



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CINTYA MAYUMI ISHIBASHI

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO FATOR DE
CRESCIMENTO TRANSFORMADOR B1 E RECEPTOR
TGFBRII EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM TUMOR DE
WILMS**

Londrina
2017

CINTYA MAYUMI ISHIBASHI

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO FATOR DE
CRESCIMENTO TRANSFORMADOR B1 E RECEPTOR
TGFBRII EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM TUMOR DE
WILMS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe

Coorientadora: Dra. Carolina Batista Ariza

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Ishibashi, Cintya Mayumi.

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR B1 E RECEPTOR TGFBR1 EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM TUMOR DE WILMS / Cintya Mayumi Ishibashi. - Londrina, 2017.

73 f. : il.

Orientador: Maria Angelica Ehara Watanabe.

Coorientador: Carolina Batista Ariza.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Tumor de Wilms - Tese. 2. TGFBR1 - Tese. 3. TGFBR2 - Tese. 4. polimorfismos genéticos - Tese. I. Watanabe, Maria Angelica Ehara. II. Ariza, Carolina Batista. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CINTYA MAYUMI ISHIBASHI

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO FATOR DE CRESCIMENTO
TRANSFORMADOR B1 E RECEPTOR TGFBR2 EM PACIENTES
PEDIÁTRICOS COM TUMOR DE WILMS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Karen Brajão de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Bruna Karina Banin Hirata
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 16 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Profa Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe pela excelente orientação ao longo desses quatro em que estive em seu laboratório. Obrigada pelo exemplo profissional, pelos ensinamentos, por toda a paciência e amizade. Sou muito grata por ter me acolhido nessa família!

Agradeço à minha co-orientadora Dra. Carolina Batista Ariza por mesmo de longe ter me acompanhado nesse trabalho. Obrigada pela paciência e pela disposição!

Agradeço também aos meus colegas e ex-colegas do Laboratório de Estudos e Aplicações de Polimorfismos de DNA e Laboratório de Genética Molecular e Imunologia por toda a paciência, companheirismo e disposição. Obrigada pela amizade, sou muita grata por tê-los conhecido!

Aos membros da banca examinadora de defesa, Profa. Dra Bruna Karina Banin Hirata e Profa. Dra Karen Brajão de Oliveira, e à Profa. Dra Roberta Losi Guembarovski, membro da banca examinadora de qualificação, pelo aceite em avaliar esse trabalho e pelas contribuições para a melhora deste.

Agradeço à Dra Alda Losi Guembarovski, à Dra. Marina Kishima, à Profa Dra. Marla Karine Amarante, à Profa Daniele Sartori e ao Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina por nos ter auxiliado e fornecido as amostras utilizadas nesse trabalho.

Agradeço aos pais das crianças e à todas as crianças doadoras voluntárias que generosamente cederam as amostras biológicas para a realização desse estudo e sem as quais nada poderia ter sido realizado.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental pela formação acadêmica e científica.

Agradeço aos órgãos de fomento às pesquisas, CNPq, Fundação Araucária e a CAPES, cujo financiamento proporcionou a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Frank e Rosangela pela educação a mim concedida, por todo o carinho, compreensão e paciência ao longo desses anos. Ao meu irmão Leopholdo, pelo companheirismo, paciência, cumplicidade e por ser meu eterno irmãozinho! E aos meus familiares pelo apoio e carinho.

Agradeço também ao meu amigo e companheiro Wagner Luiz Schmit pela paciência infinita, amizade, apoio e companheirismo, e a todos que de alguma forma, em algum momento, participaram dessa trajetória. Sou grata por cada momento, por cada risada, por cada lágrima, muito obrigada!

"São as perguntas que não podemos responder que nos ensinam mais,
Eles nos ensinam a pensar,
Se você der a um homem uma resposta, tudo o que ele ganha é um pequeno fato,
Mas lhe dê uma pergunta e ele vai procurar por suas próprias respostas "

Patrick Rothfuss

ISHIBASHI, C. M. **Polimorfismos genéticos do fator de crescimento transformador B1 e receptor TGFBR2 em pacientes pediátricos com tumor de Wilms.** 2017. 73 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Os tumores renais compreendem 6% de todas as neoplasias pediátricas e, destes, 95% são do tipo embrionário, denominado de Tumor de Wilms (TW). O microambiente é crítico na patogênese do câncer através da interação entre as células neoplásicas, estroma e sistema imune. O Fator de Crescimento Transformador B1 (TGFB1) é uma citocina pleiotrópica que, através da ligação com um complexo de receptores transmembranares serina/treonina quinase (TGFBRI e TGFBR2), atua de maneira dual no contexto neoplásico como inibidor do crescimento tumoral em estágios iniciais e promotor do crescimento em estágios avançados da carcinogênese. Muitos polimorfismos genéticos de *TGFB1* e de seu receptor *TGFBR2* têm sido relatados em associação com o desenvolvimento de doenças, inclusive o câncer. Nesse contexto, o presente estudo objetivou avaliar a influência dos polimorfismos rs1800468, rs1800469, rs1800470 e rs1800471 de *TGFB1* e suas estruturas haplotípicas e do polimorfismo rs3087465 de *TGFBR2* na susceptibilidade e prognóstico da doença. Inicialmente, investigou-se os 4 polimorfismos de *TGFB1* em relação a susceptibilidade e prognóstico de TW. Foram genotipadas 35 amostras de tecido tumoral de pacientes com TW e 170 amostras de sangue periférico ou mucosa bucal de crianças livres de neoplasia, por PCR-RFLP seguido de análise em gel de poliacrilamida corado em nitrato de prata. Foi encontrada associação do alelo T do polimorfismo rs1800469 (OR= 8,417; 95% IC= 3,177 a 22,297; $p < 0,001$) e do alelo C do polimorfismo rs1800470 (OR= 3,000; 95% IC= 1,296 a 6,944; $p < 0,01$) de *TGFB1*, ambos no modelo recessivo, com risco de desenvolvimento ao tumor. Nenhuma correlação foi observada entre os polimorfismos e os parâmetros clínicos dos pacientes (tamanho tumoral, invasão capsular, acometimento de linfonodos e metástase). Além disso foi encontrada associação significativa da estrutura haplotípica GCTG com a diminuição do risco de desenvolvimento de TW (OR= 0,2361, IC 95%= 0,105 a 0,534; $p < 0,001$) e GTTG, que foi associado com risco (OR= 12,00; IC 95%= 4,202 a 34,270; $p < 0,001$). Posteriormente, foi investigado o polimorfismo rs3087465 de *TGFBR2*. Esse estudo foi constituído de 35 amostras de tecido tumoral de pacientes TW e 123 amostras de sangue periférico de indivíduos controles. Nenhuma associação foi observada quanto ao polimorfismo e susceptibilidade ao TW, no entanto, em relação às características clínico-patológicas dos pacientes foi observada uma correlação negativa do polimorfismo para invasão capsular ($\tau = -0,430$; $p = 0,029$) e acometimento de linfonodos ($\tau = -0,449$; $p = 0,022$). Assim, embora estudos adicionais sejam necessários para esclarecer o papel de TGFB1 e TGFBR2 no TW, o presente trabalho é o primeiro a demonstrar que variantes alélicas destes genes, podem representar um marcador de suscetibilidade e prognóstico ao TW.

Palavras-chave: Tumor de Wilms. Polimorfismos genéticos. *TGFB1*. *TGFBR2*. Haplotípos.

ISHIBASHI, C. M. **Genetic polymorphisms of the transforming growth factor B1 and TGFBR2 receptor in pediatric patients with Wilms tumor.** 2017. 73 p. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Renal tumors comprise 6% of all pediatric neoplasms, and of these, 95% are embryonic type, called Wilms' Tumor (WT). The microenvironment is critical in cancer pathogenesis through the interaction between neoplastic cells, stroma and the immune system. Transforming Growth Factor B1 (TGFB1) is a pleiotropic cytokine which, through binding to a transmembrane serine / threonine kinase receptor complex (TGFBRI and TGFBR2) acts in a dual role in the neoplastic context as a tumor growth inhibitor in early stages and promoter of growth in advanced stages of carcinogenesis. Many genetic polymorphisms of *TGFB1* and its *TGFBR2* receptor have been reported in association with diseases development, including cancer. In this context, the present study aimed to evaluate the influence of *TGFB1* rs1800468, rs1800469, rs1800470 and rs1800471 polymorphisms and their haplotype structures and *TGFBR2* rs3087465 polymorphism on the susceptibility and prognosis of the disease. Initially, four *TGFB1* polymorphisms were investigated in relation susceptibility and prognosis of TW. The study included 35 tumor tissue samples from WT patients and 170 samples of peripheral blood or oral cell from neoplasia-free children that were genotyped by PCR-RFLP followed by analysis on polyacrylamide gel electrophoresis stained with silver. Were found association of the T allele of rs1800469 polymorphism (OR= 8.417; 95% IC= 3.177 to 22.297; $p < 0.001$) and of the C allele of rs1800470 polymorphism (OR= 3.000; 95% IC= 1.296 to 6.944; $p < 0.01$) of TGFB1, both in the recessive model, for tumor development risk. No correlation was observed regarding the polymorphisms and clinical parameters of the patients (tumor size, capsular invasion, lymph node involvement and metastasis). In addition, a significant association of the GCTG haplotype structure was observed with a risk reduction of developing WT (OR = 0.2361, 95% CI = 0.105 to 0.534, $p < 0.001$) and GTTG, which was associated with risk (OR = 12.00, 95% CI = 4.202 to 34.270, $p < 0.001$). Subsequently, the *TGFBR2* rs3087465 polymorphism was investigated. This study consisted of 35 tumor tissue samples from WT patients and 123 peripheral blood samples from control subjects. No association was observed between polymorphism and WT susceptibility, however, in relation to the clinical-pathological characteristics of patients a negative correlation of the polymorphism for capsular invasion ($\tau = -0.430$; $p = 0.029$) and lymph node involvement ($\tau = -0.449$, $p = 0.022$). Thus, although additional studies are needed to clarify the role of TGFB1 and TGFBR2 in WT, the present work is the first to demonstrate that allelic variants of these genes may represent a marker of susceptibility and prognosis to WT.

Key words: Wilms tumor. Polymorphisms. *TGFB1*. *TGFBR2*. Haplotype.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Perfil eletroforético do polimorfismo rs3087465 da região promotora de <i>TGFBR2</i>.	30
Figura 2 –	Perfil eletroforético dos polimorfismos rs1800468 e rs18004689 da região promotora de <i>TGFB1</i>.	32
Figura 3 –	Perfil eletroforético dos polimorfismos rs1800470 e rs1800471 da região do peptídeo sinal de <i>TGFB1</i>.	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Sistemas de Estadiamento para Tumores renais	17
Tabela 2 –	Concentrações de reagentes utilizados na PCR para o polimorfismo genético rs3087465 de <i>TGFBR2</i>	29
Tabela 3 –	Condições de ciclagem para a amplificação da região promotora de <i>TGFBR2</i>	29
Tabela 4 –	Concentrações de reagentes utilizados na PCR para os polimorfismos genéticos da região promotora e do peptídeo sinal de <i>TGFB1</i>	31
Tabela 5 –	Condições de ciclagem para a amplificação da região promotora e do peptídeo sinal de <i>TGFB1</i>	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Por cento
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
16q	Braço longo do cromossomo 16
A	Base púrica Adenina
Aa	Aminoácido
AgNO ₃	Nitrato de prata
Akt	Proteína kinase B (PKB) (“ <i>Ak</i> ” <i>thymoma protein</i>)
Arg	Aminoácido Arginina
BMP	Proteína Morfogenética Óssea (<i>Bone Morphogenetic Protein</i>)
C	Base pirimídica Citosina
CDK	Ciclina dependente de quinase (<i>Cyclin-dependant kinase</i>)
COG	Grupo de Oncologia Infantil (<i>Children’s Oncology Group</i>)
CTNNB1	Beta 1 catenina (Proteína associada a caderina) (<i>Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1</i>)
CREB	Proteína de ligação ao Elemento de Resposta a Monofosfato de Adenosina (<i>Cyclic Adenosine Monophosphate Response Element Binding protein</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EMT	Transição epitélio-mesenquimal (<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>)
EROs	Espécies Reativas de oxigênio
Erk	Quinase regulada por sinal extracelular (<i>Extracellular signal-regulated MAP kinase</i>)
<i>Fwd</i>	Primer <i>Forward</i>
G	Base púrica Guanina
GDF	Fator de crescimento e diferenciação (<i>Growth Differentiation Factor</i>)
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado da Glia (<i>Glial Derived Neurotrophic Factor</i>)
HER2	Fator de crescimento epidérmico humano Receptor 2 (<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>)
I-SMAD	SMAD inibitório (<i>Inhibitor SMAD</i>)

IARC	Agência Internacional para a Pesquisa em Câncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IC	Intervalo de confiança
IFN- γ	Interferon gama
IKK	I κ B quinase (<i>ikB kinase</i>)
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
JNK	c-Jun amino terminal quinase (<i>c-jun amino terminal kinase</i>)
LAP	Peptídeo associado à latência (<i>Latency-associated peptide</i>)
Leu	Aminoácido leucina
M2	Macrófago tipo II
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
MH1	Domínio de homologia MAD 1 (<i>Mad Homology Domain 1</i>)
MH2	Domínio de homologia MAD 2 (<i>Mad Homology Domain 2</i>)
Min	Minutos
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro (<i>Messenger RNA</i>)
ng	Nanogramas
NK	Célula exterminadora natural (<i>natural killer</i>)
nm	Nanômetro
NWTSG	Grupo Nacional de estudo do Tumor de Wilms (<i>National Wilms's Tumor Study Group</i>)
OMS	Organização Mundial da Saude
OR	Razão de Chance (<i>Odds Ratio</i>)
pb	Par de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase (<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>)
Pro	Aminoácido Prolina
Rev	Primer Reverse
RFLP	Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
s	segundos

SIM	Sistema de Informação Sobre Mortalidade
SIOP	Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica (<i>International Society of Pediatric Oncology</i>)
SMURF	Fatores reguladores de ubiquitinação de Smads (<i>International Society of Pediatric Oncology</i>)
T	Base pirimídica Timina
TAK1	Fator de crescimento transformante-b ativado por quinase 1 (<i>Transforming growth factor b-activated kinase 1</i>)
TGFBRI, II, III	Receptor de TFGB I, II e III (<i>TGFB Receptor I, II and III</i>)
TGFB	Fator de crescimento transformador beta (<i>Transforming Growth Factor beta</i>)
TP53	Proteína tumoral P53 (<i>Tumor protein P53</i>)
TW	Tumor de Wilms
Treg	Célula T regulatória
U	Unidade
VEGFA	Fator de crescimento endotelial vascular A (<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>)
WT1	Tumor de Wilms 1 (<i>Wilms' tumor 1</i>)
WT2	Tumor de Wilms 2 (<i>Wilms' tumor 2</i>)
WTX	Gene Tumor de Wilms associado ao cromossomo X (<i>Wilms tumor gene on the X chromosome</i>)
YY1	<i>Yin Yang 1</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.2	TUMOR DE WILMS.....	15
1.3	FATORES DE CRESCIMENTO TRANSFORMADORES B (TGFB).....	19
1.3.1	TGFB e Câncer	21
1.3.2	Polimorfismos na Região Promotora de <i>TGFBR2</i> e na Região Promotora e do Peptídeo Sinal de <i>TGFB1</i>	23
2	OBJETIVOS	26
2.1	OBJETIVO GERAL	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1	COLETA DAS AMOSTRAS	27
3.2	EXTRAÇÃO DE DNA	27
3.3	GENOTIPAGEM POR PCR-RFLP	28
3.3.1	1PCR-RFLP para o polimorfismo rs3087465 de <i>TGFBR2</i>.....	28
3.3.2	PCR-RFLP para os polimorfismos rs1800468, rs1800469, rs1800470 e rs1800471 de <i>TGFB1</i>	30
3.4	SEQUENCIAMENTO	33
3.5	INFERÊNCIA DE HAPLÓTIPOS	33
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4	PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	35
4.1	ARTIGO 1 - <i>TGFB1</i> signal peptide and promoter region genetic polymorphisms and haplotype structures: possible role as a susceptibility marker for Wilms Tumor	35
4.2	ARTIGO 2 - TGFB RECEPTOR II rs3087465 GENETIC POLYMORPHISM: POSSIBLE ROLE AS A PROGNOSTIC MARKER FOR WILMS TUMOR	53
5	CONCLUSÕES.....	62
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	63

REFERÊNCIAS	64
ANEXOS	71
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética	71
ANEXO B – Termo de Consentimento	72

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença heterogênea caracterizada pela proliferação descontrolada de células que, devido a uma série de eventos, perdem características de regulação tornando-se malignas (DAVIDOFF, 2010). Sua participação como grave problema de saúde pública é inegável: dados do International Agency for Research on Cancer (IARC) e da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam que, no ano de 2012, o câncer foi responsável por cerca de 8 milhões de óbitos no mundo, sendo que, no Brasil, a estimativa para o biênio 2016-2017 prevê a ocorrência de 600 mil novos casos da doença (INCA, 2015).

O câncer infantojuvenil é caracterizado por acometer indivíduos até 19 anos. Considerado raro, representa apenas 1% a 3% de todos os tumores malignos, contudo, é a principal causa de mortes em decorrência de doenças nessa faixa etária. De acordo com o Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) foram registrados 2.835 óbitos no Brasil em 2013, sendo que ainda são estimados cerca de 12.600 novos casos da doença para os anos de 2016-2017 (INCA, 2015).

