 9, n. 3, p. 153-157, 1999.

DIAS, S.; HATTORI, K.; HEISSIG, B.; ZHU, Z.; WU, Y.; WITTE, L.; HICKLIN, D. J.; TATENO, M.; BOHLEN, P.; MOORE, M. A. S. M.; RAFII, S. Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10857-10862, 2001.

DITTMER, D.; PATI, S.; ZAMBETTI, G.; CHU, S.; TERESKY, A. K.; MOORE, M.; FINLAY, C.; LEVINE, A. J. Gain of function mutations in p53. **Nature genetics**, v. 4, n. 1, p. 42-46, 1993.

DOME, J. S.; COPPES, M. J. Recent advances in Wilms tumor genetics. **Current opinion in pediatrics**, v. 14, n. 1, p. 5-11, 2002.

DOME, J. S.; COTTON, C. A.; PERLMAN, E. J.; BRESLOW, N. E.; KALAPURAKAL, J. A.; RITCHEY, M. L.; GRUNDY, P. E.; MALOGOLOWKIN, M.; BECKWITH, J. B.; SHAMBERGER, R. C.; HAASE, G. M.; COOPES, M. J.; COCCIA, P.; KLETZEL, M.; WEETMAN, R. M.; DONALDSON, M.; MACKLIS, R. M.; GREEN, D. M. Treatment of anaplastic histology Wilms' tumor: results from the Fifth National Wilms' tumor Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 15, p. 2354-2358, 2006.

EHRlich, P. F.; HAMILTON, T. E.; GRUNDY, P. E.; RITCHEY, M.; HAASE, G.; SHAMBERGER, R. C. The value of surgery in directing therapy for patients with Wilms' tumor with pulmonary disease. A report from the National Wilms' tumor Study Group (National Wilms' tumor Study 5). **Journal of Pediatric Surgery**, v. 41, n. 1, p. 162-167, 2006.

EHRlich, P. F.; FERRER, F. A.; RITCHEY, M. L.; ANDERSON, J. R.; GREEN, D. M.; GRUNDY, P. E.; DOME, S.; KALAPURAKAL, J. A.; PERLMAN, E. J.; SHAMBERGER, R. C. Hepatic metastasis at diagnosis in patient with Wilms tumor is not an independent adverse prognostic factor for stage IV Wilms tumor. **Annals of Surgery**, v. 250, n. 4, p. 642-648, 2009.

FAKHARI, M.; PULLIRSCH, D.; PAYA, K.; ABRAHAM, D.; HOFBAUER, R.; AHARINEJAD, S. Upregulation of vascular endothelial growth factor receptors is associated with advanced neuroblastoma. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 37, n. 4, p. 582-587, 2002.

FARIA, P.; BECKWITH, J. B.; MISHRA, K.; ZUPPAN, C.; WEEKS, D. A.; BRESLOW, N.; GREEN, D. M. Focal versus diffuse anaplasia in Wilms tumor – new definitions with prognostic significance: a report from the National Wilms Tumor Study Group. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 20, n. 8, p. 909-920, 1996.

FRANCO, E. L.; DE CAMARGO, B.; SABA, L.; MARQUES, L. A. Epidemiological and clinical correlations with genetic characteristics of Wilms' tumor: results of the Brazilian Wilms' tumor study group. **International Journal of Cancer**, v. 48, n. 5, p. 641-646, 1991.

FUKUZAWA, R.; HEATHCOTI, R. W.; SANO, M.; MORISON, I. M.; YUN, K.; REEVE, A. E. Myogenesis in Wilms' tumors is associated with mutations of the WT1 gene and activation of Bcl-2 and the Wnt signaling pathway. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 7, n. 2, p. 125-137, 2004.

FUKUZAWA, R.; HEATHCOTI, R. W.; MORE, H. E.; REEVE, A. E. Sequential WT1 and CTNNB1 mutations and alterations of β -catenin localisation in intralobar nephrogenic rests and associated Wilms tumours: two case studies. **Journal of Clinical Pathology**, v. 60, n. 9, p. 1013-1016, 2007.

FUSTER, J. J.; SANZ-GONZÁLEZ, S. M.; MOLL, U. M.; ANDRÉS, V. Classical and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 13, n. 5, p. 192-199, 2007.

GALONEK, H. L.; HARDWICK, J. M. Upgrading the BCL-2 network. **Nature cell biology**, v. 8, n. 12, p. 1317-1319, 2006.

GAVATHIOTIS, E.; SUZUKI, M.; DAVIS, M. L.; PITTER, K.; BIRD, G. H.; KATZ, S. G.; TU, H. C.; KIM, H.; CHENG, E. H. Y.; TJANDRA, N.; WALENSKY, L. D. BAX activation is initiated at a novel interaction site. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1076-1081, 2008.

GEE, M. F. W.; TSUCHIDA, R.; EICHLER-JONSSON, C.; DAS, B.; BARUCHEL, S.; MALKIN, D. Vascular endothelial growth factor acts in an autocrine manner in rhabdomyosarcoma cell lines and can be inhibited with all-*trans*-retinoic acid. **Oncogene**, v. 24, n. 54, p. 8025-8037, 2005.

GELLER, J. I. Genetic stratification of the Wilms Tumor: is WT1 gene analysis ready for prime time? **Cancer**, v. 113, n. 5, p. 893-896, 2008.

GHANEM, M. A.; VAN DER KWAST, T. H.; DEN HOLLANDER, J. C.; SUDARYO, M. K.; OOMEN, M. H. A.; NOORDZIJ, M. A.; VAN DER HEUVEL, M. M.; NASSEF, S. M.; NIJMAN, R. J. M.; VAN STEENBRUGGE, G. J. Expression and prognostic value of Wilms' Tumor 1 and Early Growth Response 1 Proteins in nephroblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 11, p. 4265-4271, 2000.