A etiologia do câncer é complexa e envolve o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em uma célula normal, que adquire fenótipo maligno comportando-se de maneira patológica, proliferando-se indefinidamente. Apesar dos fatores de risco envolvidos na transformação da célula incluir tanto fatores intrínsecos como extrínsecos, quando se fala em câncer infantil consideram-se as alterações genéticas inatas os principais fatores de risco dada a baixa idade ao diagnóstico e consequente baixa exposição a fatores ambientais (DAVIDOFF, 2012).

Os tipos de câncer que se desenvolvem em crianças e adolescentes diferem daqueles que se desenvolvem em adultos, sendo que alguns deles são raros em indivíduos mais velhos. Algumas dessas neoplasias originam-se de células embrionárias e estão associadas às alterações durante o desenvolvimento embrionário normal do órgão acometido, sendo denominados tumores embrionários (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). Esses tumores são mais comuns em crianças até 5 anos e considera-se que os principais fatores envolvidos no seu desenvolvimento são a exposição neonatal, fatores pré-natais e fatores genéticos inatos, dentro dos quais se enquadram a participação de variantes polimórficas em genes importantes para a embriogênese (MONTALVAO-DE-AZEVEDO *et al.*, 2015).

Além da etiologia, os tumores pediátricos apresentam particularidades em relação aos tipos de câncer que acometem indivíduos adultos, se diferenciando quanto aos

locais primários, à origem histológica e ao desenvolvimento clínico, tendendo a ser mais agressivos, com curtos períodos de latência e alta taxa de proliferação e invasão (MALKIN, 1997).

Apesar de considerados mais agressivos, os tumores pediátricos são geralmente mais sensíveis às modalidades convencionais de tratamento (MALKIN, 1997). No entanto, uma vez que este visa células com alta taxa de proliferação e os tumores em questão afetam tecidos ainda em desenvolvimento, existe uma grande preocupação com o prejuízo no desenvolvimento do órgão imaturo (DUFFNER, COHEN e PARKER, 1988). Além disso, estudos já relataram a associação da exposição ao tratamento de radioterapia em crianças e o risco de desenvolvimento de novas neoplasias e doenças cardíacas na idade adulta (WONG *et al.*, 2016).

Tendo em vista as diferenças apresentadas e levando em consideração o risco ao qual a criança está exposta, faz-se necessário o estudo diferenciado desse conjunto de neoplasias visando o melhor entendimento dos mecanismos que o medeiam, possibilitando assim, o desenvolvimento de novas terapias direcionadas a diminuição do impacto do tratamento à criança.

1.2 TUMOR DE WILMS

Tumores renais na infância são raros, correspondendo a cerca de 6% de todas as neoplasias nessa faixa etária. Destes, 95% possuem origem embrionária denominados de Nefroblastomas ou Tumor de Wilms (TW) e acometem 1:10.000 crianças (ROYER-POKORA, 2013), sendo igualmente distribuído entre os sexos (DAVIDOFF, 2012; PROVENZI *et al.*, 2014). No Brasil, o TW tem incidência de 10 casos por milhão em crianças com idade inferior a 14 anos, com alta prevalência na faixa dos 1 aos 4 anos (DE CAMARGO *et al.*, 2011).

Tipicamente o tumor apresenta-se como uma massa abdominal de tamanho variável na região dos rins, palpável ao exame físico e observado através de exames de imagem. Apesar de assintomático na maioria dos casos, cerca de um terço dos pacientes apresentam dor abdominal, anorexia, vômito ou mal-estar. A presença de metástase ao diagnóstico é rara e acontece em 12% dos casos, nos quais os pulmões e o fígado são os principais sítios metastáticos (DAVIDOFF, 2012). Além disso, a forma unilateral e

esporádica da doença é a mais frequente, sendo que apenas 5-10% dos casos possuem envolvimento bilateral e 1% é considerado hereditário (BRESLOW *et al.*, 2006).

O envolvimento de fatores genéticos inatos em associação com o TW tem sido amplamente investigado. O primeiro relato de anormalidades citogenéticas foi em pacientes com anomalias genitourinárias, TW, aniridia e retardo mental (síndrome de WARG), os quais apresentavam alterações no cromossomo 11, no gene *Wilms'tumor 1 (WT1)* (CALL *et al.*, 1990). Esse gene codifica um fator de transcrição que pode agir como supressor tumoral, no entanto, apenas cerca de 5% dos pacientes com TW esporádico apresentam tal alteração (SUGIYAMA, 2010). Além da síndrome de WARG, outras síndromes foram relacionadas com alterações em *WT1*, dentre elas as síndromes de Denys-Drash e Fraser, ambas com alterações genitourinárias (DOME e COPPES, 2002). Outras alterações gênicas encontradas ainda incluem os genes *Wilms'tumor 2 (WT2)*, no braço longo do cromossomo 16 (16q), *Tumor protein P53 (TP53)* (DAVIDOFF, 2012), *Wilms tumor gene on the X chromosome (WTX)* e *Catenin (Cadherin-Associated Protein) Beta 1 (CTNNB1)* (RUTESHOUSER, ROBINSON e HUFF, 2008).

Os critérios de estadiamento para o TW são baseados na extensão anatômica do tumor, enquanto a terapia é baseada no estágio da doença e no grau histológico (KALAPURAKAL *et al.*, 2004). Atualmente, dois sistemas de estadiamento são utilizados: um quando não usada quimioterapia pré-operatória desenvolvido pelo *National Wilms's Tumor Study Group (NWTSG)/ Children's Oncology Group (COG)* e um pós-quimioterápico desenvolvido pelo *International Society of Pediatric Oncology (SIOP)* (Tabela 1).

Tabela 1- Sistemas de Estadiamento para Tumores renais

Estágio	NWTSG (pré-quimioterápico)	SIOP (Pós-quimioterápico)
I	(a) Tumor confinado ao rim e completamente ressecado (b) Ausência de ruptura anterior ou durante o procedimento cirúrgico (c) Vasos do seio renal envolvidos além de 2 mm (d) Sem tumor residual aparente além das margens de excisão	(a) Tumor limitado ao rim ou revestido com pseudocápsula fibrosa se for a dos contornos normais do rim, esta pode estar infiltrada com o tumor contanto que não atinja a superfície (b) Tumor pode ter protrusão para o sistema pélvico e 'imersão' no ureter (sem infiltração em suas paredes) (c) Veias do seio renal não envolvidas (d) Envolvimento do vaso intrarrenal pode estar presente
II	(a) Tumor se estende além do rim, mas completamente ressecado (b) Sem tumor residual aparente nas margens da excisão (c) Trombo tumoral em vasos fora do rim é o estágio II se o trombo é removido com o tumor <i>Embora a biópsia tumoral ou o derrame local confinado ao flanco fossem considerados no estágio II pelo NWTSG no passado, tais eventos serão considerados a fase III nos próximos estudos COG.</i>	(a) Tumor se estende além do rim ou penetra a cápsula renal e/ou pseudocápsula na gordura peri-renal, mas é completamente ressecado (b) Tumor infiltra seio renal e/ou invade o sangue e vasos linfáticos fora do parênquima renal, mas é completamente ressecado (c) Tumor infiltra órgãos adjacentes ou veia cava, mas é completamente ressecado.
III	Tumor residual confinado ao abdome: (a) Linfonodos no hilo renal, cadeias periaórticas, ou além, apresentam tumor (b) Contaminação peritoneal difusa pelo tumor (c) Tumor encontrado nas superfícies peritoneais (d) Tumor estende-se além das margens cirúrgicas quer microscopicamente ou grosseiramente (e) Tumor não completamente ressecado devido infiltração local em estruturas vitais	(a) Excisão incompleta do tumor, que se estende para além das margens de ressecção (b) Envolvimento de linfonodos abdominais (c) Ruptura do tumor antes ou durante a cirurgia (independente de outros critérios de estadiamento) (d) Tumor penetrou através da superfície peritoneal (e) Trombos tumorais presentes nas margens de ressecção de vasos ou ureter, transpostos ou removidos fragmentadamente pelo cirurgião (f) Realização de biópsia pré-quimioterápica/pré-cirúrgica <i>Envolvimento de linfonodos regionais foi considerado estágio II no sistema de estadiamento SIOP anterior.</i>
IV	Presença de metástase hematogênica ou para linfonodos distantes	Presença de metástase hematogênica (pulmão, fígado, osso, cérebro, etc.) ou metástases linfonodais fora da região abdomino-pélvica
V	Envolvimento renal bilateral ao diagnóstico	Tumor renal bilateral ao diagnóstico

Adaptado de METZGER e DOME (2005)

As características histológicas são os principais indicadores levados em consideração para a determinação do prognóstico do paciente, a partir das quais os tumores

são divididos em histologicamente favorável ou desfavorável (BECKWITH e PALMER, 1978). Os tumores com histologia favorável são os mais frequentes e compreendem aqueles sem a presença de anaplasia ou com anaplasia focal, caracterizada pela presença de células anaplásicas em menos de 10% dos campos analisados. Já os tumores de histologia desfavorável apresentam anaplasia do tipo difusa (GREEN *et al.*, 1994) e acometem principalmente crianças com idade superior a 4 anos, apresentando um menor índice de cura e maior risco de recaídas, assim como os tumores blastemais quando em tratamento com quimioterapia pré-operatória (MATURU, 2016).

O tumor costuma responder bem à quimioterapia e a maioria dos casos é tratada com a combinação de cirurgia e quimioterapia, sendo a radioterapia utilizada para os casos de doenças em estágios mais avançados. Com os protocolos atuais de tratamento, o índice de sobrevivência para os pacientes com TW tornou-se superior a 85%, no entanto, cerca de 25% responde mal ao tratamento ou apresenta recaídas e metade destes vem a óbito apesar do tratamento intensivo (KALAPURAKAL *et al.*, 2004; METZGER e DOME, 2005; DOME *et al.*, 2006). Dessa forma, o aumento do conhecimento quanto a biologia do tumor assim como a busca por marcadores que auxiliem uma melhor estratificação e desenvolvimento de terapias mais refinadas e específicas são fundamentais (CONE *et al.*, 2016; MATURU, 2016).

Classicamente, o TW é caracterizado pela consistência trifásica, o qual inclui elementos blastemais, epiteliais e estromais em diferentes graus de diferenciação e distribuição, não sendo necessária a presença dos três componentes para o diagnóstico (RIVERA e HABER, 2005). A presença de células musculares lisas ou esqueléticas, tecido adiposo e outras diferenciações providas do estroma neoplásico também podem ocorrer, principalmente em tumores submetidos a quimioterapia pré-operatória (POPOV, SEBIRE e VUJANIC, 2016).

Sabe-se que os tumores embrionários estão associados a alterações durante o desenvolvimento embrionário normal do órgão. O rim metanéfrico desenvolve-se a partir do mesoderma intermediário, que dá origem a células epiteliais, mesenquimais e do estroma, as quais dão origem ao rim. A embriogênese renal é um processo complexo e minucioso que consiste na interação recíproca de dois tecidos embrionários precursores, o epitelial do botão uretérico e o mesênquima metanéfrico (SAXEN e SARIOLA, 1987). Defeitos em etapas da nefrogênese, como alterações na indução da transição mesenquima-epitelial durante a formação dos néfrons podem levar a restos nefrogênicos (SCHEDL, 2007), os quais consistem em células indiferenciadas, blastemais, com diferentes graus de diferenciação no

rim maduro. Apesar de raramente serem encontrados em rins normais, os restos nefrogênicos são considerados precursores do TW (RIVERA e HABER, 2005).

Todo o processo de nefrogênese é finamente coordenado por diversos fatores de transcrição, proto-oncogenes e supressores tumorais, fatores de crescimento, citocinas e seus respectivos receptores (HORSTE, BRAUN e HUBER, 1999; GRONE *et al.*, 2002; QUAGGIN e KREIDBERG, 2008) como os fatores da família dos fatores de crescimento transformadores beta (TGFB) (BUSH *et al.*, 2004; SIMS-LUCAS *et al.*, 2010), os quais também apresentam papel crucial no contexto do câncer (BIERIE e MOSES, 2006; KUBICZKOVA *et al.*, 2012).

1.3 FATORES DE CRESCIMENTO TRANSFORMADORES B (TGFB)

O TGFB desempenha papéis cruciais no desenvolvimento embrionário, diferenciação de células e tecidos, homeostasia e também em muitos estados patológicos. Fazem parte dessa superfamília as proteínas da família activina/inibina, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fatores de diferenciação de crescimento (GDF), o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e a subfamília TGFB (KUBICZKOVA *et al.*, 2012).

Os fatores da subfamília TGFB são proteínas diméricas estruturalmente e evolutivamente conservadas (ZHANG *et al.*, 2006). Em mamíferos, são conhecidas três isoformas de TGFB (TGFB1, TGFB2 e TGFB3), codificadas por 3 genes distintos (MOSES, ROBERTS e DERYNCK *et al.*, 2016), e cuja funções são dadas a partir da ligação com os mesmos receptores e via de sinalização (CHEIFETZ *et al.*, 1987; CHANG, BROWN e MATZUK, 2002). Apesar da homologia entre as sequências, análises da função *in vivo* das três isoformas revelaram diferentes padrões de expressão tempo-espacial, mostrando a não redundância funcional (CHANG, BROWN e MATZUK, 2002; VAIDYA e KALE, 2015). No humano adulto, o TGFB1 é a forma mais abundante, sendo sintetizada por praticamente todas as células do organismo em diferentes concentrações (KAJDANIUK *et al.*, 2013).

Inicialmente o TGFB é sintetizado na forma de um monômero pré-pró-TGF, um precursor imaturo composto por uma região de N-terminal de 29 aminoácidos (aa) correspondente a sequência do peptídeo sinal, uma pró-região de 249 aa denominada *Latency-associated peptide* (LAP) e uma sequência C-terminal de 112 aa correspondente ao TGF ativo. Após uma série de processamentos com proteases, mudanças de conformação e dimerização, o TGF é transportado em sua forma latente para a matriz extracelular, onde

interage com as proteínas que a compõe (KUBICZKOVA *et al.*, 2012; PONIATOWSKI *et al.*, 2015). A ativação do TGF β se dá por meio da interação com enzimas específicas, como a plasmina (PIEK, HELDIN e TEN DIJKE, 1999), com a alteração do pH para níveis mais baixos (LYONS, KESKI-OJA e MOSES, 1988) ou mesmo pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (BARCELLOS-HOFF *et al.*, 1994).

Para exercer suas funções, o TGF β ativo deve se ligar em um complexo de receptores transmembrana com atividade serina/treonina quinase: o receptor de TGF β do tipo I (TGF β RI) e o receptor de TGF β do tipo II (TGF β RII). Há além desses um terceiro receptor sem atividade enzimática, o TGF β RIII ou betaglicana, cuja função é realizar a captura do TGF β , mantendo-o próximo à membrana plasmática e, assim, facilitar a ligação ao TGF β RII (TEN DIJKE e HILL, 2004).

Os dímeros ativos de TGF β ligam-se aos domínios extracelulares de TGF β RII levando ao recrutamento de TGF β RI e fosforilação de seu sítio de regulação Glicina/Serina (domínio GS) pelo receptor II, gerando propagação da sinalização intracelular por via canônica, dependente de SMAD, ou não-canônica, independente de SMAD (BLOBE, SCHIEMANN e LODISH, 2000; MASSAGUE e GOMIS, 2006).

Na via canônica, a fosforilação de TGF β RI leva a ativação de sua propriedade serina/treonina quinase e fosforilação das proteínas sinalizadoras SMAD dependentes de receptor (R-SMADS), SMAD2 e/ou SMAD3, as quais formam um complexo com SMAD4 e são transportadas para o núcleo, onde ligam-se a regiões específicas do genoma através do domínio *Mad Homology Domain 1* (MH1) e com fatores de transcrição através do domínio *Mad Homology Domain 2* (MH2), induzindo ou reprimindo a transcrição de genes dependentes de TGF β (KUBICZKOVA *et al.*, 2012). Diversos genes são regulados em diferentes células pela associação das SMADs com diferentes proteínas (MASSAGUE, 2000). Tal via está ligada a efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos em células epiteliais e hematopoiéticas, ou seja, efeitos antitumorais como a diminuição da expressão de ciclinas e aumento da expressão de inibidores dos complexos ciclinas/quinases dependentes de ciclina (CDK), importantes proteínas reguladoras do ciclo celular (SIEGEL e MASSAGUE, 2003; SCHMIERER e HILL, 2007; PARVANI, TAYLOR e SCHIEMANN, 2011).

Já a via não-canônica, independente de SMADs, emprega outros transdutores de sinal que induzem vias como a da *extracellular signal-regulated MAP kinase* (Erks), *c-jun amino terminal kinase* (JNK), *p38 mitogen-activated protein kinase* (MAPK), *ikB kinase* (IKK), *phosphatidylinositol-3 kinase* (PI3K), “*Ak*” *thymoma protein* (AKT) e a família das Rho GTPases (ZHANG, 2009). Ao contrário da via canônica, a via não-canônica

parece ter como principais funções a indução da proliferação e transição epitélio-mesenquimal (EMT), (MU, GUDEY e LONDSTROM, 2012; ZHANG, 2016), agindo de maneira pró-tumoral.

A regulação da sinalização de TGFB é bastante fina e é realizada por 2 grupos de proteínas principais: as proteínas SMADs inibitórias (I-SMADs), as quais incluem os SMADS 6 e 7; e as ubiquitina-ligases da família *ubiquitination-related factor* (SMURFs), que podem atuar em conjunto com SMAD 7. Além disso, a ativação da via não-canônica tende a bloquear a via canônica pela fosforilação de proteínas SMADs por proteínas da via da MAPK, CDK e outras proteínas quinases (MASSAGUE, SEOANE e WOTTON, 2005). Alterações em qualquer componente da via de sinalização de TGFB pode levar a desequilíbrios na dinâmica dessa citocina e conseqüente desenvolvimento de doenças, como o câncer (LEVY e HILL, 2006).