GHANEM, M. A.; VAN DER KWAST, T. H.; DEN HOLLANDER, J. C.; SUDARYO, M. K.; VAN DER HEUVEL, M. M.; NOORDZIJ, M. A.; NIJMAN, R. J. M.; SOLIMAN, E. H.; VAN STEENBRUGGE, G. J. The prognostic significance or apoptosis-associated

proteins BCL-2, BAX and BCL-X in clinical nephroblastoma. **British Journal of Cancer**, v. 85, n. 10, p. 1557-1563, 2001.

GHANEM, M. A.; VAN STEENBRUGGE, G. J.; SUDARYO, M. K.; MATHOERA, R. B.; NIJMAN, J. M VAN DER KWAST, T. H. Expression and prognostic relevance of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (FLT-1) in nephroblastoma . **Journal of clinical pathology**, v. 56, n. 2, p. 107-113, 2003.

GHANEM, M. A.; VAN STEENBRUGGE, G. J.; NIJMAN, R. J. M.; VAN DER KWAST, T. H. Prognostic markers in nephroblastoma (Wilms' tumor). **Urology**, v. 65, n. 6, p. 1047-1054, 2005.

GILBERT-BARNES, E.; KAPUR, R. P.; OLIGNY, L. L. **Potter's Pathology of the Fetus, Infant and Child**. Mosby Inc, 2007, 2 CD-ROM.

GOVENDER, D.; HARLLAL, P.; HADLEY, G. P.; CHETTY, R. p53 protein expression in nephroblastomas: a predictor of poor prognosis. **British Journal of Cancer**, v. 77, n. 2, p. 314-318, 1998.

GREEN, D. M.; BECKWITH, J. B.; WEEKS, D. A.; MOKSNESS, J.; BRESLOW, N. E.; D'ANGIO, G. J. The relationship between microsubstaging variables, age at diagnosis, and tumor weight of children with stage I/favorable histology Wilms' tumor. A report from the National Wilms' tumor Study. **Cancer**, v. 74, n. 6, p. 1817-1820, 1994.

GREEN, D. M.; BRESLOW, N. E.; EVANS, I.; MOKSNESS, J.; D'ANGIO, G. J. Treatment of children with stage IV favorable histology Wilms tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 26. n. 3, p. 147-152, 1996.

GREEN, D. M.; BRESLOW, N. E.; BECKWITH, J. B.; RITCHEY, M. L.; SHAMBERGER, R. C.; HAASE, G. M.; D'ANGIO, G. J.; PERLMAN, E.; DONALDSON, M.; GRUNDY, P. E.; WEETMAN, R.; COPPES, M. J.; MALOGOLOWKIN, M.; SHEARER, P.; COCCIA, P.; KLETZEL, M.; THOMAS, P. R.; MACKLIS, R.; TOMLINSON, G.; HUFF, V.; NEWBURY, R.; WEEKS, D. Treatment with nephrectomy only for small, stage I/favorable histology Wilms' tumor: a report from the National Wilms' Tumor Study Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 17, p. 3719-3724, 2001.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. **Nature**, v. 438, n. 7242, p. 1127-1130, 2009.

GRUNDY, P. E.; BRESLOW, N. E.; LI, S.; PERLMAN, E.; BECKWITH, B.; RITCHEY, M. L.; SHAMBERGER, R. C.; HAASE, G. M.; D'ANGIO, G. J.; DONALDSON, M.; COPPES, M. J.; MALOGOLOWKIN, M.; SHEARER, P.; THOMAS, P. R. M.; MACKLIS, R.; TOMLINSON, G.; HUFF, V.; GREEN, D. M. Loss of heterozygosity for chromosomes 1p and 16q is an adverse prognostic factor in favorable-histology Wilms Tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 29, p. 7312-7321, 2005.

HALL, P. A.; LANE, D. P. p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry?-revisited! **Journal of Pathology**, v. 172, n. 1, p. 1-4, 1994.

HASTIE, N. D. The genetics of Wilms' tumor – a case of disrupted development. **Annual review of genetics**, v. 28, p. 523-558, 1994.

HECKLER, E. J.; ALON, A.; FASS, D.; THORPE, C. Human quiescin-sulfhydryl oxidase, QSOX1: probing internal redox steps by mutagenesis. **Biochemistry**, v. 47, n. 17, p. 4955-4963, 2008.

HECKLER, E. J.; RANCY, P. C.; KODALI, V. K.; THORPE, C. Generating disulfides with the quiescin sulfhydryl oxidases. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1783, n. 4, p. 567-577, 2008.

HILL, D. A.; SHEAR, T. D.; LIU, T.; BILLUPS, C. A.; SINGH, P. K.; DOME, J. S. Clinical and biologic significance of nuclear unrest in Wilms tumor. **Cancer**, v. 97, n. 9, p. 2319-2326, 2003.

HOHENSTEIN, P.; HASTIE, N. D. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 2, p. 196-201, 2006.

HOOBER, K. L.; GLYNN, N. M.; BURNSIDE, J.; COPPOCK, D. L.; THORPE, C. Homology between egg white sulfhydryl oxidase and quiescin Q6 defines a new class of flavin-linked sulfhydryl oxidases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 45, p. 31759-31762, 1999.

HOOS, A.; URIST, M. J.; STOJADINOVIC, A.; MASTORIDES, S.; DUDAS, M. E.; LEUNG, D. H. Y.; KUO, D.; BRENNAN, M. F.; LEWIS, J. J.; CORDON-CARDO, C. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. **American Journal of Pathology**, v. 158, n. 4, p. 1245-1251, 2001.