1.3.1 TGFB e Câncer

O entendimento da patogênese do câncer não depende apenas do conhecimento das características das células neoplásicas, mas da compreensão da relação destas com o estroma que o circunda, incluindo células do sistema imune inato e adaptativo assim como moléculas que fazem parte desse microambiente, que podem promover ou dificultar a progressão tumoral (CHEN *et al.*, 2015).

Uma das características apresentadas pela célula neoplásica é sua alta capacidade de evasão do sistema imunológico, sendo um desses mecanismos a não expressão de proteínas mutadas. No entanto, o sistema imunológico apresenta uma resposta anti-tumoral, principalmente após a produção de alguns fatores e antígenos tumorais pelas células neoplásicas, como formas anormais da proteína p53 ou superexpressão de proteínas específicas como o Fator de Crescimento Epidermóide Humano Receptor 2 (HER2) em alguns subtipos de câncer de mama (DUNN, OLD e SCHREIBER, 2004) os quais atuam como sinais de alarme para o sistema imune, estimulando as células a conterem o desenvolvimento tumoral (SELLERI *et al.*, 2007).

A resposta inflamatória gerada segue com o recrutamento de células imunitárias e indução da produção de mediadores inflamatórios como quimiocinas e citocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e várias outras moléculas que atuam de maneira autócrina ou parácrina (GRIVENNIKOV, GRETEN e KARIN, 2010). Existe, no entanto, um delicado equilíbrio entre a atividade antitumoral e a atividade imunitária promotora do tumor,

uma vez que em muitos casos o microambiente gerado torna propícia a sobrevivência das células malignas.

Dentre as moléculas presentes no microambiente tumoral, o TGFB1 destaca-se devido seu papel dual no câncer. Em células normais e pré-malignas, o TGFB1 age como um supressor tumoral por meio de seu efeito anti-proliferativo e pró-apoptótico, atuando em mecanismos tais como na regulação do ciclo celular através da diminuição de ciclinas e dos complexos ciclina/CDKs. No entanto, em células malignas atua aumentando o potencial pró-metastático (SIEGEL e MASSAGUE, 2003).

No microambiente tumoral o TGFB1 pode ser secretado tanto pelas próprias células neoplásicas de origem epitelial quanto pelas células do infiltrado inflamatório, como macrófagos do fenótipo tipo II (M2), células T regulatórias (Tregs) e células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MAO *et al.*, 2013).

Nas células do sistema imunológico o TGFB1 atua como importante supressor da resposta imunológica. Ele diminui a produção de interferon gama (IFN- γ) e receptores nas células *natural killer* (NK), reduzindo a efetividade de sua resposta; diminui a migração, maturação e secreção de moléculas efetoras, diminui a função citolítica de células T CD8⁺ através da supressão de genes que codificam granzima A, granzima B, FasL e INF- γ , além de induzir sua apoptose e de células dendríticas, e também estimula a diferenciação e manutenção de células Treg, dessa forma, induzindo ainda mais a tolerância imunológica e impedindo a ativação da imunidade antitumoral (FLAVELL *et al.*, 2010).

Além disso, a sinalização do TGFB1 em macrófagos induz a polarização para o fenótipo do tipo II, o qual possui ação anti-inflamatória ou pró-regenerativa, diminuindo a resposta imune através da secreção de TGFB1 e interleucina 10 (IL-10), promovendo a remodelação da matriz extracelular (SICA *et al.*, 2008). Tal efeito é ainda reforçado pela atuação do TGFB1 em fibroblastos (RONNOV-JESSEN e PETERSEN, 1993) e sua capacidade de induzir EMT, processo pelo qual a célula altera seu fenótipo epitelial para mesenquimal (PARDALI e MOUSTAKAS, 2007). Dessa forma, gera-se um comportamento semelhante a cicatrização tecidual, com indução da remodelação da matriz extracelular, aumento da motilidade celular e indução de angiogênese, os quais, em associação com a inibição da resposta imunológica, criam um ambiente propício para o aumento do potencial invasivo e metastático das células neoplásicas (CHANG *et al.*, 2005).

O aumento dos níveis de TGFB1 já foi relatado em diversas neoplasias (DUNNING *et al.*, 2003; JAVLE *et al.*, 2014; CHOI *et al.*, 2015), mas sua relação com fatores prognósticos em TW foi demonstrado apenas por Zhang *et al.* (2014), os quais

observaram através de ensaios de imunohistoquímica em 78 amostras tumorais de pacientes com TW e ensaio de transfecção transiente a associação do TGFB1 com invasão e metástase de TW. No entanto, tendo em vista que o TW é um tumor renal de origem embrionária, a participação do TGFB1 na nefrogênese e na função normal dos rins também deve ser considerada.

Sabe-se que o TGFB1 possui importante participação no desenvolvimento renal como um fator negativo do crescimento e ramificação de néfrons (BUSH, 2004), além de reprimir a expressão do gene *WT1*, o qual é essencial em todas as etapas da nefrogênese e, no rim maduro, na função normal dos podócitos. De forma similar, verificou-se que citocinas da família TGFB, como BMP-4 e TGFB1, são importantes na diferenciação de podócitos e na formação de capilares glomerulares através da indução do *Transforming growth factor b-activated kinase 1* (TAK1), um importante mediador de vias de sinalização independentes de SMAD, que atua como fator regulador negativo do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), controlando assim a vascularização glomerular (YAMAGUCHI *et al.*, 1995; KIM, 2014).

Além disso, uma pesquisa com pacientes TW com histologia anaplásica demonstrou que os genes envolvidos nas vias de sinalização de *TP53* e *TGFB* eram os mais afetados nessa histologia (LU *et al.*, 2015). Nesse contexto, a expressão anormal de TGFB em decorrência de alterações em qualquer componente da via de sinalização pode estar relacionado ao desenvolvimento ou prognóstico em tumores humanos.

Polimorfismos genéticos em determinados genes tem sido relatados e, como no TGFB1, dependendo da localização tais polimorfismos têm o potencial de alterar a dinâmica de expressão ou secreção da proteína (CAMBIEN, *et al.*, 1996). Assim, é razoável supor que estas alterações no DNA podem representar marcadores de susceptibilidade e / ou prognóstico para diversas neoplasias, incluindo o Tumor de Wilms.

1.3.2 Polimorfismos na Região Promotora de *TGFBR2* e na Região Promotora e do Peptídeo Sinal de *TGFB1*

O gene do TGFBR2, *TGFBR2*, localiza-se no *locus* gênico 3p24.1 e apresenta diversos polimorfismos genéticos descritos, dentre eles, o polimorfismo rs3087465 (G-875A, c.-1216A>G, g.4167A>G) o qual vem sendo amplamente estudado na patogênese de diversas neoplasias (HUANG, *et al.*, 2014).

Esse polimorfismo consiste na troca de uma guanina (G) por uma adenina (A) na posição -875 da região promotora de *TGFBR2* e foi primeiramente descrito por Seijo *et al.* (2001), o qual demonstrou através de ensaios de Luciferase uma maior atividade transcricional de *TGFBR2* em células epiteliais normais com o alelo A sem, no entanto, associar esse polimorfismo ao câncer. Em contrapartida, o mesmo alelo do polimorfismo em questão foi associado à redução do risco de câncer gástrico (XU *et al.*, 2011; GUO *et al.*, 2012) e esofágico (JIN *et al.*, 2008).

Já o gene de *TGFB1*, *TGFB1*, encontra-se localizado no *locus* 19q13.1 e apresenta diversos polimorfismos, muitos dos quais vem sendo relatados em associação com o câncer, dentre eles, dois polimorfismos na região promotora (rs1800468, G-800A, c.-1638G>A e rs1800469, C-509T e c.-1347T>C) e dois na região do peptídeo sinal (rs1800470, c.29C>T, Leu10Pro, T869C e rs1800471, c.74G>C, Arg25Pro).

O polimorfismo rs1800468 localiza-se em um provável sítio de ligação a família de fatores de transcrição CREB, e a troca de uma guanina (G) por uma adenina (A) no nucleotídeo 800 antes do sítio de início de transcrição parece reduzir a afinidade de ligação a esses fatores (GRAINGER, 1999). De forma contrária, o polimorfismo rs1800469 localiza-se em um sítio de ligação consenso do fator de transcrição Yin Yang 1 (YY1), sendo que estudos de transfecção demonstraram que a troca de uma citosina (C) por uma timina (T) no nucleotídeo 509 anterior ao sítio de início de transcrição de *TGFB1* leva a um aumento da afinidade para YY1 (SILVERMAN *et al.*, 2004). Tal resultado pode ser um dos mecanismos pelo qual a presença do polimorfismo rs1800469 leva ao aumento da concentração da citocina no plasma de maneira aditiva, demonstrado por Grainger *et al.* (1999).

Os estudos desses polimorfismos em câncer mostram-se contraditórios. Para o polimorfismo rs1800468, poucos estudos demonstraram relação do alelo A com o desenvolvimento de neoplasias, sendo que Parvizi *et al.* (2016) e Ramos-Flores *et al.* (2013) encontraram associação desse alelo com o risco a câncer de mama e câncer de colo de útero, respectivamente. Já para o polimorfismo rs1800469, apesar da maioria das pesquisas relatarem associação do alelo T com o risco de câncer (GUO *et al.*, 2011; PARVIZI *et al.*, 2016), Jin *et al.* (2008) encontraram associação deste alelo com proteção ao carcinoma epidermóide esofágico.

O polimorfismo rs1800470 ocorre com a troca de uma timina (T) por uma citosina (C) na posição 869 de *TGFB1*, o qual leva a substituição de um aminoácido leucina por uma prolina no aminoácido correspondente ao códon 10 do peptídeo sinal de *TGFB1* (Leu10Pro). Já o polimorfismo rs1800471 consiste na substituição de uma guanina (G) por

uma citosina (C) na posição 74 do mRNA, correspondente ao códon 25, levando a alteração de um aminoácido arginina por uma prolina também na região do peptídeo sinal (BERNDT *et al.*, 2007).

A região do peptídeo sinal é uma sequência de aminoácidos cuja função é o endereçamento da proteína sintetizada ao retículo endoplasmático ainda durante a tradução, onde este será removido por enzimas peptidases para que então a proteína madura seja secretada (EGEA, STROUD e WALTER, 2005). Alterações na sequência do peptídeo sinal podem resultar em mudanças no potencial de reconhecimento, endereçamento e clivagem, consequentemente alterando a dinâmica de secreção da proteína.

Susianti *et al.* (2014) demonstraram que a troca do aminoácido leucina por prolina altera a região do núcleo hidrofóbico do peptídeo sinal de TGFB1, rompendo a estrutura em alfa-hélice proporcionada pela leucina e alterando dessa forma a estabilidade da interação do peptídeo sinal com o complexo de reconhecimento no retículo. Como consequência, há alteração na hidrofobicidade do peptídeo sinal, o qual se liga com maior estabilidade ao complexo. Esse estudo fornece uma explicação para o resultado obtido por Dunning *et al.* (2003), os quais demonstraram através de um ensaio de transfecção em células HeLa que a variante polimórfica C (prolina) levava a um aumento de 2,8 vezes da secreção de TGFB1. Nesse mesmo estudo, os autores observaram uma associação do alelo C com a susceptibilidade ao câncer de mama.

Poucos estudos demonstraram a associação do polimorfismo rs1800471 com câncer, sendo que Pooja *et al.* (2013) verificou associação da variante alélica de rs1800470 e rs1800471 com susceptibilidade ao câncer de mama.

Estudos de haplótipos investigando em conjunto os 4 polimorfismos de *TGFB1* apresentados são ainda mais escassos e apenas Jin *et al.* (2004) realizou essa análise, não observando diferenças significativas entre pacientes com câncer de mama e controles.

Até o presente momento, apesar da importância de TGFB1 no contexto do câncer e do desenvolvimento renal embrionário, pouco se sabe sobre a influência dessa citocina no TW, não havendo qualquer relato sobre o impacto dos polimorfismos apresentados na patogênese da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a frequência e associação de polimorfismos genéticos de *TGFBI*, assim como suas estruturas haplotípicas, e um polimorfismo de *TGFBR2* na susceptibilidade e prognóstico de Tumor de Wilms em pacientes pediátricos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

ARTIGO 1

- Investigar a associação dos polimorfismos genéticos rs1800468, rs1800469, rs1800470 e rs1800471 de *TGFBI* com a susceptibilidade ao TW em um estudo do tipo caso-controle;
- Analisar a possível correlação desses polimorfismos com dados clínico-patológicos de pacientes com TW;
- Investigar a associação entre as estruturas haplotípicas compostas por esses polimorfismos de *TGFBI* (rs1800468, rs1800469, rs1800470 e rs1800471) na susceptibilidade ao TW.

ARTIGO 2

- Investigar a associação do polimorfismo genético rs3087465 de *TGFBR2* com a susceptibilidade ao TW em um estudo do tipo caso-controle;
- Avaliar a possível correlação do polimorfismo genético rs3087465 com dados clínico-patológicos de pacientes com TW.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA DAS AMOSTRAS

O presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil (CEP/UUEL 189/2013 – CAAE 17123113400005231) (ANEXO A). Um termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado pelos responsáveis das crianças doadoras para a participação no estudo e coleta do material biológico (ANEXO B). Com relação às amostras em blocos de parafina, foi concedida autorização do chefe do Departamento de Patologia Clínica, Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina.

Amostras de tecido tumoral incluídas em parafina, de 35 pacientes, foram selecionadas do Setor de Patologia do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina e do Laboratório de Anatomia Patológica e Citologia do Norte do Paraná (Micropar). O grupo controle foi constituído de amostras de sangue periférico ou células de mucosa bucal de 170 crianças livres de neoplasia, obtidas da Universidade Estadual de Londrina. A análise dos prontuários dos pacientes com TW também foi realizada quando possível.

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Estudos e Aplicações de Polimorfismos de DNA (LEAP-DNA), Universidade Estadual de Londrina.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA das amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina foi extraído utilizando-se o InnuPREP DNA Mini Kit (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante.

Já para o grupo controle livre de neoplasia, o DNA das amostras de sangue periférico foi obtido por meio do Kit de Extração Mini Spin DNA (Biometrix, Curitiba, PR, Brasil), segundo recomendações dos fabricantes e o DNA das amostras de células de mucosa bucal foi extraído utilizando-se um protocolo baseado no uso de acetato de amônio para eliminação de proteínas (AIDAR e LINE, 2007).

Todas as amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria no aparelho espectrofotômetro NanoDrop 2000® (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE,

EUA). A absorbância no comprimento de onda de 260 nm foi utilizada para determinar a concentração de ácidos nucleicos e o grau de pureza em relação à contaminação por proteínas foi avaliado pela razão entre as absorbâncias nos comprimentos de 260 nm e 280 nm.

3.3 GENOTIPAGEM POR PCR-RFLP

Aproximadamente 100 ng de DNA foram amplificados com *primers* específicos para os polimorfismos propostos, sintetizados de acordo com as sequências depositadas no *GenBank*. Os produtos da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram então clivados por enzimas específicas para cada polimorfismo. Para todas as reações efetuadas foi utilizado um controle positivo e um controle negativo (ausência de DNA) a fim de assegurar a não contaminação dos produtos de PCR.

Para a análise dos genótipos, os produtos das ampliações e produtos de clivagem foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% corados com nitrato de prata (AgNO₃).

Para garantir a especificidade da técnica, duas amostras de produtos de amplificação dos polimorfismos da região promotora e do peptídeo sinal foram sequenciadas.

3.3.1 PCR-RFLP para o polimorfismo rs3087465 de *TGFBR2*

Para a análise do polimorfismo rs3087465 de *TGFBR2* foram utilizados os seguintes *primers*: 5'-GGAATGTCTTGGGCAAATCT-3' (*Forward*) e 5'-ACCTGAATGCTTGTGCTTTTATT-3' (*Reverse*). Todos os reagentes utilizados na PCR (*buffer*, MgSO₄, dNTP, iniciadores e *Taq* DNA polimerase *High Fidelity*) foram adquiridos da Invitrogen® (Carlsbad, CA, EUA). As concentrações de reagentes utilizadas e as condições de ciclagem da PCR encontram-se nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2- Concentrações de reagentes utilizados na PCR para o polimorfismo genético rs3087465 de *TGFBR2*

Reagentes (concentração)	Concentração final	Volume (μL)
<i>Buffer High Fidelity</i> (10X)	1X	2,50
MgSO ₄ (50 mM)	1,5 mM	0,75
dNTP (1,25 mM)	0,1 mM	2,00
<i>Primer Fwd</i> (2,5 μM)	0,15 μM	1,50
<i>Primer Rev</i> (2,5 μM)	0,15 μM	1,50
<i>Taq Platinum DNA polimerase</i>	1U	0,20
<i>High Fidelity</i> (5U/ μL)		
Água ultrapura	-	15,55
Amostra	~100 ng	~1,00
Total	-	25,0

Tabela 3- Condições de ciclagem para a amplificação da região promotora de *TGFBR2*

Etapas	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Etapa 1	95°C	5 min	1
	94°C	45 s	
Etapa 2	59°C	45 s	34
	72°C	45 s	
Etapa 3	72°C	10 min	1

A PCR resultou em um produto de 152 pares de base (pb) que foi então clivado pela enzima de restrição *HpyCH4III* (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, EUA). Para tal, utilizou-se 1U da enzima para clivar 7 μL do produto de PCR em no mínimo 2 horas de incubação a 37°C, seguindo as recomendações do fabricante.

A região promotora de *TGFBR2* em questão possui um sítio de restrição reconhecido pela enzima *HpyCH4III*, que cliva o produto em 2 fragmentos de 93 pb e 59 pb quando na presença do alelo A. Quando não há a troca de uma G por uma A o sítio de restrição deixa de existir e a enzima não é capaz de reconhecer e clivar, mantendo o tamanho original de 152 pb.

A sequência do fragmento amplificado assim como os sítios de restrição da enzima e os perfis de bandas apresentadas para cada genótipo após restrição enzimática são apresentados na Figura 1.

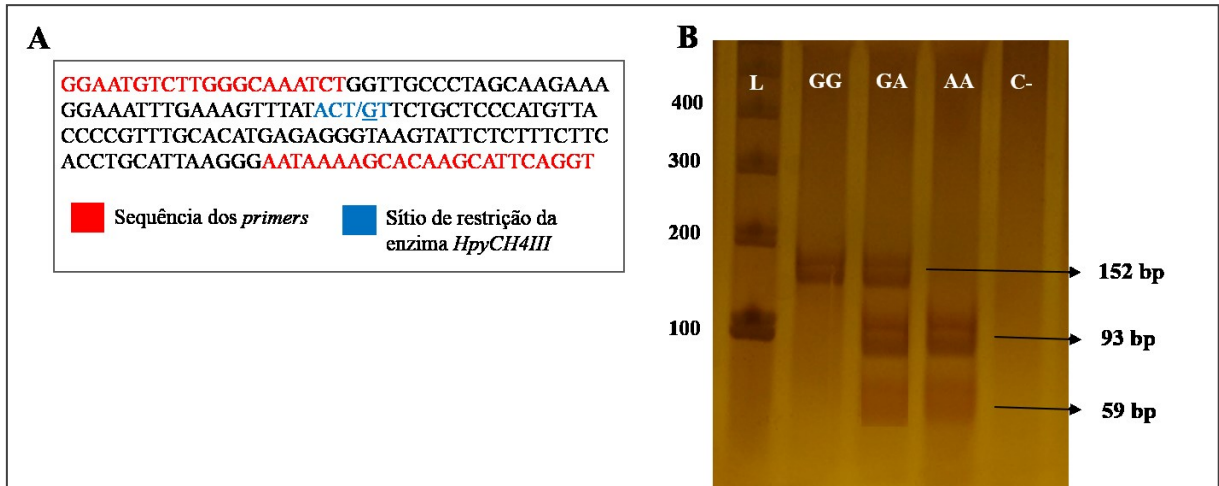


Figura 1 –Polimorfismo rs3087465 da região promotora de *TGFBR2*. A) Sequência do fragmento amplificado demonstrando em vermelho a sequência dos *primers* utilizados e em azul a região de clivagem para a enzima *HpyCH4III*. B) Perfil eletroforético do polimorfismo rs3087465. L: ladder 100 pb; C-: controle negativo

3.3.2 PCR-RFLP para os polimorfismos rs1800468, rs1800469, rs1800470 e rs1800471 de *TGFB1*

Para amplificação da região dos polimorfismos da região promotora (rs1800468 e rs1800469) utilizou-se as seguintes sequências de *primers*: 5'-GCAGTTGGCGAGAACAGTTG-3' (*Forward*) e 5'-CCAGAACGGAAGGAGAGTCAG-3' (*Reverse*). Já para a análise dos polimorfismos da região do peptídeo sinal os *primers* utilizados foram: 5'-TTCCCTCGAGGCCCTCCTA-3' (*Forward*) e 5'-GCCGCAGCTTGGACAGGATC-3' (*Reverse*). As mesmas concentrações de reagentes foram utilizadas para ambas as regiões amplificadas, as quais são apresentadas na Tabela 4. Já as condições de ciclagem para a região do promotor e a região do peptídeo sinal são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 4- Concentrações de reagentes utilizados na PCR para os polimorfismos genéticos da região promotora e do peptídeo sinal de *TGFBI*

Reagentes (concentração)	Concentração final	Volume (µL)
<i>Buffer High Fidelity</i> (10X)	1X	2,50
MgSO ₄ (50 mM)	1 mM	0,50
dNTP (1,25 mM)	0,1 mM	2,00
<i>Primer Fwd</i> (2,5 µM)	0,2 µM	2,00
<i>Primer Rev</i> (2,5 µM)	0,2 µM	2,00
<i>Taq Platinum DNA polimerase</i>	1U	0,20
<i>High Fidelity</i> (5U/µL)		
Água ultrapura	-	14,80
Amostra	~100 ng	~1,00
Total	-	25,0

Tabela 5- Condições de ciclagem para a amplificação da região promotora e do peptídeo sinal de *TGFBI*

Etapas	Região promotora		Peptídeo sinal		Número de ciclos
	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo	
Etapa 1	94° C	10 min	96°C	10 min	1
Etapa 2	94° C	45 s	96°C	75 s	35
	59° C	1 min	62°C	75 s	
	72° C	1 min 15 s	73°C	75 s	
Etapa 3	72° C	10 min	73°C	5 min	1

A reação de PCR para a região promotora gerou um produto de 597 pb, o qual foi submetido a restrição enzimática. Para o polimorfismo rs1800468 foi utilizado a enzima *HpyCH4IV* (New England Biolabs®) que possui um sítio de restrição que é perdido no alelo A. Assim, o genótipo GG gera dois fragmentos de 402 pb e 195 pb, enquanto o genótipo AA mantém o fragmento original de 597 pb. Já para o polimorfismo rs1800469 foi utilizado a enzima *Bsu36I* (New England Biolabs®) que reconhece o alelo C, clivando-o em dois fragmentos de 488 pb e 109 pb. Na presença da mutação o sítio de restrição é perdido e, assim, o fragmento se mantém conservado (597 pb).

As condições de clivagem para os polimorfismos da região promotora e peptídeo sinal foram as mesmas, utilizando 1U das enzimas apropriadas para clivar cerca de 4 µL do produto de PCR, o qual foi incubado a 37°C por no mínimo 2 horas.

Na Figura 2 é apresentado o fragmento amplificado da região promotora de *TGFBI* juntamente com os sítios de restrição das enzimas e os genótipos após restrição enzimática.

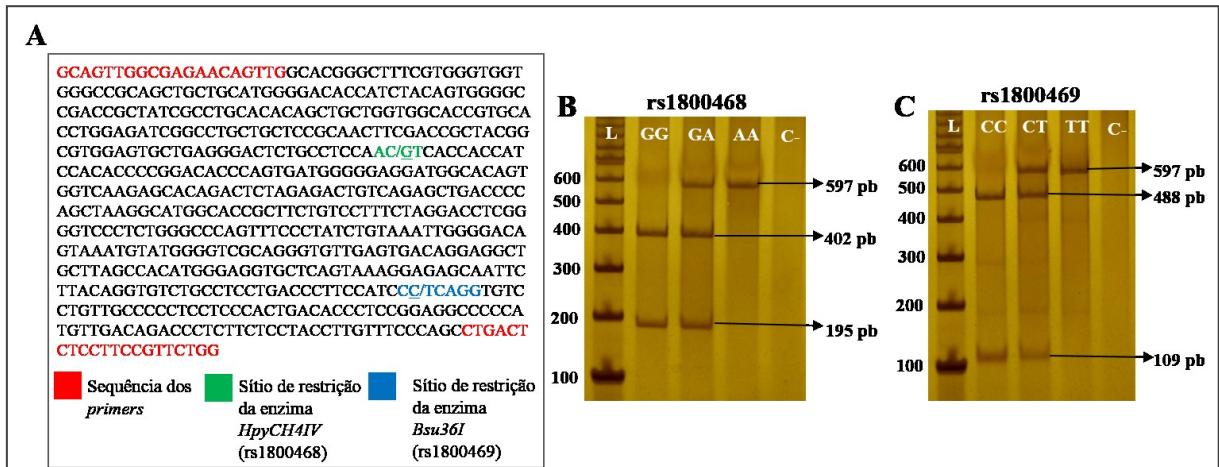


Figura 2 –Polimorfismos rs1800468 e rs1800469 da região promotora de *TGFBI*. A) Sequência do fragmento amplificado demonstrando em vermelho a sequência dos *primers* utilizados, em verde a região de clivagem para a enzima *HpyCH4IV* e em azul a região de clivagem para a enzima *Bsu36I*. B) Perfil eletroforético do polimorfismo rs1800468. C) Perfil eletroforético do polimorfismo rs1800469. L: ladder 100 pb; C-: controle negativo.

A PCR para a região do peptídeo sinal resultou em um produto de 294 pb. Para o polimorfismo rs1800470 utilizou-se a enzima *MspAI-I* (New England Biolabs®), a qual possui 4 sítios de restrição no fragmento amplificado quando na presença do alelo C, sendo 1 sítio eliminado no alelo T. Assim, o genótipo CC apresenta 5 fragmentos de 149 pb, 67 pb, 40 pb, 26 pb e 12 pb, enquanto o genótipo TT apresenta 4 fragmentos de 161 pb, 67 pb, 40 pb e 26 pb. Já para o polimorfismo rs1800471 utilizou-se a enzima *BgII* (New England Biolabs®) que possui 2 sítios de restrição no produto amplificado, sendo que na troca de G para C um dos sítios é perdido. Dessa forma, para o alelo G observa-se 3 fragmentos de 131 pb, 103 pb e 60 pb, enquanto que para o alelo C observa-se 2 fragmentos de 163 pb e 131 pb. Devido ao pequeno tamanho dos fragmentos, aqueles de tamanho inferior a 67 pb não puderam ser observados nos géis.

O fragmento amplificado da região do peptídeo sinal de *TGFBI* com os sítios de restrição de ambas as enzimas e os genótipos observados são apresentados na figura 3.

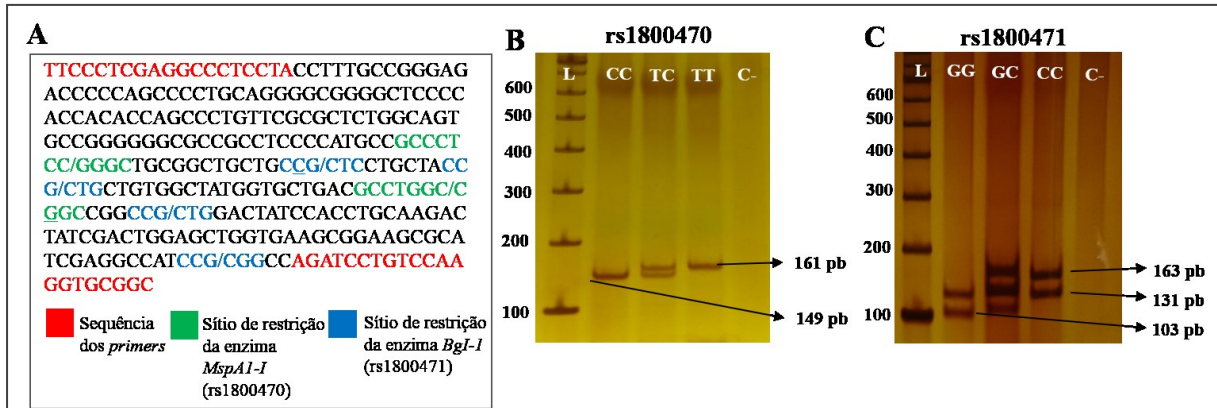


Figura 3 – Polimorfismos rs1800470 e rs1800471 da região do peptídeo sinal de *TGFBI*.
 A) Sequência do fragmento amplificado demonstrando em vermelho a sequência dos primers utilizados, em verde a região de clivagem para a enzima *MspAI-I* e em azul a região de clivagem para a enzima *Bgl-I*. B) Perfil eletroforético do polimorfismo rs1800470. C) Perfil eletroforético do polimorfismo rs1800471. L: ladder 100 pb; C-: controle negativo.

3.4 SEQUENCIAMENTO

A especificidade da detecção do produto de PCR em relação aos alelos foi demonstrada por sequenciamento direto do produto de PCR pelo Analisador Genético 3500 de 8 capilares (Applied Biosystems).

Para tal, alguns produtos de PCR para *TGFBI* (peptídeo sinal e promotor) e *TGFBR2* foram purificados utilizando PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA), 50 ng de produto de PCR e 5 pM de iniciadores (*forward* ou *reverse*) em um volume final de 10 µl. As condições de PCR foram as seguintes: 10 s a 95°C, 30 ciclos de 20 s a 95°C, 20 s a 50°C e 1 min a 60°C.

3.5 INFERÊNCIA DE HAPLÓTIPOS

Para a inferência de haplótipos de *TGFBI* foi utilizado o *software* PHASE (versão 2.1.1) (STEPHENS, SMITH e DONNELLY, 2001) considerando toda a amostra como base de cálculo. Através do *software* foram realizados os testes de permutação para analisar a presença de diferenças entre a distribuição de haplótipos entre controle e indivíduos TW.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises de associação para o estudo caso-controle foram realizadas através do cálculo de *Odds ratio* (OR), adotando intervalo de confiança (IC) de 95% e teste exato de Fisher, utilizando o programa estatístico IBM® SPSS® Statistics 22.0 *software* (IBM®, Armonk, New York, USA). Para os polimorfismos individuais foram testados os modelos genotípicos, dominante e recessivo.

As análises de haplótipos também foram realizadas através do cálculo da OR levando em consideração suas contagens totais nos grupos.

A análise de correlação entre os polimorfismos em relação às características clinico-patológicas de TW foi realizada através do cálculo do coeficiente de correlação Tau-b de Kendall utilizando o programa estatístico SPSS Statistics 22.0.

O valor de p para todas as análises foi considerado estatisticamente significativo quando menor que 0,05.

4 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 ARTIGO 1

***TGFBI* signal peptide and promoter region genetic polymorphisms and haplotype structures: possible role as a susceptibility marker for Wilms Tumor**

ABSTRACT

Renal tumors comprise 6% of all pediatric cancers, and of these 95% present embryonic origin, called nephroblastoma or Wilms' tumor (WT). It is known that the microenvironment is important in cancer pathogenesis through interaction between neoplastic and stromal cells and the immune system. The molecules present in the microenvironment include the transforming growth factor beta 1 (TGFB1), a pleiotropic cytokine presenting dual role as tumor development, inhibitor in the initial stages and promoter in carcinogenesis advanced stages. Many genetic polymorphisms in this gene have been reported in association with cancer development. The objective of the present study was to analyze the association between *TGFBI* rs1800468, rs1800469, rs1800470 and rs1800471 polymorphisms, as well as their haplotypes structures and WT, and also analyze the correlation of polymorphisms with prognostic factors in WT patients. No significant association of the rs1800468 and 1800471 polymorphisms was verified in this study. However, for the rs1800469 polymorphism a positive association with T allele was observed in the recessive model (OR: 8.417; 95% CI: 3.177 to 22.297; $p < 0.001$). Similarly, a significant association was found considering rs1800470 polymorphism in the recessive model for WT risk (OR: 3.000; 95% CI: 1.296 to 6.944; $p = 0.01$). Furthermore, no correlation was found between clinicopathological features and individual polymorphisms. In the case-control association study according to haplotype structures, a significant association was verified, where the haplotype GCTG conferred protection against tumor development (OR: 0.236, 95% CI: 0.105 to 0.534; $p = 0.0002$) and GTTG was associated with risk (OR: 12.0; 95% CI: 4.202 to 34.270; $p < 0.001$). Although more studies are needed to clarify the role of TGFB1 in Wilms Tumor, our results suggest that the *TGFBI* promoter and signal peptide polymorphism may be associated with WT.

keywords: Wilms Tumor, *TGFBI*, genetic polymorphism, genetic markers, haplotype

INTRODUCTION

Wilms tumor (WT), or nephroblastoma, is a childhood kidney cancer derived from the pluripotent embryonic kidney precursor (Rivera and Haber 2005) and consists histologically of smooth stromal, epithelial and undifferentiated mesenchymal cells (Akpa, Iglesias et al. 2016). It is the most common pediatric kidney tumor, affecting 1:10,000 children (Royer-Pokora 2013).

The survival rate in patients has increased considerably in recent decades, more than about 90% in localized disease and over 70% for metastatic disease (Pritchard-Jones 2002). However, despite good therapy response and high success rates, there are concerns due to the risk of irreparable side effects (Maturu 2016), since it targets cells with a high proliferative rate and the tumor affects tissues still in development (Duffner, Cohen et al. 1988). Furthermore, the prognostic indicators of recurrence and mortality are staging and tumor histology and the most significant unfavorable factors are high stage and the presence of anaplasia, especially in the diffuse form, which is highly resistant to chemotherapy (Dome, Cotton et al. 2006). Thus, improving knowledge of tumor biology and biomarker identification can help to improve risk stratification and to introduce new target therapies that minimize toxicity and improves outcomes for WT patients with unfavorable histology and recurrent disease (Cone, Dalton et al. 2016, Maturu 2016).

The tumor microenvironment is dynamic and its interaction with tumor cells is essential for cancer development, influencing growth, invasiveness and metastatic process (Yaqub and Aandahl 2009). Transforming Growth Factor beta 1 (TGFB1) is a pleiotropic cytokine that plays an important role in embryogenesis (Bush, Sakurai et al. 2004) and in the physiological and pathological context by interfering in the cell cycle, apoptosis and differentiation (Blobe, Schiemann et al. 2000).

In normal and pre-neoplasms cells, TGFB1 acts as a tumor suppressor associated with anti-proliferative activity and apoptosis, but in late cancer stages it acts as a tumor progression mediator (Bierie and Moses 2006, Wrzesinski, Wan et al. 2007, Kubiczkova, Sedlarikova et al. 2012). In malignant cells and at advanced stages of carcinogenesis, the TGFB1 cytokine promotes cell growth and epithelial-mesenchymal transition (EMT), which increases the invasiveness of these cells. In addition, it acts in the extracellular matrix and immune system cells, inducing immunosuppression by the generation of regulatory T cells, anergy and senescence of T effector cells and in endothelial cells and smooth muscle leading to angiogenesis, which favors the metastasis process (Blobe, Schiemann et al. 2000).