HUANG, C.; GADD, S.; BRESLOW, N.; CUTCLIFFE, C.; SREDNI, S. T.; HELENOWSKI, I. B.; DOME, J. S.; GRUNDY, P. E.; GREEN, D. M.; FRITSCH, M. K.; PERLMAN, E. J. Predicting relapse in favorable histology Wilms tumor using gene expression analysis: a report from the Renal Tumor Committee of the Children's Oncology Group. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 5, p. 1770-1778, 2009.

HUANG, J.; SOFFER, S. Z.; KIM, E. S.; YOKOI, A.; MOORE, J. T.; MCCRUDDEN, K. W.; MANLEY, C.; MIDDLESWORTH, W.; O'TOOLE, K.; STOLAR, C.; YAMASHIRO, D. J.; KANDEL, J. J. P53 accumulation in favorable-histology Wilms tumor is associated with angiogenesis and clinically aggressive disease. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 37, n. 3, p. 523-527, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER (BRASIL). COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA DE CÂNCER. Câncer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade. **INCA**. Rio de Janeiro, 2008.

ISOBE, M.; EMANUEL, B. S.; GIVOL, D.; OREN, M.; CROCE, C. M. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. **Nature**, v. 320, n. 6057, p. 84-85, 1986.

JEREB, B.; SANDSTEDT, B. Structure and size versus prognosis in nephroblastoma. **Cancer**, v. 31, n. 6, p. 1473-1481, 1973.

JEREB, B.; TOURNADE, M. F.; LEMERLE, J.; VOÛTE, P. A.; DELEMARRE, J. F.; AHSTROM, L.; FLAMANT, R.; GÉRARD-MARCHANT, R.; SANDSTEDT, B. Lymph node invasion and prognosis in nephroblastoma. **Cancer**, v. 45, n. 7, p. 1632-1636, 1980.

KALAPURAKAL, J. A.; DOME, J. S.; PERLMAN, E. J.; MALOGOLOWKIN, M.; HAASE, G. M.; GRUNDY, P.; COOPES, M. J. Management of Wilms' tumour: current practice and future goals. **The Lancet Oncology**, v. 5, n. 1, p. 37-46, 2004.

KALAPURAKAL, J. A.; LI, S. M.; BRESLOW, N. E.; BECKWITH, J. B.; RITCHEY, M. L.; SHAMBERGER, R. C.; HAASE, G. M.; THOMAS, P. R. M.; GRUNDY, P.; GREEN, D. M.; D'ANGIO, G. L. Intraoperative spillage of favorable histology Wilms tumor cells: influence of irradiation and chemotherapy regimens on abdominal recurrence. A report from the National Wilms tumor Study Group. **International Journal of radiation oncology, biology, physics**, v. 76, n. 1, p. 201-206, 2010.

KIM, R.; TANAKE, K.; UCHIDA, Y.; EMI, M.; INOUE, H.; TOGE, T. Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 50, n. 5, p. 343-352, 2002.

KIM, R.; EMI, M.; TANABE, K.; TOGE, T. Therapeutic potential of antisense Bcl-2 as a chemosensitizer for cancer therapy. **Cancer**, v. 101, n. 11, p. 2491-2502, 2004.

KIM, H. S.; KIM, M. S.; HANCOCK, A. L.; HARPER, J. C. P.; PARK, J. P.; POY, G.; PERANTONI, A. O.; CAM, M.; MALIK, K.; LEE, S. B. Identification of novel Wilms' tumor suppressor gene target genes implicated in kidney development. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 22, p. 16278-16287, 2007.

KIM, M. K.; MCGARRY, T. J.; O BROIN, P.; FLATOW, J. M.; GOLDEN, A. A.; LICHT, J. D. An integrated genome screen identifies the Wnt signaling pathway as a major target of WT1. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 106, n. 27, p. 11154-11159, 2009.

KITAMOTO, Y.; TOKUNAGA, H.; TOMITA, K. Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development: glomerulogenesis and nephrogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 10, p. 2351-2357, 1997.

KITAMOTO, Y.; TOKUNAGA, H.; MYAMOTO, K.; TOMITA, K. VEGF is an essential molecule for glomerular structuring. **Nephrology, dialysis, transplantation**, v. 17, n. 9, p. 25-27, 2002.

1.

2. KNUDSON, A. G. JR.; STRONG, L. C. MUTATION AND CANCER: A MODEL FOR WILMS' TUMOR OF THE KIDNEY. **JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE**, V. 48, N. 2, P. 313-324, 1972.

KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIEMI, A.; BARLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S.; TORHORST, J.; MIHATSCH, M. J.; SAUTER, G.; KALLIONIEMI, O. P. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nature Medicine**, v. 4, n. 7, p. 844-847, 1998.

KRAJEWSKI, S.; BLOMQVIST, C.; FRANSSILA, K.; KRAJEWSKA, M.; WASENIUS, V. M.; NISKANEN, E.; NODLING, S.; REED, J. C. Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. **Cancer Research**, v. 55, n. 19, p. 4471-4478, 1995.

KRUSE, J. P.; GU, W. Modes of p53 regulation. **Cell**, v. 137, n. 4, p. 609-617, 2009.

KUSAFUKA, T.; FUKUZAWA, M.; OUE, T.; KOMOTO, Y.; YONEDA, A.; OKADA, A. Mutations analysis of p53 gene in childhood malignant solid tumors. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 32, n. 8, p. 1176-1180, 1997.

LAHOTI, O.; THORNER, P.; MALKIN, D.; YEGER, H. Immunohistochemical detection of p53 in Wilms' tumors correlates with unfavorable outcome. **American Journal of Pathology**, v. 148, n. 5; p. 1577-1589, 1996.