The *TGFB1* gene is located on chromosome 19q13 (Fujii, Brissenden et al. 1986). Many polymorphisms have been reported in this gene (Cambien, Ricard et al. 1996), including the rs1800468 (G-800A, c.-1638G>A) and rs1800469 (C-509T, c.-1347T>C) in the promoter region and rs1800470 (c.29C>T, Leu10Pro, T869C) and rs1800471 (c.74G>C, Arg25Pro) in the signal peptide region which have been associated with gastric cancer (Guo, Dong et al. 2011, Choi, Kim et al. 2015), esophageal squamous cell carcinoma (Jin, Deng et

al. 2008) and breast cancer (Dunning, Ellis et al. 2003). Due to their location, these polymorphisms have the potential to alter the dynamics of TGFBI expression or secretion.

Therefore, the aim of this study was to verify the genotype frequencies of *TGFBI* rs1800468, 1800469, 1800470 and 1800471 in WT patients and neoplasia-free controls in a search for susceptibility and/or prognosis markers for this pediatric neoplasia, as well verify the association of their haplotype structures in susceptibility to WT.

MATERIALS AND METHODS

Human Subjects

The present study was approved by the Institutional Human Research Ethics Committee of the State University of Londrina, Paraná, Brazil (CEP/UEL 189/2013 – CAAE 17123113400005231) and a term of free and informed consent was signed by children donor parents prior to biological material collection. The child samples consisted of 35 paraffin embedded tumor tissue slides from child patients from the North of Paraná Laboratory of Pathology Anatomy and Cytology (Micropar) and Laboratory of Pathology of the University Hospital of the State University of Londrina. The control group consisted of 170 samples from neoplasia-free children, which included 134 blood samples and 36 buccal cells samples from the State University of Londrina, Paraná, Brazil.

DNA Extraction

DNA from the control group was obtained from peripheral white blood cells using a Mini Spin extraction kit (Biometrix, Curitiba, PR, Brazil), following the manufacturer's instructions and in some cases the DNA was obtained from buccal cells using a protocol based on the use of ammonium acetate (Aidar and Line 2007).

In the tumor sample group, genomic DNA was isolated from formalin-fixed paraffin embedded samples and extracted using a innuPREP DNA Mini Kit (Analytik Jena AG, Jena, Germany), following the manufacturer's instructions.

All DNA samples were quantified by NanoDrop 2000® Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) at 260/280 nm wavelength.

Genetic Polymorphisms

Genetic polymorphisms were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) followed by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis, as described by Jin *et al.*, 2004, with modifications. All samples were analyzed by electrophoresis in acrylamide gel (10%), detected by the silver staining method.

The *TGFBI* polymorphisms (promoter and signal peptide regions) were amplified using the same reaction condition, 100 ng of DNA, 1 X high fidelity PCR buffer, 1 mM MgSO₄, 0.2 μM primers, 0.13 mM dNTP and 1 U Taq Platinum High Fidelity DNA polymerase. Both primer pairs were designed based on the *TGFBI* gene reference sequence (NCBI gene bank accession number NG_013364.1).

For the promoter region, polymorphism (rs1800468 and rs1800469) primer sequences were forward 5'-GCAGTTGGCGAGAACAGTTG-3' and reverse 5'-CCAGAACGGAAGGAGAGTCAG-3'. The PCR conditions were 10 min at 94°C, 35 cycles of 45 s at 94°C, 1 min at 59°C and 1 min and 15 s at 72°C, and 10 min at 72°C. For rs1800468 genotype analysis, PCR products (597 bp) were subjected to enzymatic digestion by *HpyCH4IV* (New England Biolabs®, Ipswich, USA). The genotype profiles were GG (402 bp and 195 bp), GA (597 bp, 402 bp and 195 bp), AA (597 bp). For rs1800469 genotype analysis, PCR products (597 bp) were subjected to digestion by *Bsu36I* (New England Biolabs®). The genotype profiles were CC (488 bp and 109 bp), CT (597 bp, 488 bp and 109 bp) and TT (597 bp).

Primer sequences for the signal peptide region (rs1800470 and rs1800471) were: forward 5'-TTCCCTCGAGGCCCTCCTA-3' and reverse 5'-GCCGCAGCTTGGACAGGATC-3' and PCR conditions were 10 min at 96°C, 35 cycles of 75 s at 96°C, 75 s at 62°C and 75 s at 73°C, and 5 min at 73°C. For the rs1800470 polymorphism assay, PCR products (294 bp) were subjected to enzymatic digestion by *MspAII* (New England Biolabs®). The genotypes were CC (149 bp, 67 bp, 40 bp, 26 bp and 12 bp), CT (161 bp, 149 bp, 67 bp, 40 bp and 26 bp) and TT (161 bp, 67 bp, 40 bp and 26 bp). For the rs1800471 polymorphism assay, PCR products (294 bp) were subjected to enzymatic digestion by *BglII* (New England Biolabs®). The genotype profiles were GG (131 bp, 103 bp and 60 bp), GC (163 bp, 131 bp, 103 bp and 60 bp) and CC (163 bp and 131 bp).

Amplicons sequencing

To confirm the primers' specificity used in the present study, some PCR products of both *TGFBI* polymorphisms were purified using PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's instructions. The sequencing reaction was performed using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). The amplicons were sequenced in a 24-capillary 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems®).

Statistical analysis

The case-control study for WT susceptibility was assessed by the Odds Ratio (OR), adopting an estimative of the relative risk at 95% confidence intervals (CI), and Fisher's exact test. Genotypic, dominant and recessive models were tested for all polymorphisms. Correlation analysis between the polymorphisms in relation to WT clinical outcome were assessed by the Kendall tau-b rank correlation coefficient. The *TGFBI* haplotypes were determined using PHASE software version 2.1.1 (Stephens, Smith et al. 2001) using all the study participants' genotypes and the software was used to perform permutation tests to check difference between haplotype distributions between the control and WT individuals.

All statistical analyses were performed in IBM® SPSS® Statistics 20.0 software (IBM®, Armonk, New York, USA). All tests were two-tailed with significance level set at 0.05.

RESULTS

The present study evaluated 35 samples from WT pediatric patients, of which 14 were males and 21 female. The patients' age ranged from 1 to 13 years, whereas the control group age ranged from 3 months to 18 years old.

PCR positive samples from *TGFBI* (peptide signal and promoter region) were sequenced in a Genetic Analyser sequencer and then were compared to the GenBank database to confirm the amplicon sequence. Resulting sequences revealed identity by

comparison with GenBank accession number NG_013364.1 for *TGFBI*, confirming primer specificity.

Electrophoretic profile of *TGFBI* promoter region and signal peptide polymorphisms (rs1800468 and rs1800469; rs1800470 and rs1800471, respectively) are represented in Figure 1.

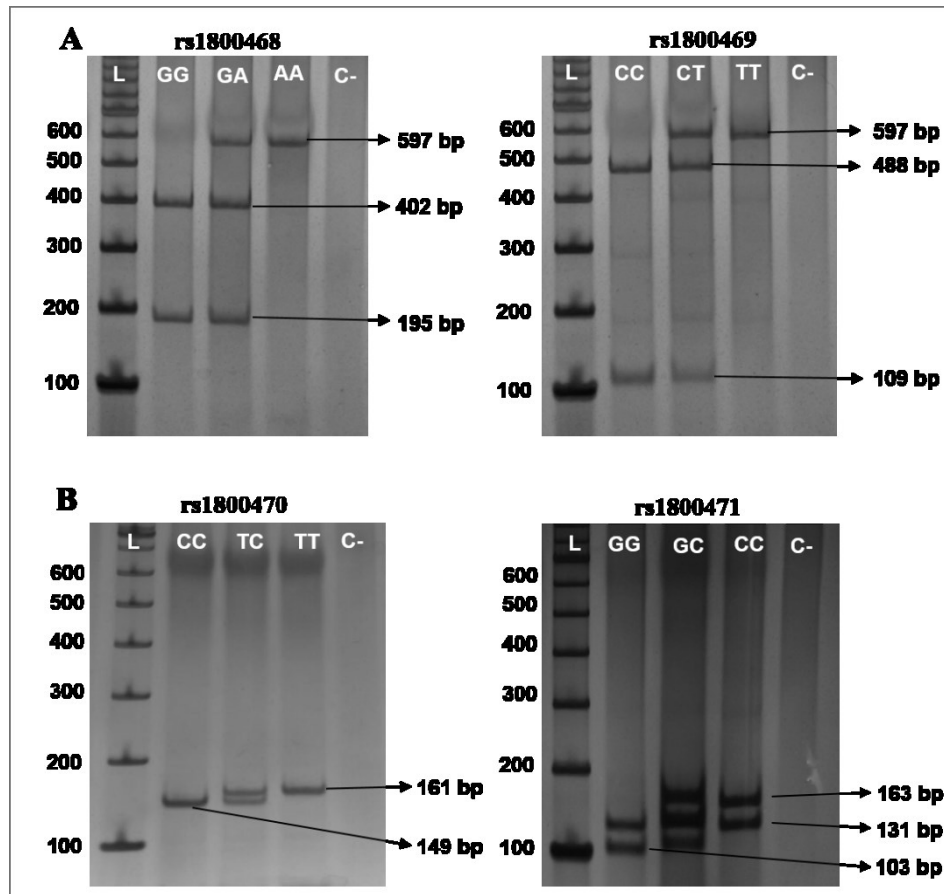


Figure 1. *TGFBI* promoter and signal peptide polymorphisms profile. Electrophoretic profile of: A) promoter region polymorphisms, B) signal peptide polymorphisms. The PCR products after enzymatic restriction were analyzed by electrophoresis on acrylamide gel (10%), detected by silver staining method. L: Ladder 100 bp; C-: negative control

The sample size calculation was performed and a minimum sample number of 208 (rs1800468), 28 (rs1800469), 21 (rs1800470) and 100 (rs1800471) was found.

Case-control association studies were conducted to determine possible influence of polymorphisms on WT susceptibility. The frequencies and case-control study for the promoter regions (rs1800468 and rs1800469) and signal peptide (rs1800470 and rs1800471) polymorphisms are shown in Table 1 and 2, respectively.

For the *TGFBI* promoter region polymorphism, the case-control study indicated no significant association for the rs1800468 polymorphism. However, the rs18004769 polymorphism presented a positive association for the T allele in the recessive model (OR: 8.417; 95% CI: 3.177 to 22.297; $p < 0.001$) (Table 1).

Table 1. Genotypic frequencies and case-control study for *TGFBI* promoter region polymorphisms (rs1800468 and rs1800469) in WT and control patients.

Models	Controls n(%)	Patients n(%)	Odds Ratio	CI 95%	<i>p</i> value
rs1800468					
GG	105 (92.1)	26 (92.8)	Reference	-	-
GA	7 (6.1)	1 (3.6)	0.577	0.068 – 4.898	0.577
AA	2 (1.8)	1 (3.6)	2.019	0.176 – 23.133	0.572
Dominant model					
GG	105 (92.1)	26 (92.8)	Reference	-	-
AA+GA	9 (7.9)	2 (7.2)	0.897	0.183 – 4.406	0.894
Recessive model					
GG+GA	112 (98.2)	27 (96.4)	Reference	-	-
AA	2 (1.8)	1 (3.6)	2.074	0.181 – 23.724	0.557
rs1800469					
CC	43 (37.7)	6 (24.0)	Reference	-	-
CT	58 (50.9)	6 (24.0)	0.741	0.224 – 2.457	0.625
TT	13 (11.4)	13 (52.0)	7.167	2.271 – 22.615	0.001*
Dominant model					
CC	43 (37.7)	6 (24.0)	Reference	-	-
TT+CT	71 (62.3)	19 (76.0)	1.918	0.711 – 5.176	0.199
Recessive model					
CC+CT	101(88.6)	12 (48.0)	Reference	-	-
TT	13 (11.4)	13 (52.0)	8.417	3.177 – 22.297	0.001*

CI: confidence interval. Fisher's exact test. *Significant ($p < 0.05$)

Similarly, when the *TGFBI* signal peptide polymorphisms were analyzed, a significant association was found for the rs1800470 polymorphism with increased risk for WT, in the recessive model (OR: 3.000; 95% CI: 1296 to 6.944; $p = 0.010$). However, no significant association was found for the rs1800471 polymorphism (Table 2). For this polymorphism, analysis evaluating the CC genotype was not possible due to the absence of this genotype in the control group.

Table 2. Genotypic frequencies and case-control study for *TGFBI* peptide signal polymorphisms (rs1800470 and rs1800471) in WT and control patients.

CI: confidence interval. Fisher's exact test. *Significant ($p < 0.05$) NA: not available

Models	Controls n(%)	Patients n(%)	Odds Ratio	CI 95%	<i>p</i> value
rs1800470					
TT	24 (16.7)	12 (37.5)	Reference	-	-
TC	83 (57.6)	11 (34.4)	0.545	0.208 – 1.426	0.216
CC	37 (25.7)	9 (28.1)	2.056	0.752 – 5.618	0.160
Dominant model					
TT	24 (16.7)	12 (37.5)	Reference	-	-
CC+TC	120 (83.3)	20 (62.5)	0.884	0.375 – 2.081	0.777
Recessive model					
TT+TC	107 (74.3)	23 (71.9)	Reference	-	-
CC	37 (25.7)	9 (28.1)	3.000	1.296 – 6.944	0.010*
rs1800471					
GG	130 (90.3)	26 (81.2)	Reference	-	-
GC	14 (9.7)	3 (9.4)	1.071	0.287 – 3.995	0.918
CC	-	3 (9.4)	NA	NA	NA
Dominant model					
GG	130 (90.3)	26 (81.2)	Reference	-	-
CC+GC	14 (9.7)	6 (18.8)	2.143	0.754 – 6.093	0.153

Analysis taking into account clinical parameters in relation to the promoter region polymorphism of *TGFBI*, rs1800469, showed no significant correlation with any of the clinical pathologic features (Table 3). The correlation analysis for the rs1800468 polymorphism was not possible due to the rarity of the polymorphism and absence of patients with AA genotype (1 individual) with accessible medical records.

Table 3. Correlation analysis between *TGFBI* rs1800469 and WT patient's clinical outcome.

		Genotypes			<i>p</i> value (τ value)
		CC n(%)	CT n(%)	TT n(%)	
Tumor size	≤ 8	-	3 (75.0)	2 (28.6)	0.611
	>8	4 (100.0)	1 (25.0)	5 (71.4)	(-0.117)
Capsular invasion	P	1 (25.0)	1 (100.0)	6 (75.0)	0.128
	A	3 (75.0)	-	2 (25.0)	(0.405)
Metastasis	P	2 (66.7)	2 (66.7)	2 (66.7)	1.000
	A	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	(-0.000)
Lymph node commitment	P	2 (40.0)	2 (66.7)	2 (33.3)	0.773
	A	3 (60.0)	1 (33.3)	4 (66.7)	(-0.073)

Tumor size: cm; P: present; A: absent. Kendall's tau-b test.

The correlation analysis of the clinical-pathologic features including tumor size, capsular invasion, metastasis and lymph node commitment with signal peptide polymorphisms showed no significant correlation, as shown in Tables 4 and 5.

Table 4. Correlation analysis between *TGFBI* rs1800470 and WT patient's clinical outcome.

		Genotypes			<i>p</i> value (τ value)
		TT n(%)	TC n(%)	CC n(%)	
Tumor size	≤ 8	2 (28.6)	4 (50.0)	2 (28.6)	1.000
	>8	5 (71.4)	4 (50.0)	5 (71.4)	(0.000)
Capsular invasion	P	2 (50.0)	5 (71.4)	4 (66.7)	0.668
	A	2 (50.0)	2 (28.6)	2 (33.3)	(-0.102)
Metastasis	P	1 (50.0)	4 (80.0)	2 (50.0)	0.769
	A	1 (50.0)	1 (20.0)	2 (50.0)	(0.092)
Lymph node commitment	P	2 (28.6)	2 (28.6)	1 (25.0)	0.913
	A	5 (71.4)	5 (71.4)	3 (75.0)	(0.024)

Tumor size: cm; P: present; A: absent. Kendall's tau-b test.

Table 5. Correlation analysis between *TGFBI* rs1800471 and WT patient's clinical outcome.

		Genotypes			<i>p</i> value (τ value)
		GG n(%)	GC n(%)	CC n(%)	
Tumor size	≤ 8	7 (38.9)	-	1 (50.0)	0.670
	>8	11 (61.1)	2 (100.0)	1 (50.0)	(0.087)
Capsular invasion	P	9 (64.3)	1 (50.0)	1 (100.0)	0.872
	A	5 (35.7)	1 (50.0)	-	(0.037)
Metastasis	P	4 (66.7)	2 (100.0)	1 (33.3)	0.542
	A	2 (33.3)	-	2 (66.7)	(-0.189)
Lymph node commitment	P	5 (33.3)	-	-	0.073
	A	10 (66.7)	2 (100.0)	1 (100.0)	(-0.271)

Tumor size: cm; P: present; A: absent. Kendall's tau-b test.

Twenty-two WT samples were included for haplotype analysis. Nine possible inferred haplotypes were observed. For this study, the ACCC and ATCG haplotype structures were not included due to their absence in the control group. The haplotype frequency distribution is shown in Table 6, where the haplotype structures were written with four individual SNPs in the sequence of rs1800468, rs1800469, rs1800470 and rs1800471.

Table 6. Haplotype distribution among WT and control groups.

		HAPLOTYPE [n(%)]							
		ACTG	GCCC	GCCG	GCTG	GTCC	GTCG	GTTG	n
WT		1	2	2	8	1	16	12	42
		(2.3)	(4.6)	(4.6)	(18.2)	(2.3)	(36.4)	(27.3)	(95.7)
CC		10	7	14	96	3	62	6	198
		(5.1)	(3.5)	(7.1)	(48.5)	(1.5)	(31.3)	(3.0)	(100.0)

WT: Wilms Tumor CC: Control Group *p=0.001

A significant difference among controls and WT patients was observed ($p=0.001$) for GCTG which was more present in control group while GTTG was more present in the WT group. Based on these results, a case-control study of association of haplotype structures indicated a significant association where the GCTG haplotype conferred protection against tumor development (OR: 0.236; 95% CI: 0.105 to 0.534; $p=0.0002$) and GTTG was associated with risk (OR: 12.000; 95% CI: 4.202 to 34.270; $p<0.0001$) (Table 7).

For this analysis, each haplotype structure was compared to the total number of haplotypes in the analysis.

Table 7. Case-control association study for haplotype structures

Haplotype structure	Odds Ratio (CI)	p-value
ACTG	0.437 (0.055-3.509)	0.694
GCCC	1.049 (0.212-5.206)	1.000
GCCG	0.506 (0.111-2.297)	0.534
GCTG	0.236 (0.105-0.534)	<0.001*
GTCC	1.512 (0.153-14.890)	0.554
GTCG	1.253 (0.635-2.484)	0.593
GTTG	12.000 (4.202-34.270)	<0.001*

CI: confidence interval. Fisher's exact test. *Significant ($p < 0.05$)

DISCUSSION

In this study we analyzed 35 patients and the overall mean age found was 43 months, which is similar to other literature data (Breslow, Beckwith et al. 2006). Similarly, the tumor was equally distributed between the sexes, as observed by Provenzi, Rosa et al. (2014).

WT is a neoplasm of embryonic origin, whose structures and composition recapitulate characteristics of normal nephrogenesis (Hohenstein, Pritchard-Jones et al. 2015). Failures during embryogenesis are considered one of the causes of WT (Rivera and Haber 2005). In this context, studies have demonstrated the crucial role of the TGFB1 in metanephro structure development during the fetal period (Bush, Sakurai et al. 2004), as well as in immunomodulation by inhibiting the activity of immune cells essential for the antitumor response. In this way, it is reasonable to assume that TGFB1 also participates in WT development.

Several studies have shown alterations in TGFB1 pathway components and it is known that such alterations can modify the dynamics of this cytokine as well as alter susceptibility and progression of diseases such as cancer (Levy and Hill 2006). In the present study we investigated four polymorphisms in *TGFB1*, two in the promoter region (rs1800468 and rs1800469) and two in the signal peptide region (rs1800470 and rs1800471), somehow involved in expression regulation and secretion of this cytokine, regarding WT susceptibility.

Despite numerous studies that relate TGFB1 with various neoplasms (Javle, Li et al. 2014, Choi, Kim et al. 2015), only one demonstrated the participation of this cytokine in WT, which associated high levels with invasion and disease progression (Zhang, Liu et al.

2014). In addition, studies of WT and genetic polymorphisms are even more scarce, and this is the first study approaching these *TGFBI* polymorphisms.

In this study, no association was found for the rs1800468 polymorphism of the *TGFBI* promoter region (Table 1). This polymorphism is located on the putative consensus CREB half-site and the allele A was observed to reduce the affinity for the CREB transcription factors family (Grainger, Heathcote et al. 1999). Despite the absence of studies evaluating this polymorphism in WT, studies with other tumors have demonstrated breast cancer (Parvizi, Mohammadzadeh et al. 2016) and uterine cervical cancer risk (Ramos-Flores, Romero-Gutierrez et al. 2013) associated to A allele.

However, when the rs1800469 *TGFBI* polymorphism was analyzed an association was found for the T allele in the recessive model with WT susceptibility (Table 1). While Jin, Deng et al. (2008) in a study of esophageal squamous cell carcinoma found association of the same variant with protection against cancer, studies on breast cancer (Parvizi, Mohammadzadeh et al. 2016) and gastric cardia adenocarcinoma (Guo, Dong et al. 2011) have also shown association of the allelic variant T of rs1800469 with cancer development risk.

The *TGFBI* rs1800469 polymorphism is located in a Yin Yang 1 (YY1) transcription factor consensus binding site. Studies using the transient transfection analysis with promoter-reporter constructs showed that the exchange from C to T at the -509 position of the promoter increases affinity for YY1 (Silverman, Palmer et al. 2004). This may be one of the mechanisms that leads to increased cytokine secretion in cancer patient plasma, as demonstrated by Grainger et al (1999), and observed in cases of pancreatic (Javle, Li et al. 2014) and gastric cancer (Choi, Kim et al. 2015) as well as in cases of poor prognosis in WT (Zhang, Liu et al. 2014).

For the signal peptide region, it was verified that the *TGFBI* rs1800470 C allele, in a recessive model, was associated with WT development (Table 2). Similar results were found in other tumors, where homozygous CC was associated with breast (Dunning, Ellis et al. 2003) and colorectal cancer (Berndt, Huang et al. 2007) susceptibility and C allele with oral cancer (Carneiro, Oda et al. 2013), gastric adenocarcinoma (Guo, Dong et al. 2011), non-small cell lung (Wang, Song et al. 2015) and esophageal squamous cells carcinoma risk (Wei, Xu et al. 2007).

Significant effect of rs1800470 polymorphism on the *TGFBI* secreted concentration may provide an explanation for the reported associations with a variety of diseases, such as found in the present study. This polymorphism results in the exchange of a

leucine (T) for a proline (C) at signal peptide amino acid 10 and it has been reported previously that the amount of TGFB1 in serum is higher for CC homozygotes than TT homozygotes (Grainger, Heathcote et al. 1999), and other studies are consistent with this observation (Yokota, Ichihara et al. 2000, Guo, Dong et al. 2011). Dunning, Ellis et al. (2003), in a transfection study of HeLa cells with constructs encoding either the C or T allele of *TGFB1* indicated that the signal peptide with C allele causes a 2.8-fold increase in secretion compared with the T allele form. This increase may be the result of structure and property changes in the TGFB1 signal peptide due to the exchange of amino acids.

Susianti, Handono et al. (2014) showed that the presence of proline amino acid (allele C) changes the hydrophobic core region of the TGFB1 signal peptide and breaks the α -helice structure provided by leucine (allele T), altering the stability of the signal peptide interaction with Signal Recognition Particle (SRP) and translocon, reducing the values on transmembrane tendency and binding more stably to the protein partner. As the sequence of the peptide signal is responsible for allowing the export of new protein synthesized by the endoplasmic reticulum membrane and then secretion, such changes lead to modifications in the exportation and secretion dynamics, with consequent cytokine levels alteration.

It is therefore plausible that TGFB1 local secretion by tumors and/or local stromal cells is also higher for CC homozygotes. As noted earlier, current theories for the effects of TGFB1 on tumor development are that increased amounts of TGFB1 activity may suppress the early stages of tumor formation but promote the invasiveness, metastasis, and angiogenesis of advanced tumors (Dunning, Ellis et al. 2003, Guo, Dong et al. 2011). In this context, Zhang, Liu et al. (2014) reported that TGFB1 expression in WT tissues was associated with invasion/metastasis, confirmed by an invasion assay through transiently transfected *TGFB1* to primary WT cells.

However, in this study, no association was found between rs1800471 signal peptide polymorphism and WT susceptibility (Table 2), as also in bladder (Gautam, Pooja et al. 2015) and colorectal adenoma cancers (Berndt, Huang et al. 2007). In addition, Priyadarshi, Ray et al. (2013) studied *TGFB1* genetic association and expression profiles and atherosclerosis susceptibility, and verified that the C allele of rs1800471 was rare, as observed in the present study.

Despite the small sample size, the sample size calculation for polymorphisms rs1800469 and rs1800470, which confer increased susceptibility for WT, was compatible with the sample number of this study, validating the results obtained. For the

polymorphisms rs1800468 and rs1800471, although we did not find significant association, studies with a larger sample number are necessary for confirmation.

Similarly, the analysis using clinical parameters of WT patients in relation to *TGFBI* polymorphisms showed no significant correlation with any of the clinical pathologic features analyzed (Table 3 to 5). Despite the absence of polymorphism studies and clinical-pathological parameters in WT, studies with other tumors also found no correlation with clinical parameters such as breast cancer (Pooja, Francis et al. 2013) for signal peptide polymorphisms. On the other hand, Guo, Dong et al. (2011) found correlation between the rs1800469 T allele and staging III and IV in gastric cardia adenocarcinoma.

Several diseases have been found at higher frequencies in individuals with haplotypes of certain genes but there are no studies on WT. The *TGFBI* haplotype association analysis revealed that the GCTG structure conferred protection against WT while the GTTG haplotype, which differs only by rs1800469, confers risk. Although the individual rs1800470 polymorphism conferred risk of the C allele on WT, this was not observed in the haplotype analysis, perhaps due to the reduction in the sample numbers used for the haplotype study (22 samples). Although a larger number of samples are necessary to confirm this potential association, the present study showed positive association for T allele (rs1800469) and C allele (rs1800470) with WT susceptibility.

Few studies have performed haplotype analysis, so that Jin, Hemminki et al. (2004) conducted such an analysis with the four *TGFBI* polymorphisms (promoter and signal peptide regions) studied in this research but no association with cancer was found. Berndt, Huang et al. (2007), in a study with five *TGFBI* polymorphisms (rs1800468, rs1800469, rs1800470, rs1800471 and rs1800472) found association of the GTCGC haplotype structure with susceptibility to colorectal adenoma, which was compatible with our individual polymorphism studies where the T allele of C-509T and C allele of T869C polymorphism conferred risk.

Since this is the first study with the rs1800468, rs1800469, rs1800470 and rs1800471 *TGFBI* polymorphisms in WT, divergent results with other tumors can occur due the biological tumor differences of the same cancer and between different types of cancers. Despite the limitations of the study due to the small sample size and absence of related studies, which may affect the ability to detect some associations, and since the haplotype analyses are in agreement with the individual polymorphism rs1800469, our results suggest that rs1800469 and rs1800470 *TGFBI* polymorphisms may be associated with WT susceptibility.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the volunteers who made this study possible and the Cancer Hospital of Londrina, Londrina, PR, Brazil. This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 470452/2014-5), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária, Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI) and Londrina State University Graduate Coordination (PROPPG- UEL). Cintya Mayumi Ishibashi was a fellow of the CAPES, Brazil.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Aidar, M. and S. R. Line (2007). "A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells." *Braz Dent J* **18**(2): 148-152.
- Akpa, M. M., D. Iglesias, L. Chu, A. Thiebaut, I. Jentoft, L. Hammond, E. Torban and P. R. Goodyer (2016). "Wilms Tumor Suppressor, WT1, Cooperates with MicroRNA-26a and MicroRNA-101 to Suppress Translation of the Polycomb Protein, EZH2, in Mesenchymal Stem Cells." *J Biol Chem* **291**(8): 3785-3795.
- Berndt, S. I., W. Y. Huang, N. Chatterjee, M. Yeager, R. Welch, S. J. Chanock, J. L. Weissfeld, R. E. Schoen and R. B. Hayes (2007). "Transforming growth factor beta 1 (TGFB1) gene polymorphisms and risk of advanced colorectal adenoma." *Carcinogenesis* **28**(9): 1965-1970.
- Bierie, B. and H. L. Moses (2006). "Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer." *Nat Rev Cancer* **6**(7): 506-520.
- Blobe, G. C., W. P. Schiemann and H. F. Lodish (2000). "Role of transforming growth factor beta in human disease." *N Engl J Med* **342**(18): 1350-1358.
- Breslow, N. E., J. B. Beckwith, E. J. Perlman and A. E. Reeve (2006). "Age distributions, birth weights, nephrogenic rests, and heterogeneity in the pathogenesis of Wilms tumor." *Pediatr Blood Cancer* **47**(3): 260-267.
- Bush, K. T., H. Sakurai, D. L. Steer, M. O. Leonard, R. V. Sampogna, T. N. Meyer, C. Schwesinger, J. Qiao and S. K. Nigam (2004). "TGF-beta superfamily members modulate growth, branching, shaping, and patterning of the ureteric bud." *Dev Biol* **266**(2): 285-298.
- Cambien, F., S. Ricard, A. Troesch, C. Mallet, L. Generenaz, A. Evans, D. Arveiler, G. Luc, J. B. Ruidavets and O. Poirier (1996). "Polymorphisms of the transforming growth factor-beta

1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study." Hypertension **28**(5): 881-887.

Carneiro, N. K., J. M. Oda, R. Losi Guembarovski, G. Ramos, B. V. Oliveira, I. J. Cavalli, S. F. R. E. M. de, M. S. Goncalves and M. A. Watanabe (2013). "Possible association between TGF-beta1 polymorphism and oral cancer." Int J Immunogenet **40**(4): 292-298.

Choi, Y. J., N. Kim, A. Shin, H. S. Lee, R. H. Nam, H. Chang, C. M. Shin, Y. S. Park, D. H. Lee, J. H. Park and H. C. Jung (2015). "Influence of TGFB1 C-509T polymorphism on gastric cancer risk associated with TGF-beta1 expression in the gastric mucosa." Gastric Cancer **18**(3): 526-537.

Cone, E. B., S. S. Dalton, M. Van Noord, E. T. Tracy, H. E. Rice and J. C. Routh (2016). "Biomarkers for Wilms Tumor: A Systematic Review." J Urol **196**(5): 1530-1535.

Dome, J. S., C. A. Cotton, E. J. Perlman, N. E. Breslow, J. A. Kalapurakal, M. L. Ritchey, P. E. Grundy, M. Malogolowkin, J. B. Beckwith, R. C. Shamberger, G. M. Haase, M. J. Coppes, P. Coccia, M. Kletzel, R. M. Weetman, M. Donaldson, R. M. Macklis and D. M. Green (2006). "Treatment of anaplastic histology Wilms' tumor: results from the fifth National Wilms' Tumor Study." J Clin Oncol **24**(15): 2352-2358.

Duffner, P. K., M. E. Cohen and M. S. Parker (1988). "Prospective intellectual testing in children with brain tumors." Ann Neurol **23**(6): 575-579.

Dunning, A. M., P. D. Ellis, S. McBride, H. L. Kirschenlohr, C. S. Healey, P. R. Kemp, R. N. Luben, J. Chang-Claude, A. Mannermaa, V. Kataja, P. D. Pharoah, D. F. Easton, B. A. Ponder and J. C. Metcalfe (2003). "A transforming growth factorbeta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer." Cancer Res **63**(10): 2610-2615.

Fujii, D., J. E. Brissenden, R. Derynck and U. Francke (1986). "Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7." Somat Cell Mol Genet **12**(3): 281-288.

Gautam, K. A., S. Pooja, S. N. Sankhwar, P. L. Sankhwar, A. Goel and S. Rajender (2015). "c.29C>T polymorphism in the transforming growth factor-beta1 (TGFB1) gene correlates with increased risk of urinary bladder cancer." Cytokine **75**(2): 344-348.

Grainger, D. J., K. Heathcote, M. Chiano, H. Snieder, P. R. Kemp, J. C. Metcalfe, N. D. Carter and T. D. Spector (1999). "Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1." Hum Mol Genet **8**(1): 93-97.

Guo, W., Z. Dong, Y. Guo, Z. Chen, Z. Yang, G. Kuang and B. Shan (2011). "Polymorphisms of transforming growth factor-beta1 associated with increased risk of gastric cardia adenocarcinoma in north China." Int J Immunogenet **38**(3): 215-224.

Hohenstein, P., K. Pritchard-Jones and J. Charlton (2015). "The yin and yang of kidney development and Wilms' tumors." Genes Dev **29**(5): 467-482.

Javle, M., Y. Li, D. Tan, X. Dong, P. Chang, S. Kar and D. Li (2014). "Biomarkers of TGF-beta signaling pathway and prognosis of pancreatic cancer." PLoS One **9**(1): e85942.

Jin, G., Y. Deng, R. Miao, Z. Hu, Y. Zhou, Y. Tan, J. Wang, Z. Hua, W. Ding, L. Wang, W. Chen, J. Shen, X. Wang, Y. Xu and H. Shen (2008). "TGFB1 and TGFBR2 functional polymorphisms and risk of esophageal squamous cell carcinoma: a case-control analysis in a Chinese population." J Cancer Res Clin Oncol **134**(3): 345-351.

Jin, Q., K. Hemminki, E. Grzybowska, R. Klaes, M. Soderberg, H. Zientek, J. Rogozinska-Szczepka, B. Utracka-Hutka, J. Pamula, W. Pekala and A. Forsti (2004). "Polymorphisms and haplotype structures in genes for transforming growth factor beta1 and its receptors in familial and unselected breast cancers." Int J Cancer **112**(1): 94-99.

Kubiczkova, L., L. Sedlarikova, R. Hajek and S. Sevcikova (2012). "TGF-beta - an excellent servant but a bad master." J Transl Med **10**: 183.

Levy, L. and C. S. Hill (2006). "Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer." Cytokine Growth Factor Rev **17**(1-2): 41-58.

Maturu, P. (2016). The Inflammatory Microenvironment in Wilms Tumors. Wilms Tumor. M. M. van den Heuvel-Eibrink. Brisbane (AU).