LALIER, L.; CARTRON, P. F.; JUIN, P.; NEDELKINA, S.; MANON, S.; BECHINGER, B.; VALLETTE, F. M. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. **Apoptosis**, v. 12, n. 5, p. 887-896, 2007.

LARSEN, E.; PEREZ-ATAYDE, A.; GREEN, D. M.; RETIK, A.; CLAVELL, L. A.; SALLAN, S. E. Surgery only for the treatment of patients with stage I (Cassady) Wilms' tumor. **Cancer**, v. 66, n. 2, p. 264-266, 1990.

LEE, S. B.; HABER, D. A. Wilms tumor and the WT1 gene. **Experimental Cell Research**, v. 264, n. 1, p. 74-99, 2001.

LEMERLE, J.; TOURNADE, M. F.; MARCHANT, R. G.; FLAMANT, R.; SARRAZIN, D.; FLAMANT, F.; LEMERLE, M.; JUNDT, S.; ZUCKER, J. M.; SCHWEISGUTH, O. Wilms' tumor: natural history and prognostic factors. A retrospective study of 248 cases treated at the Institut Gustave-Roussy 1952-1967. **Cancer**, v. 37, n. 5, p. 2557-2566, 1976.

LEMERLE, J.; VOUTE, P. A.; TOURNADE, M. F.; RODARY, C.; DELEMARRE, J. F. M.; SARRAZIN, D.; BURGERS, J. M. V.; SANDSTEDT, B.; MILDENBERGER, H.; CARLI, M.; JEREB, B.; MOORMAN-VOESTERMANS, C. G. M. Effectiveness of preoperative chemotherapy in Wilms' tumor: results of an International Society of Pediatric Oncology (SIOP) clinical trials. **Journal of Clinical Oncology**, v. 1, n. 10, p. 604-609, 1983.

LEMOINE, N. R.; HUGHES, C. M.; COWELL, J. K. Aberrant expression of the tumour suppressor gene p53 is very frequent in Wilms' tumours. **Journal of Pathology**, v. 168, n.2, p. 237-242, 1992.

LI, W.; KESSLER, P.; YEGER, H.; ALAMI, J.; REEVE, A. E.; HEATHCOTT, R.; SKEEN, J.; WILLIAMS, B. R. G. A gene expression signature for relapse of primary Wilms tumors. **Cancer research**, v. 65, n. 7, p. 2592-2601, 2005.

LITTLE, S. E.; HANKS, S. P.; KING-UNDERWOOD, L.; JONES, C.; RAPLEY, E. A.; RAHMAN, N.; PRITCHARD-JONES, K. Frequency and heritability of WT1 mutations in nonsyndromic Wilms' Tumor patients: a UK Children's Cancer Study Group Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 20, p. 4140-4146, 2004.

LOEB, D. M.; SUKUMAR, S. The role of WT1 in oncogenesis: tumor suppressor or oncogene? **International Journal of Hematology**, v. 76, n. 2, p. 117-126, 2002.

MAC GABHANN, F.; POPEL, A. S. Systems biology of vascular endothelial growth factors. **Microcirculation**, v. 15, n. 8, p. 715-738, 2008.

MARX, M.; LANGER, T.; GRAF, N.; HAUSDORF, G.; STÖHR, W.; LUDWIG, R.; BECK, J. D. Multicentre analysis of anthracycline-induced cardiotoxicity in children following treatment according to the nephroblastoma studies SIOP no. 9/GPOH and SIOP 93-01/GOPH. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 39, n. 1, p. 18-24, 2002.

MASCHIETTO, M., DE CAMARGO, B.; BRENTANI, H.; GRUNDY, P.; SREDNI, S. T.; TORRES, C.; MOTA, L. D.; CUNHA, I. W.; PATRÃO, D. F. C.; COSTA, C. M. L.; SOARES, F. A.; BRENTANI, R. R.; CARRARO, D. M. Molecular profiling of isolated histological components of Wilms Tumor implicates a common role for the Wnt signaling pathway in kidney and tumor development. **Oncology**, v. 75, n.1-2 , p. 81-91, 2008.

MASSOD, R.; CAI, J., ZHENG, T.; SMITH, D. L.; HINTON, D. R.; GILL, P. S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. **Blood**, v. 98, n. 6, p. 1904-1913, 2001.

MATSUBA, S.; SUGA, Y.; ISHIDOH, K.; HASHIMOTO, Y.; TAKAMORI, K.; KOMINAMI, E.; WILHELM, B.; SEITZ, J.; OGAWA, H. Sulfhydryl oxidase (SOx) from mouse epidermis: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of recombinant protein in the cultured cells. **Journal of Dermatological Science**, v. 30, n. 1, p. 50-62, 2002.

MAYO, M. W.; WANG, C. Y.; DROUIN, S. S.; MADRID, L. V.; MARSHALL, A. F.; REED, J. C.; WEISSMAN, B. E.; BALDWIN, A. S. WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 18, n. 14, p. 3990-4003, 1999.

MCBRIDE, O. W.; MERRY, D.; GIVOL, D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 83, n. 1, p. 130-134, 1986.

MEISTER, B.; GRÜNEBACH, F.; BAUTZ, F.; BRUGGER, W.; FINK, F. M.; KANZ, L.; MÖHLE, R. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human neuroblastoma. **European Journal of Cancer**, v.35, n. 3, p. 445-449, 1999.

MESSAHEL, B.; WILLIAMS, R.; RIDOLFI, A.; A'HERN, R.; WARREN, W.; TINWORTH, L.; HOBSON, R.; AL-SAAD, R.; WHYMAN, G.; BRUNDLER, M.; KELSEY, A.; SEBIRE, N.; JONES, C.; VUJANIĆ, G.; PRITCHARD-JONES, K. Allele loss at 16q defines poorer prognosis Wilms tumour irrespective of treatment approach in the UKW1-3 clinical trials: A Children's Cancer and Leukaemia Group (CCLG) study. **European Journal of Cancer**, v. 45, n. 5, p. 819-826, 2009.

MITCHELL, C.; PRITCHARD-JONES, K.; SHANNON, R.; HUTTON, C.; STEVENS, S.; MACHIN, D.; IMESON, J.; KELSEY, A.; VUJANIĆ, G. M.; GORNALL, P.; WALKER, J.; TAYLOR, R.; SARTORI, P.; HALE, J.; LEVITT, G.; MESSAHEL, B.; MIDDLETON, H.; GRUNDY, R.; PRITCHARD, J. Immediate nephrectomy versus preoperative chemotherapy in the management of non-metastatic Wilms' tumour: results of a randomized trial (UKW3) by the UK Children's Cancer Study Group. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 15, p. 2554-2562, 2006.

MIYAGAWA, K.; KENT, J.; MOORE, A.; CHARLIEU, J. P.; LITTLE, M. H.; WILLIAMSON, K. A.; KELSEY, A.; BROWN, K. W.; HASSAM, S.; BRINER, J.; HAYASHI, Y.; HIRAI, H.; YAZAKI, Y.; VAN HEYNINGEN, V.; HASTIE, N. D. Loss of WT1 function leads to ectopic myogenesis in Wilms' tumour. **Nature genetics**, v. 18, n. 1, p. 15-17, 1998.

MOREL, C.; ADAMI, P.; MUSARD, J. F.; DUVAL, D.; RADOM, J.; JOUVENOT, M. Involvement of sulfhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 313, n. 19, p. 3971-3982, 2007.

MORRISON, D. J.; ENGLISH, M. A.; LICHT, J. D. WT1 induces apoptosis through transcriptional regulation of the proapoptotic Bcl-2 family members Bak. **Cancer Research**, v. 65, n. 18, p. 8174-8182, 2005.

MUSARD, J. F.; SALLOT, M.; DULIEU, P.; FRAICHARD, A.; ORDENER, C.; REMY-MARTIN, J. P.; JOUVENOT, M.; ADAMI, P. Identification and expression of a new sulfhydryl oxidase SOx-3 during the cell cycle and the estrus cycle in uterine cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 287, n. 1, p. 83-91, 2001.

NAKATSUKA, S.; OJI, Y.; HORIUCHI, T.; KANDA, T.; KITAGAWA, M.; TAKEUCHI, T.; KAWANO, K.; KUWAE, Y.; YAMAUCHI, A.; OKUMURA, M.; KITAMURA, Y.; OKA, Y.; KAWASE, I.; SUGIYAMA, H.; AOZASA, K. Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. **Modern Pathology**, v. 19, n. 6, p. 804-814, 2006.

NG, A.; GRIFFITHS, A.; COLE, T.; DAVISON, V.; GRIFFITHS, M.; LARKIN, S.; PARKES, S. E.; MANN, J. R.; GRUNDY, R. G. Congenital abnormalities and clinical features associated with Wilms' tumour: a comprehensive study from a centre serving a large population. **European Journal of Cancer**, v. 43, n. 9, p. 1422-1429, 2007.

NICOLIN, G.; TAYLOR, R.; BAUGHAN, C.; SHANNON, R.; STEVENS, S.; RICHARDSON, D.; KELSEY, A.; PRITCHARD-JONES, K.; MITCHELL, C. Outcome after pulmonary radiotherapy in Wilms' tumor patients with pulmonary metastasis at diagnosis: a UK Children's Cancer Study Group, Wilms' tumour Working Group Study. **International Journal of radiation oncology, biology, physics**, v. 70, n. 1, p. 178-180, 2008.

NOURKAMI, N.; FURWÄNGLER, R.; ALKASSAR, M.; GRAF, N. Secondary neoplasms after Wilms' tumor in Germany. **Strahlentherapie und Onkologie**, v. 185, n. 2, p. 11-12, 2009.

NOWICKI, M.; OSTALSKA-NOWICKA, D.; KACZMAREK, M.; MISKOWIAK, B.; WITT, M. The significance of VEGF-C/VEGFR-2 interaction in the neovascularization and prognosis of nephroblastoma (Wilms' tumour). **Histopathology**, v. 50, n. 3, p. 358-364, 2007.

OLTVAI, Z. N.; MILLIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell**, v. 74, n. 4, 609-619, 1993.

PARK, S.; BERNARD, A.; BOVE, K. E.; SENS, D. A.; HAZEN-MARTIN, D. J.; GARVIN, A. J.; HABER, D. A. Inactivation of WT1 in nephrogenic rests, genetic precursors to Wilms' tumour. **Nature genetics**, v. 5, n. 4, p. 363-367, 1993.

PASTORE, G.; CARLI, M.; LEMERLE, J.; TOURNADE, M. F.; VOUTE, P. A.; REY, A.; BURGERS, J. M. V.; ZUCKER, J. M.; BURGER, D.; DE KRAKER, J.; DELEMARRE, J. F. M. Epidemiological features of Wilms' tumor: results of studies by the International Society of Paediatric Oncology (SIOP). **Medical and Pediatric Oncology**, v. 16, n. 1, p. 7-11, 1988.

PERES, E. M.; SAVASAN, S.; CUSHING, B.; ABELLA, S.; MOHAMED, A. N. Chromosome analyses of 16 cases of Wilms tumor: different pattern in unfavorable histology. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 148, n. 1, 66-70, 2004.