Parvizi, S., G. Mohammadzadeh, M. Karimi, M. Noorbehbahani and A. Jafary (2016). "Effects of Two Common Promoter Polymorphisms of Transforming Growth Factor-beta1 on Breast Cancer Risks in Ahvaz, West South of Iran." Iran J Cancer Prev **9**(1): e5266.

Pooja, S., A. Francis, S. Rajender, R. Tamang, R. Rajkumar, K. S. Saini, K. Megu, M. M. Goel, D. Surekha, D. R. Rao, L. Rao, L. Ramachandra, S. Kumar, S. Kumar, S. Vishnupriya, K. Satyamoorthy, M. P. Negi, K. Thangaraj and R. Konwar (2013). "Strong impact of TGF-beta1 gene polymorphisms on breast cancer risk in Indian women: a case-control and population-based study." PLoS One **8**(10): e75979.

Pritchard-Jones, K. (2002). "Controversies and advances in the management of Wilms' tumour." Arch Dis Child **87**(3): 241-244.

Priyadarshi, S., C. S. Ray, K. C. Panda, A. Desai, S. R. Nayak, N. C. Biswal and P. V. Ramchander (2013). "Genetic association and gene expression profiles of TGFB1 and the contribution of TGFB1 to otosclerosis susceptibility." J Bone Miner Res **28**(12): 2490-2497.

Provenzi, V. O., R. F. Rosa, R. C. Rosa, A. V. Roehle, P. P. dos Santos, F. R. Faulhaber, C. A. de Oliveira and P. R. Zen (2014). "Wilms tumor: experience of a hospital in southern Brazil." Pediatr Int **56**(4): 534-540.

Ramos-Flores, C., T. Romero-Gutierrez, I. Delgado-Enciso, G. E. Maldonado, V. M. Plascencia, O. F. Vazquez-Vuelvas, A. Quintero-Ramos, R. C. Mejia, F. Espinoza-Gomez, L. M. Baltazar-Rodriguez and L. L. Valdez-Velazquez (2013). "Polymorphisms in the genes related to angiogenesis are associated with uterine cervical cancer." Int J Gynecol Cancer **23**(7): 1198-1204.

Rivera, M. N. and D. A. Haber (2005). "Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney." Nat Rev Cancer **5**(9): 699-712.

- Royer-Pokora, B. (2013). "Genetics of pediatric renal tumors." *Pediatr Nephrol* **28**(1): 13-23.
- Schlesselmann, P., H. Fritz, J. Lehmann, T. Uchiyama, C. F. Brewer and E. J. Hehre (1982). "Factors determining steric course of enzymic glycosylation reactions: glycosyl transfer products formed from 2,6-anhydro-1-deoxy-D-gluco-hept-1-enitol by alpha-glucosidases and an inverting exo-alpha-glucanase." *Biochemistry* **21**(25): 6606-6614.
- Silverman, E. S., L. J. Palmer, V. Subramaniam, A. Hallock, S. Mathew, J. Vallone, D. S. Faffe, T. Shikanai, B. A. Raby, S. T. Weiss and S. A. Shore (2004). "Transforming growth factor-beta1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma." *Am J Respir Crit Care Med* **169**(2): 214-219.
- Stephens, M., N. J. Smith and P. Donnelly (2001). "A new statistical method for haplotype reconstruction from population data." *Am J Hum Genet* **68**(4): 978-989.
- Susianti, H., K. Handono, B. B. Purnomo, N. Widodo, A. Gunawan and H. Kalim (2014). "Changes to signal peptide and the level of transforming growth factor- beta1 due to T869C polymorphism of TGF beta1 associated with lupus renal fibrosis." *Springerplus* **3**: 514.
- Wang, H. B., W. G. Song, H. Q. Liu, F. Fang and Y. Xiao (2015). "Role of TGFB1 polymorphism in the development of metastatic brain tumors in non-small cell lung cancer patients." *Genet Mol Res* **14**(2): 3545-3550.
- Wei, Y. S., Q. Q. Xu, C. F. Wang, Y. Pan, F. Liang and X. K. Long (2007). "Genetic variation in transforming growth factor-beta1 gene associated with increased risk of esophageal squamous cell carcinoma." *Tissue Antigens* **70**(6): 464-469.
- Wrzesinski, S. H., Y. Y. Wan and R. A. Flavell (2007). "Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy." *Clin Cancer Res* **13**(18 Pt 1): 5262-5270.
- Yaqub, S. and E. M. Aandahl (2009). "Inflammation versus adaptive immunity in cancer pathogenesis." *Crit Rev Oncog* **15**(1-2): 43-63.
- Yokota, M., S. Ichihara, T. L. Lin, N. Nakashima and Y. Yamada (2000). "Association of a T29-->C polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese." *Circulation* **101**(24): 2783-2787.
- Zhang, L., W. Liu, Y. Qin and R. Wu (2014). "Expression of TGF-beta1 in Wilms' tumor was associated with invasiveness and disease progression." *J Pediatr Urol* **10**(5): 962-968.

4.2 ARTIGO 2

TGFB RECEPTOR II rs3087465 GENETIC POLYMORPHISM: POSSIBLE ROLE AS A PROGNOSTIC MARKER FOR WILMS TUMOR

ABSTRACT

Wilms Tumor (WT) or nephroblastoma is one of the most common pediatric malignant diseases. The biologic behavior of WT is dependent on stromal cells as well as molecules that somehow act in the development of malignancy. Transforming Growth Factor beta 1 (TGFB1), the most abundant member of the TGFB subfamily of growth factors, exert important functions during embryogenesis and in various physiological and disease systems. For this, it is necessary that the active TGFB1 binds with a transmembrane receptors complex, the receptors I (TGFBRI) and II (TGFBRII), thus triggering signaling pathways and leading to specific genes transcription. Many genetic polymorphisms in gene of TGFBRII have been reported in association with cancer development. The present study investigated the *TGFBRII* rs3087465 (c.-1216A>G, G-875A) polymorphism regarding to susceptibility and prognosis in 35 WT and 123 neoplasia-free controls samples. In the case-control study, no association was verified, control group presented GG (32.5%), GA (56.9%), AA (10.6%) and patients GG (40.0%), GA (16.0%) and AA (14.3%). However it was verified that A allele carriers presented a negative correlation with capsular invasion ($\tau=-0.430$; $p=0.029$) and lymph node commitment ($\tau=-0.449$; $p=0.022$). Although more studies are needed to clarify the role of TGFBRII due to absence of studies with this cytokine receptor in WT, our results suggests that the *TGFBRII* promoter region polymorphism in some way may be associated with prognosis in WT.

Keywords: Wilms Tumor, genetic polymorphism, *TGFBRII*, prognostic marker.

INTRODUCTION

The Wilms tumor (WT) or nephroblastoma is a kidney tumor derived immature kidney remnants. It is the most common pediatric kidney tumor, affecting 1: 10,000 children (Royer-Pokora 2013). In Brazil, the incidence is about 10 cases per million children under 14 years old per year, with higher prevalence in the range from 1 to 4 years (de Camargo, de Oliveira Ferreira et al. 2011).

Currently, the survival rate in patients is high, corresponding to 90% for localized disease and about 70% for metastatic disease (Pritchard-Jones 2002), however, approximately 25% respond poorly to treatment or have relapses (Metzger and Dome 2005). Furthermore, in spite of this success, it worries about the impact of treatment on the child and in immature affected organ development. Thus, improving the knowledge of tumor biology and search for markers that can aid in stratification and development of therapies that

minimize toxicity and exposure of patients is of great value (Cone, Dalton et al. 2016, Maturu 2016).

TGFB is an important cytokine produced in tumor microenvironment, and its effects could represent a double-edged sword in cancer. Given that TGFB have an important role in kidney development, which can control the renal architecture, it is reasonable to assume that this cytokine is involved in WT and the elucidation of the molecular mechanisms of TGFB may constitute a relevant target for future studies, with important implications in WT progression (Amarante et al., 2017). Among the three TGFB isoforms expressed in mammals, including TGFB1, TGFB2 and TGFB3, TGFB1 is the most commonly expressed and abundant form in carcinogenesis (Derynck, Akhurst et al. 2001). TGFB1 exerts its effects by binding to TGFB receptor II (TGFBRII) and is associated with the activation of TGFB receptor I (TGFBRI) and downstream signaling (Massague 2008).

TGFBRII gene (*TGFBRII*) alterations have been associated with many diseases. *TGFBRII* is located on chromosome 3p24.1 and polymorphisms in this gene have been reported, among them, the rs3047465 (G-875A, c.-1216A>G) in promoter region has been associated with various neoplasias such esophageal squamous cell carcinoma (Jin, Deng et al. 2008) and gastric cancer (Xu, Zeng et al. 2011, Guo, Dong et al. 2012).

Since this polymorphism is located in promoter gene region, it is believed that allelic variants may lead to changes in gene expression and consequent alteration in protein expression. Therefore, the aim of this study was to verify the genotype frequencies of *TGFBRII* rs3047465 polymorphism among WT patients and neoplasia-free controls, as well as evaluating the correlation between polymorphism and clinical parameters.

MATERIALS AND METHODS

Human Subjects

The present study was approved by Institutional Human Research Ethics Committee of the State University of Londrina, Paraná, Brazil (CEP/UEL 189/2013 – CAAE 17123113400005231) and a term of free and informed consent was signed by parents of the children donors to biological material collection. Clinical, histological and volumetric data were collected from medical records. The samples included 35 paraffin embedded tumor tissues from children patients from Laboratory of Pathology Anatomy and Cytology North of Paraná (Micropar) and Laboratory of Pathology of University Hospital of State University

of Londrina, and 123 blood samples from neoplasia-free controls.

DNA Extraction

In the neoplasia-free control group, the DNA was extracted from peripheral white blood cells using extraction kit Mini Spin (Biometrix, Curitiba, PR, Brazil), according to manufacturer's instructions.

In the tumor sample group, the genomic DNA was isolated from formalin-fixed paraffin embedded samples and extracted through innuPREP DNA Mini Kit (Analytik Jena AG, Jena, Germany). All DNA samples were quantified by NanoDrop 2000® Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) at a wavelength of 260/280 nm.

Genetic Polymorphism

Genetic polymorphisms were analyzed by Polymerase Chain Reaction (PCR) followed by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis, according Jin *et al.*, 2004, with modifications.

Primer sequences were: Forward 5'-GGAATGTCTTGGGCAAATCT-3' and Reverse 5'-ACCTGAATGCTTGTGCTTTTATT-3', following the GenBank accession number NG_007490.1. The samples were amplified using 100 ng of DNA, 1X high fidelity PCR buffer [600 mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 180 mM Ammonium Sulfate], 1.5 mM MgSO₄, 0.15 μM of each primer, 0.1 mM dNTP and 1 U of Taq Platinum High Fidelity DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The PCR conditions were 5 min denaturation at 95°C, 34 cycles of 45 s at 94°C, 45 s at 59°C and 45 s at 72°C, and 10 min elongation at 72°C. PCR products (152bp) were subjected to enzymatic restriction by *HpyCH4III* (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, USA). The genotypes were GG (152 bp), GA (152 bp, 93 bp and 59 bp), AA (93 bp and 59 bp).

Amplicons sequencing

To confirm the specificity of primers, some PCR products for *TGFBR2* were purified using PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen), following manufacturer instructions. The sequencing reaction was performed using BigDye® Terminator v3.1 Cycle

Sequencing Kit (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA), 50 ng of DNA template and 5 μ M of primer (forward or reverse) in a final volume of 10 μ l. PCR conditions were as follow: 10 s at 95°C, 30 cycles of 20 s at 95°C, 20 s at 56°C and 1 min at 60°C. The amplicons were sequenced in a 24-capillary 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Statistical analysis

The case-control study for WT susceptibility was assessed using Prism 6 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), through Odds ratio (OR), adopting an estimative of the relative risk at 95% confidence intervals (CI), and Fisher's exact test. Genotypic, dominant and recessive models were tested. Correlation analysis with WT clinical outcome was analyzed by Tau-b Kendall's test using SPSS Statistics 22.0 software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). A p value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

In the present study, 35 WT patients and 123 neoplasia-free controls samples were evaluated, the age ranged from 1 to 13 years and 3 months to 18 years old, respectively.

The sequencing reaction of PCR product showed identity by comparison with GenBank accession number NG_007490.1 for *TGFBR2*, confirming primer specificity.

Electrophoretic profile of *TGFBR2* rs3087465 polymorphism is represented in Figure 1.

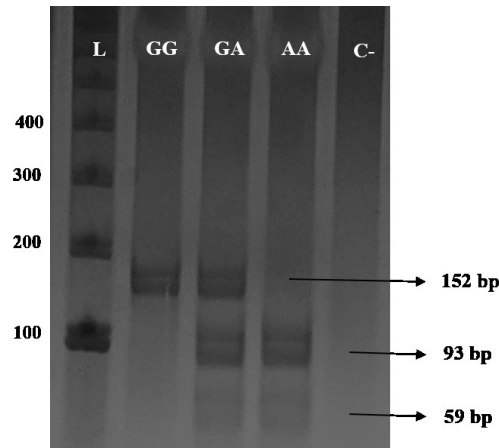


Figure 1. *TGFBR2* rs3087465 genetic polymorphism electrophoretic profile. The PCR products after enzymatic restriction were analyzed by electrophoresis on acrylamide gel (10%), detected by silver staining method. L: Ladder 100 bp; C-: no template control

Case-control association study was conducted to determine possible influence of the *TGFBR2* rs3087465 polymorphism on WT susceptibility, which indicated absence of association (Table 1).

Table 1. Genotypic frequencies and case-control study for the *TGFBR2* rs3087465 genetic polymorphism in WT and neoplasia-free patients

Genotypes	Controls n(%)	Patients n(%)	Odds Ratio	CI 95%	<i>p</i> value
GG	40 (32.5)	14 (40.0)	Reference	-	-
GA	70 (56.9)	16 (45.7)	0.658	0.292 – 1.480	0.311
AA	13 (10.6)	5 (14.3)	1.154	0.349 – 3.814	0.815
Dominant model					
GG	40 (32.5)	14 (40.0)	Reference	-	-
AA+GA	83 (67.5)	21 (60.0)	0.733	0.339 – 1.583	0.428
Recessive model					
GG+GA	110 (89.4)	30 (85.7)	Reference	-	-
AA	13 (10.6)	5 (14.3)	1.474	0.487 – 4.460	0.492

CI: confidence interval. Fisher's exact test.

In the present study, the information regarding the clinicopathological parameters related to tumor size (n=23), capsular invasion (n=19), metastasis (n=12) and lymph node involvement (n=22) were available. These parameters were evaluated in relation to genotypes and to allele A presence, as showed in Table 2 and 3. For the analysis taking into account all the genotypes of the *TGFRB2* rs3087465 polymorphism, no significant correlation was observed (Table 2

Table 2. Correlation analysis between *TGFBR1* and clinical features of WT patients.

		Genotypes			<i>p</i> value (τ value)
		GG n(%)	GA n(%)	AA n(%)	
Tumor size	≤ 8	5 (50.0)	3 (33.3)	1 (25.0)	0.313 (0.194)
	>8	5 (50.0)	6 (66.7)	3 (75.0)	
Capsular invasion	P	7 (87.5)	3 (37.5)	2 (66.7)	0.126 (-0.309)
	A	1 (12.5)	5 (62.5)	1 (33.3)	
Metastasis	P	2 (50.0)	2 (40.0)	2 (66.7)	0.722 (0.097)
	A	2 (50.0)	3 (60.0)	1 (33.3)	
Lymph node commitment	P	6 (60.0)	1 (12.5)	1 (33.3)	0.058 (-0.368)
	A	4 (40.0)	7 (87.5)	3 (66.7)	

P: presence A: Absence * $p < 0.05$

On the other hand, a negative correlation was verified between allele A carriers and lymph node commitment ($\tau = -0.449$, $p = 0.022$) and capsular invasion ($\tau = -0.430$, $p = 0.029$).

Table 3. Analysis between *TGFBR2* allele A carriers and clinical features in WT patients.

		Carriers of A allele n(%)	GG n(%)	<i>p</i> value (τ value)
		Tumor size		
	≤ 8	4 (30.8)	5 (50.0)	0.345 (-0.195)
	>8	9 (69.2)	5 (50.0)	
Capsular invasion	P	5 (45.5)	7 (87.5)	0.029* (-0.430)
	A	6 (54.5)	1 (12.5)	
Metastasis	P	4 (50.0)	2 (50.0)	1.000 (0.000)
	A	4 (50.0)	2 (50.0)	
Lymph node commitment	P	2 (16.7)	6 (60.0)	0.022* (-0.449)
	A	10 (83.3)	4 (40.0)	

P: presence A: Absence * $p < 0.05$

DISCUSSION

In this work, the samples consisted of 35 patients with a median age of 43 months, which was compatible with study from Provenzi, Rosa et al. (2015) whom evaluated 32 WT samples with a same median age at diagnosis in an Onco-Hematology Service, a reference hospital in southern Brazil.

The TGFBR2 is a transmembrane receptor serine/threonine kinase required to mediate TGF β 1 signal transduction. Alterations in *TGFBR2*, such as genetic polymorphisms, may lead to changes in receptor dynamics and consequently altering TGF β 1 actions. In the present case-control study, no association was verified for rs3087465 polymorphism and WT susceptibility (Table 1). Since this polymorphism is located in promoter gene region, it is believed that the allelic variants may lead to changes in gene expression and consequently alteration in protein expression. Seijo, Song et al. (2001) were the first to describe the association between rs3087465 A allele and increased *TGFBR2* transcription activity, but in normal epithelial cells.