PORTES, K. F.; IKEGAMI, C. M.; GETZ, J.; MARTHINS, A. P.; NORONHA, L.; ZISCHLER, L. F.; KLASSEN, G.; CAMARGO, A. A.; ZANATA, S. M.; BEVILACQUA, E.; NAKAO, L. S. Tissue distribution of quiescin Q6/sulfhydryl oxidase (QSOX) in developing mouse. **Journal of molecular histology**, v. 39, n. 2, p. 217-225, 2007.

PRITCHARD-JONES, K.; KELSEY, A.; VUJANIĆ, G.; IMESON, J.; HUTTON, C.; MITCHELL, C. Older age is an adverse prognostic factor in stage I, favorable histology Wilms' tumor treated with vincristine monochemotherapy: a study by the United Kingdom Children's Cancer Study Group, Wilms' tumor Working Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 17, p. 3269-3275, 2003.

PRITCHARD-JONES, K.; VUJANIĆ, G. Multiple pathways to Wilms tumor: how much is genetic? **Pediatric blood & cancer**, v. 47, n. 3, p. 232-234, 2006.

RAPLEY, E. A.; BONAITI-PELLIÉ, C.; CHOMPRET, A.; FOULKES, W.; PERUSINGHE, N.; REEVE, A.; ROYER-POKORA, B.; SCHUMACHER, V.; SHELLING, A.; SKEEN, J.; DE TOURREIL, S.; WEIRICH, A.; PRITCHARD-JONES, K.; STRATTON, M. R.; RAHMAN, N. Evidence for susceptibility genes to familial Wilms tumour in addition to WT1, FWT1 and FWT2. **British Journal of Cancer**, v. 83, n. 2, p. 177-183, 2000.

RE, G. G.; HAZEN-MARTIN, D. J.; BAHTIMI, R. E.; BROWNLEE, N. A.; WILLINGHAM, M. C.; GARVIN, A. J. Prognostic significance of Bcl-2 in Wilms' tumor and oncogenic potential of Bcl-X_L in rare tumor cases. **International Journal of Cancer**, v. 84, n. 2, p. 192-200, 1999.

REINHARD, H.; SCHMIDT, A.; FURTWÄNGLER, R.; LEUSCHNER, I.; RÜBE, C.; VON SCHWEINITZ, D.; ZOUBEK, A.; NIGGLI, F.; GRAF, N. Outcome of relapses of nephroblastoma in patients registered in the SIOP/GPOH trials and studies. **Oncology Reports**, v. 20, n. 2, p. 463-467, 2008.

RITCHEY, M. L.; GREEN, D. M.; BRESLOW, N. B.; MOKSNESS, J.; NORKOOL, P. Accuracy of current imaging modalities in the diagnosis of synchronous bilateral Wilms' tumor. **Cancer**, v. 75, n. 2, p. 600-604, 1995.

RITCHEY, M. L.; SHAMBERGER, R. C.; HAMILTON, T.; HAASE, G.; ARGANI, P.; PETERSON, S. Fate of bilateral renal lesions missed on preoperative imaging: a report from the National Wilms tumor Study Group. **The Journal of Urology**, v. 174, n. 4pt2, p. 1519-1521, 2005.

RIVERA, M. N.; HABER, D. A. Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. Nature reviews. **Cancer**, v. 5, n. 9, p. 699-712, 2005.

ROCHA, R. M.; ANDRADE, V. P.; NUNES, C. B.; ROCHA, G. F. S.; SANCHES, F. S. F.; OLIVEIRA, F. N.; GOBBI, H. Construção de *arrays* de tecido com equipamento alternativo e de baixo custo para estudo imuno-histoquímico de tumores mamários. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 6, p. 477-482, 2006.

ROY, H.; BHARDWAJ, S.; YLÄ-HERTTUALA, S. Biology of vascular endothelial growth factors. **FEBS letters**, v. 580, n. 12, p. 2879-2887, 2006.

ROYER-POKORA, B.; WEIRICH, A.; SCHUMACHER, V.; USCHKEREIT, C.; BEIER, M.; LEUSCHNER, I.; GRAF, N.; AUTSCHBACH, F.; SCHNEIDER, D.; VON HARRACH, M. Clinical relevance of mutations in the Wilms Tumor suppressor 1 gene WT1 and the cadherin-associated protein β 1 gene CTNNB1 for patients with Wilms tumors. **Cancer**, v. 113, n. 5, p. 1080-1089, 2008.

RUTESHOUSER, E. C.; ROBINSON, S. M.; HUFF, V. Wilms tumor genetics: mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors. **Genes, chromosomes & cancer**, v. 47, n. 6, p. 461-470, 2008.

SCHUMACHER, V.; SCHNEIDER, S.; FIGGE, A.; WILDHARDT, G.; HARMS, D.; SCHMIDT, D.; WEIRICH, A.; LUDWIG, R.; ROYER-POKORA, B. Correlation of germ-line mutations and two-hit inactivation of the WT1 gene with Wilms tumors of stromal-predominant histology. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 94, n. 8, p. 3972-3977, 1997.

SCHUMACHER, V.; SCHUHEN, S.; SONNER, S.; WEIRICH, A.; LEUSCHNER, I.; HARMS, D.; LICHT, J.; ROBERTS, S.; ROYER-POKORA, B. Two molecular subgroups of Wilms' tumors with or without WT1 mutations. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 6, p. 2005-2014, 2003.

SCOTT, R. H.; STILLER, C. A.; WALKER, L.; RAHMAN, N. Syndromes and constitutional chromosomal abnormalities associated with Wilms tumour. **Journal of Medical Genetics**, v. 43, n. 9, p. 705-715, 2006.

SHAMBERGER, R. C.; GUTHRIE, K. A.; RITCHEY, M.L.; HAASE, G. M.; TAKASHIMA, J.; BECKWITH, J. B.; D'ANGIO, G. J.; GREEN, D. M.; BRESLOW, N. E. Surgery-related factors and local recurrence of Wilms tumor in National Wilms tumor Study 4. **Annals of Surgery**, v. 229, n. 2, p. 292-297, 1999.

SHAMBERGER, R. C.; HAASE, G. M.; ARGANI, P.; PERLMAN, E. J.; COTTON, C. A.; TAKASHIMA, J.; GREEN, D. M.; RITCHEY, M.L. Bilateral Wilms' tumors with progressive or nonreponsive disease. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 41, n. 4, p. 652-657, 2006.

SHEARER, P.; KAPOOR, G.; BECKWITH, J. B.; TAKASHIMA, J.; BRESLOW, N.; GREEN, D. M. Secondary acute myelogenous leukemia in patients previously treated for childhood renal tumors: a report from the National Wilms tumor Study Group. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 23, n. 2, p. 109-111, 2001.

SHEIBANI, N.; SCHEEF, E. A.; DIMAIO, T. A.; WANG, Y.; SHUJI, K.; SORENSON, C. M. Bcl-2 expression modulates cell adhesion and migration promoting branching of ureteric bud cells. **Journal of cellular physiology**, v. 210, n. 3, p. 626-625, 2007.

SHIBUYA, M. Differential roles of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and Receptor-2 in angiogenesis. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 39, n. 5, p. 469-478, 2006.

SIMON, R.; MIRLACHER, M.; SAUTER, G. Tissue microarrays. **Biotechniques**, v. 36, n. 1, p. 98-105, 2004.

SKOTNICKA-KLONOWICZ, G.; KOBOS, J.; LOS, E.; TREJSTER, E.; SZYMIK-KANTOROWICZ, S.; DASZKIEWICZ, P. Prognostic value of p53 expression in Wilms' tumor in children. **Medical Science Monitor**, v. 7, n. 6, p. 1224-1229, 2001.

SLONGO, M. L.; MOLENA, B.; BRUNATI, A. M.; FRASSON, M.; GARDIMAN, M.; CARLI, M.; PERILONGO, G.; ROSOLEN, A.; ONISTO, M. Functional VEGF and VEGF receptors are expressed in human medulloblastomas. **Neuro-oncology**, v. 9, n. 4, p. 384-392, 2007.

SREDNI, S. T.; CAMARGO, B.; LOPES, L. F.; TEIXEIRA, R.; SIMPSON, A. Immunohistochemical detection of p53 protein expression as a prognostic indicator in Wilms tumor. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 37, n. 5, p. 455-458, 2001.

SREDNI, S. T.; GADD, S.; HUANG, C.; BRESLOW, N.; GRUNDY, P.; GREEN, D. M.; DOME, J. S.; SHAMBERGER, R. C.; BECKWITH, J. B.; PERLMAN, E. J. Subsets of very low risk Wilms tumor show distinctive gene expression, histologic, and clinical features. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 22, p. 6800-6809, 2009.

STILLER, C. A.; PARKIN, D. M. International variations in the incidence of childhood renal tumours. **British Journal of Cancer**, v. 62, n. 6, p. 1026-1030, 1990.

STILLER, C. A.; PARKIN, D. M. Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer. **British Medical Bulletin**, v. 52, n. 2, p. 682-703, 1996.

SZAVAY, P.; LUITHLE, T.; GRAF, N.; FURTWÄNGLER, R.; FUCHS, J. Primary hepatic metastases in nephroblastoma – a report of the SIOP/GPOH study. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 41, n. 1, p. 168-172, 2006.

TAMMELA, T.; ENHOLM, B.; ALITALO, K.; PAAVONEN, K. The biology of vascular endothelial growth factors. **Cardiovascular Research**, v. 65, n. 3, p. 550-563, 2005.

TANAKA, K.; GRANATA, C.; WANG, Y.; O'BRIAIN, D. S.; PURI, P. Apoptosis and bcl-2 oncogene expression Wilms' tumor. **Pediatric Surgery International**, v. 15, n. 3-4, p. 243-247, 1999.

TAYLOR, A. J.; WINTER, D. L.; PRITCHARD-JONES, K.; STILLER, C. A.; FROBISCHER, C.; LANCASHIRE, E. R.; REULEN, R. C.; HAWKINS, M. M. Second primary neoplasms in survivors of Wilms' tumour – a population-based cohort study from the British Childhood Cancer Survivor Study. **International Journal of Cancer**, v. 122, n. 9, p. 2085-2093, 2008.

THORPE, C.; COPPOCK, D. L. Generating disulfides in multicellular organisms: emerging roles for a new flavoprotein family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 19, p. 13929-13933, 2007.

THORPE, C.; HOOBER, K. L.; RAJE, S.; GLYNN, N. M.; BURNSIDE, J.; TURI, G. K.; COPPOCK, D. L. Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.405, n. 1, p. 1-12, 2002.

TURY, A.; MAIRET-COELLO, G.; ESNARD-FÈVE, A.; BENAYOUN, B.; RISOLD, P. Y.; GRIFFOND, B.; FELLMANN, D. Cell-specific localization of the sulphhydryl oxidase QSOX in rat peripheral tissues. **Cell Tissue Research**, v. 323, n. 1, p. 91-103, 2006.

TURY, A.; MAIRET-COELLO, G.; PONCET, F.; JACQUEMARD, C.; RISOLD, P. Y.; FELLMANN, D.; GRIFFOND, B. QSOX sulfhydryl oxidase in rat adenohypophysis: localization and regulation by estrogens. **Journal of Endocrinology**, v.183, n. 2, p. 353-363, 2004.

VARAN, A.; BÜYÜKPAMUKÇU, N.; ÇAĞLAR, M.; KÖKSAL, Y.; YALÇIN, B.; AKYÜZ, C.; KUTLUK, T.; BÜYÜKPAMUKÇU, M. Prognostic significance of metastatic site at diagnosis in Wilms' tumor. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 27, n. 4, p. 188-191, 2005.

VARAN, A. Wilms' tumor in children: an overview. **Nephron. clinical practice**, v. 108, n. 2, p. c83-c90, 2008.

VUJANIĆ, G. M.; HARMS, D.; SANDSTEDT, B.; WEIRICH, A.; DE KRAKER; DELEMARRE, J. F. M. New definitions of focal and diffuse anaplasia in Wilms tumor: the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) experience. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 32, n. 5, p. 317-323, 1999.

VUJANIĆ, G. M.; SANDSTEDT, B.; HARMS, D.; KELSEY, A.; LEUSCHNER, I.; DE KRAKER, J. Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 38, n. 2, p. 79-82, 2002.

VUJANIĆ, G. M.; SANDSTEDT, B.; KELSEY, A.; SEBIRE, N. J. Central pathology review in multicenter trials and studies. **Cancer**, v. 115, n. 9, p. 1977-1983, 2009.

VUONONVIRTA, R.; SEBIRE, N. J.; DALLOSSO, A. R.; REIS-FILHO, J. R.; WILLIAMS, R. D.; MACKAY, A.; FENWICK, K.; GRIGORIADIS, A.; ASHWORTH, A.; PRITCHARD-JONES, K.; BROWN, K. W.; VUJANIĆ, G. M.; JONES, C. Perilobar nephrogenic rests are non-obligate molecular genetic precursor lesions of IGF2-associated Wilms tumours. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 23, p. 7635-7644, 2008.

ZHUANG, Z.; MERINO, M. J.; VORTMEYER, A. O.; BRYANT, B.; LASH, A. E.; WANG, C.; DEEVERS, M. T.; SHELTON, W. F.; KAPUR, S.; CHANDRA, R. S. Identical genetic changes in different histologic components of Wilms' Tumors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 15, p. 1148-1151, 1997.

WABER, P. G.; CHEN, J.; NISEN, P. D. Infrequency of ras, p53, WT1, or RB gene alterations in Wilms tumors. **Cancer**, v. 72, n. 12, p. 3732-3738, 1993.

WAGNER, N.; MICHIELS, J. F.; SCHEDL, A.; WAGNER, K. D. The Wilms' tumour suppressor WT1 is involved in endothelial cell proliferation and migration: expression in tumor vessels *in vivo*. **Oncogene**, v. 27, n. 26, p. 3662-3672, 2008.

WALKER, R. A. Quantification of immunohistochemistry – issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. **Histopathology**, v. 49, n. 4, p. 406-410, 2006.

WEEKS, D. A.; BECKWITH, J. B.; LUCKEY, D. W. Relapse-associated variables in stage I favorable histology Wilms' tumor. A report of the National Wilms' tumor Study. **Cancer**, v. 60, n. 6, p. 1204-1212, 1987.

WEIRICH, A.; LEUSCHNER, I.; HARMS, D.; VUJANIĆ, G. M.; TRÖGER, J.; ABEL, U.; GRAF, N.; SCHMIDT, D.; LUDWIG, R.; VOÛTE, P. A. Clinical impact of histologic subtypes in localized non-anaplastic nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH. **Annals of Oncology**, v. 12, n. 3, p. 311-319, 2001.

WEIRICH, A.; LUDWIG, R.; GRAF, N.; ABEL, U.; LEUSCHNER, I.; VUJANIĆ, G. M.; MEHLS, O.; BOOS, J.; BECK, J.; ROYER-POKORA, B.; VOÛTE, P. A. Survival in nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH with respect to relapse and morbidity. **Annals of Oncology**, v. 15, n. 5, p. 808-820, 2004.

WILMS, C. M. W. Die Mischgeschwülste der Niere. Leipzig, Verlag von Arthur Georgi, 1899.

WITTKÉ, I.; WIEDEMEYER, R.; PILLMANN, A.; SAVELYEVA, L.; WESTERMANN, F.; SCHWAB, M. Neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase, a new member of the sulfhydryl oxidase/quiescina6 family, regulates sensitization to interferon γ -induced cell death in human neuroblastoma cells. **Cancer research**, v. 63, n. 22, p. 7742-7752, 2003.

WITTMANN, S.; ZIRN, B.; ALKASSAR, M.; AMBROS, P.; GRAF, N.; GESSLER, M. Loss of 11q and -16q in Wilms tumors is associated with anaplasia, tumor recurrence and poor prognosis. **Genes, chromosome & cancer**, v. 46, n. 2, p. 163-170, 2007.

WITTMANN, S.; WUNDER, C.; ZIRN, B.; FURTWÄNGLER, R.; WEGERT, J.; GRAF, N.; GESSLER, M. New prognostic markers revealed by evaluation of genes correlated with clinical parameters in Wilms tumors. **Genes, chromosome & cancer**, v. 47, n. 5, p. 386-395, 2008.

YANG, L.; HAN, Y.; SAUREZ SAIZ, F.; MINDER, M. D. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. **Leukemia**, v. 21, n. 5, p. 868-876, 2007.

YIP, K. W.; REED, J. C. Bcl-2 family proteins and cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6398-6406, 2008.