Studies regarding WT and TGFBR2 are absent in the literature, however, studies with other tumors have demonstrated association of allele A of rs3087465 polymorphism with risk reduction to various neoplasms, such as gastric cancer (Xu, Zeng et al. 2011, Guo, Dong et al. 2012, Huang, Zhong et al. 2014) and Zhang, Guo et al. (2011) found that the *TGFBR2* A allele frequency was marginally higher in cancer-free female individuals than that of women with breast cancer. Furthermore, Jin, Deng et al. (2008) found an association of GA genotype with decreased risk to esophageal cancer and in a meta-analysis of the published studies of the polymorphism rs3087465 and risk of various neoplasms, Huang, Zhong et al. (2014) concluded that the research of the relationship of this polymorphism and cancer is very popular but remain conflicting at present. The meta-analysis suggested that under recessive, dominant and other genetic models, the allele A of rs3087465 polymorphism is associated with a decreased risk of cancer.

Regarding the clinical parameters, the results showed no statistically correlation with rs3087465 genotypes (Table 2). However, despite no association were verified for this polymorphism in WT, the allele A carrier demonstrated a negative correlation with lymph node involvement and capsular invasion, thus presenting a better prognosis (Table 3). Already Guo, Dong et al. (2012), in a study with 110 gastric cardia adenocarcinoma patients, verified a negative correlation of the A allele with staging III and IV for this cancer,

although no correlation between the genotypes and the protein expression was found.

In this context, Davidoff (2009) described that WT therapy and prognosis are based on tumor stage and metastasis, highlighting that the accurate staging at the time of diagnosis is imperative. Additionally, careful regional lymph node sampling is important, since nodal involvement is associated with increased incidence of tumor relapse and poorer prognosis. Thus, a negative correlation of A allele of the rs3087465 polymorphism with lymph node involvement and capsular invasion is relevant in the clinical setting.

Overall, despite the small sample size and related studies, the present work suggests that the rs3087465 polymorphism may be correlated with WT prognosis.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the volunteers who made this study possible and the Cancer Hospital of Londrina, Londrina, PR, Brazil. This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 470452/2014-5), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária, Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI) and the State University of Londrina Graduate Coordination (PROPPG- UEL). Cintya Mayumi Ishibashi was a fellow of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Brazil.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

Amarante, M. K; Oliveira, C. E. C; Ariza, C. B; Sakaguchi, A. Y; Ishibashi, C. M; Watanabe, M. A. E (2017) "The predictive value of transforming growth factor-B in Wilms tumor immunopathogenesis." International Reviews of Immunology (print).

Cone, E. B., S. S. Dalton, M. Van Noord, E. T. Tracy, H. E. Rice and J. C. Routh (2016). "Biomarkers for Wilms Tumor: A Systematic Review." J Urol **196**(5): 1530-1535.

Davidoff, A. M. (2009). "Wilms' tumor." Curr Opin Pediatr **21**(3): 357-364.

de Camargo, B., J. M. de Oliveira Ferreira, R. de Souza Reis, S. Ferman, M. de Oliveira Santos and M. S. Pombo-de-Oliveira (2011). "Socioeconomic status and the incidence of non-central nervous system childhood embryonic tumours in Brazil." BMC Cancer **11**: 160.

Derynck, R., R. J. Akhurst and A. Balmain (2001). "TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression." Nat Genet **29**(2): 117-129.

Guo, W., Z. Dong, Y. Guo, Z. Chen, Z. Yang and G. Kuang (2012). "Association of polymorphisms in transforming growth factor-beta receptors with susceptibility to gastric cardia adenocarcinoma." Mol Biol Rep **39**(4): 4301-4309.

Huang, Y. S., Y. Zhong, L. Yu and L. Wang (2014). "Association between the TGFBR2 G-875A polymorphism and cancer risk: evidence from a meta-analysis." Asian Pac J Cancer Prev **15**(20): 8705-8708.

Jin, G., Y. Deng, R. Miao, Z. Hu, Y. Zhou, Y. Tan, J. Wang, Z. Hua, W. Ding, L. Wang, W. Chen, J. Shen, X. Wang, Y. Xu and H. Shen (2008). "TGFB1 and TGFBR2 functional polymorphisms and risk of esophageal squamous cell carcinoma: a case-control analysis in a Chinese population." J Cancer Res Clin Oncol **134**(3): 345-351.

Jin, Q., K. Hemminki, E. Grzybowska, R. Klaes, M. Soderberg, H. Zientek, J. Rogozinska-Szczepka, B. Utracka-Hutka, J. Pamula, W. Pekala and A. Forsti (2004). "Polymorphisms and haplotype structures in genes for transforming growth factor beta1 and its receptors in familial and unselected breast cancers." Int J Cancer **112**(1): 94-99.

Massague, J. (2008). "TGFbeta in Cancer." Cell **134**(2): 215-230.

Maturu, P. (2016). *The Inflammatory Microenvironment in Wilms Tumors.* Wilms Tumor. M. M. van den Heuvel-Eibrink. Brisbane (AU).

Metzger, M. L. and J. S. Dome (2005). "Current therapy for Wilms' tumor." Oncologist **10**(10): 815-826.

Pritchard-Jones, K. (2002). "Controversies and advances in the management of Wilms' tumour." Arch Dis Child **87**(3): 241-244.

Provenzi, V. O., R. F. Rosa, R. C. Rosa, A. V. Roehe, P. P. dos Santos, F. R. Faulhaber, C. A. de Oliveira and P. R. Zen (2015). "[Tumor size and prognosis in patients with Wilms tumor]." Rev Paul Pediatr **33**(1): 82-87.

Royer-Pokora, B. (2013). "Genetics of pediatric renal tumors." Pediatr Nephrol **28**(1): 13-23.

Seijo, E. R., H. Song, M. A. Lynch, R. Jennings, X. Qong, E. Lazaridis, C. Muro-Cacho, C. M. Weghorst and T. Munoz-Antonia (2001). "Identification of genetic alterations in the TGFbeta type II receptor gene promoter." Mutat Res **483**(1-2): 19-26.

Xu, L., Z. Zeng, B. Chen, X. Wu, J. Yu, L. Xue, L. Tian, Y. Wang, M. Chen, J. J. Sung and P. Hu (2011). "Association between the TGFB1 -509C/T and TGFBR2 -875A/G polymorphisms and gastric cancer: a case-control study." Oncol Lett **2**(2): 371-377.

Zhang, M., L. L. Guo, Z. Cheng, R. Y. Liu, Y. Lu, Q. Qian, Z. Lei and H. T. Zhang (2011). "A functional polymorphism of TGFBR2 is associated with risk of breast cancer with ER(+), PR(+), ER(+)/PR(+) and HER2(-) expression in women." Oncol Lett **2**(4): 653-658.

5 CONCLUSÕES

ARTIGO 1

- O alelo T do polimorfismo rs1800469 da região promotora de *TGFBI* apresentou uma forte associação com TW, conferindo 8 vezes mais chance de susceptibilidade para o modelo recessivo;
- O alelo C, no modelo recessivo, do polimorfismo rs1800470 da região do peptídeo sinal também foi associado ao TW;
- Os polimorfismos da região promotora e do peptídeo sinal de *TGFBI* não foram correlacionados com os fatores de prognóstico dos pacientes com TW;
- Em concordância com os resultados dos polimorfismos individuais, a estrutura haplotípica GCTG apresentou-se como um fator de proteção para TW, enquanto a estrutura GTTG mostrou forte associação de susceptibilidade a doença, apresentando 12 vezes mais chance de desenvolvimento do tumor;

ARTIGO 2

- O polimorfismo rs3087465 da região promotora de *TGFBR2* não apresentou associação quanto a susceptibilidade ao TW;
- Foi encontrado que o portador do alelo A do polimorfismo rs3087465 de *TGFBR2* apresenta correlação negativa com os parâmetros prognósticos de invasão capsular e acometimento de linfonodos em pacientes pediátricos com TW, estando associado, assim, com o prognóstico da doença;

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dessa forma, este foi o primeiro estudo a investigar polimorfismos da citocina TGFB1 e de seu receptor II em TW, o qual apresentou através de estudos caso-controle a influência destes tanto no risco de susceptibilidade à doença, quanto no prognóstico da doença.

REFERÊNCIAS

- AIDAR, M.; LINE, S. R. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. **Braz Dent J**, v. 18, n. 2, p. 148-52, 2007.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts and Figures 2015. American Cancer Society: Atlanta: GA., 2015
- BARCELLOS-HOFF, M. H. et al. Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland. **J Clin Invest**, v. 93, n. 2, p. 892-9, 1994.
- BERNDT, S. I., et al. Transforming growth factor beta 1 (TGFB1) gene polymorphisms and risk of advanced colorectal adenoma. **Carcinogenesis**, v.28, n.9, p. 1965-1970, 2007.
- BECKWITH, J. B.; PALMER, N. F. Histopathology and prognosis of Wilms tumors: results from the First National Wilms' Tumor Study. **Cancer**, v. 41, n. 5, p. 1937-48, 1978.
- BIERIE, B.; MOSES, H. L. TGF-beta and cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 17, n. 1-2, p. 29-40, 2006.
- BLOBE, G. C.; SCHIEMANN, W. P.; LODISH, H. F. Role of transforming growth factor beta in human disease. **N Engl J Med**, v. 342, n. 18, p. 1350-8, 2000.
- BRESLOW, N. E. et al. Age distributions, birth weights, nephrogenic rests, and heterogeneity in the pathogenesis of Wilms tumor. **Pediatr Blood Cancer**, v. 47, n. 3, p. 260-7, 2006.
- BUSH, K. T. et al. TGF-beta superfamily members modulate growth, branching, shaping, and patterning of the ureteric bud. **Dev Biol**, v. 266, n. 2, p. 285-98, 2004.
- CALL, K. M. et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. **Cell**, v. 60, n. 3, p. 509-20, 1990.
- CAMBIEN, F., S. et al. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. **Hypertension**, v.28, n.5, p. 881-887, 1996.
- CHANG, H.; BROWN, C. W.; MATZUK, M. M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. **Endocr Rev**, v. 23, n. 6, p. 787-823, 2002.
- CHANG, H. Y. et al. Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 10, p. 3738-43, 2005.
- CHEIFETZ, S. et al. The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. **Cell**, v. 48, n. 3, p. 409-15, 1987.
- CHEN, F. et al. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. **BMC Med**, v. 13, p. 45, 2015.

- CHOI, Y. J. et al. Influence of TGF β 1 C-509T polymorphism on gastric cancer risk associated with TGF β 1 expression in the gastric mucosa. **Gastric Cancer**, v. 18, n. 3, p. 526-37, 2015.
- CONE, E. B. et al. Biomarkers for Wilms Tumor: A Systematic Review. **J Urol**, v. 196, n. 5, p. 1530-1535, 2016.
- DAVIDOFF, A. M. Pediatric oncology. **Semin Pediatr Surg**, v. 19, n. 3, p. 225-33, 2010.
- DAVIDOFF, A.M. Wilms tumor. **Adv Pediatr**, v. 59, n. 1, p. 247-67, 2012.
- DE CAMARGO, B. et al. Socioeconomic status and the incidence of non-central nervous system childhood embryonic tumours in Brazil. **BMC Cancer**, v. 11, p. 160, 2011.
- DOME, J. S.; COPPES, M. J. Recent advances in Wilms tumor genetics. **Curr Opin Pediatr**, v. 14, n. 1, p. 5-11, 2002.
- DOME, J. S. et al. Treatment of anaplastic histology Wilms' tumor: results from the fifth National Wilms' Tumor Study. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 15, p. 2352-8, 2006.
- DUFFNER P. K.; COHEN, M. E.; PARKER, M. S. Prospective intellectual testing in children with brain tumors. **Ann. Neurol**, v. 23, p. 575-579 1988.
- DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. **Immunity**, v.21, p. 137-148, 2004.
- DUNNING, A. M. et al. A transforming growth factor β 1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. **Cancer Res**, v. 63, n. 10, p. 2610-5, 2003.
- EGEA, P. F.; STROUD, R. M., WALTER, P. Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. **Current Opinion in Structural Biology**, v.15, p. 213-220, 2005.
- FLAVELL, R. A. et al. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF β . **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 8, p. 554-67, 2010.
- GRAINGER, D. J. et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type β 1. **Hum Mol Genet**, v. 8, n. 1, p. 93-7, 1999.
- GREEN, D. M. et al. Treatment of children with stages II to IV anaplastic Wilms' tumor: a report from the National Wilms' Tumor Study Group. **J Clin Oncol**, v. 12, n. 10, p. 2126-31, 1994.
- GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-99, 2010.
- GRONE, H. J. et al. Spatial and temporally restricted expression of chemokines and chemokine receptors in the developing human kidney. **J Am Soc Nephrol**, v. 13, n. 4, p. 957-67, 2002.

- GUO, W. et al. Association of polymorphisms in transforming growth factor-beta receptors with susceptibility to gastric cardia adenocarcinoma. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 4, p. 4301-9, 2012.
- GUO, W. et al. Polymorphisms of transforming growth factor-beta1 associated with increased risk of gastric cardia adenocarcinoma in north China. **Int J Immunogenet**, v. 38, n. 3, p. 215-24, 2011.
- HORSTER, M. F.; BRAUN, G. S.; HUBER, S. M. Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation. **Physiol Rev**, v. 79, n. 4, p. 1157-91, 1999.
- HUANG, Y. S. et al. Association between the TGFBR2 G-875A polymorphism and cancer risk: evidence from a meta-analysis. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n.20, p. 8705-8708, 2014.
- INCA (2015). "Estimativa 2016 - Incidência de câncer no Brasil." Acesso dia 18/10/2016. Disponível em < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>>
- JAVLE, M. et al. Biomarkers of TGF-beta signaling pathway and prognosis of pancreatic cancer. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e85942, 2014.
- JIN, G. et al. TGFB1 and TGFBR2 functional polymorphisms and risk of esophageal squamous cell carcinoma: a case-control analysis in a Chinese population. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 134, n. 3, p. 345-51, 2008.
- JIN, Q. et al. Polymorphisms and haplotype structures in genes for transforming growth factor beta1 and its receptors in familial and unselected breast cancers. **Int J Cancer**, v. 112, n. 1, p. 94-9, 2004.
- KAJDANIUK, D. et al. Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) in physiology and pathology. **Endokrynol Pol**, v. 64, n. 5, p. 384-96, 2013.
- KALAPURAKAL, J. A. et al. Management of Wilms' tumour: current practice and future goals. **Lancet Oncol**, v. 5, n. 1, p. 37-46, 2004.
- KIM, S. I. et al. TGF- β -activated kinase 1 is crucial in podocyte differentiation and glomerular capillary formation. **J Am Soc Nephrol**, v. 25, n. 9, p. 1966-78, 2014
- KUBICZKOVA, L. et al. TGF-beta - an excellent servant but a bad master. **J Transl Med**, v. 10, p. 183, 2012.
- LEVY, L.; HILL, C. S. Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 17, n. 1-2, p. 41-58, 2006.
- LU, J. et al. Analyzing the gene expression profile of anaplastic histology Wilms' tumor with real-time polymerase chain reaction arrays. **Cancer Cell Int**, v. 15, p. 44, 2015.

- LYONS, R. M.; KESKI-OJA, J.; MOSES, H. L. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. **J Cell Biol**, v. 106, n. 5, p. 1659-65, 1988.
- MALKIN D. Cancer of childhood. In: JR, D. V.;S, H., *et al* (Ed.). **Cancer: principles and practice of oncology**. 5th. New York: Lippincott-Raven, 1997. p.2083-2091.
- MAO, Y. et al. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 32, n. 1-2, p. 303-15, 2013.
- MASSAGUE, J. How cells read TGF-beta signals. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 1, n. 3, p. 169-78, 2000.
- MASSAGUE, J.; GOMIS, R. R. The logic of TGFbeta signaling. **FEBS Lett**, v. 580, n. 12, p. 2811-20, 2006.
- MASSAGUE, J.; SEOANE, J.; WOTTON, D. Smad transcription factors. **Genes Dev**, v. 19, n. 23, p. 2783-810, 2005.
- MATURU, P. The Inflammatory Microenvironment in Wilms Tumors. In: VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M. (Ed.). **Wilms Tumor**. Brisbane (AU), 2016.
- METZGER, M. L.; DOME, J. S. Current therapy for Wilms' tumor. **Oncologist**, v. 10, n. 10, p. 815-26, 2005.
- MONTALVAO-DE-AZEVEDO, R. et al. RFC-1 80G>A polymorphism in case-mother/control-mother dyads is associated with risk of nephroblastoma and neuroblastoma. **Genet Test Mol Biomarkers**, v. 19, n. 2, p. 75-81, 2015.
- MOSES, H. L.; ROBERTS, A. B.; DERYNCK, R. The Discovery and Early Days of TGF-beta: A Historical Perspective. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 8, n. 7, 2016.
- MU, Y.; GUDEY, S. K.; LANDSTROM, M. Non-Smad signaling pathways. **Cell Tissue Res**, v. 347, n. 1, p. 11-20, 2012.
- PARDALI, K.; MOUSTAKAS, A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1775, n. 1, p. 21-62, 2007.
- PARVANI, J. G.; TAYLOR, M. A.; SCHIEMANN, W. P. Noncanonical TGF-beta signaling during mammary tumorigenesis. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 16, n. 2, p. 127-46, 2011.
- PARVIZI, S. et al. Effects of Two Common Promoter Polymorphisms of Transforming Growth Factor-beta1 on Breast Cancer Risks in Ahvaz, West South of Iran. **Iran J Cancer Prev**, v. 9, n. 1, p. e5266, 2016.
- PIEK, E.; HELDIN, C. H.; TEN DIJKE, P. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. **FASEB J**, v. 13, n. 15, p. 2105-24, 1999.

PONIATOWSKI, L. A. et al. Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 137823, 2015.

POOJA, S. et al. Strong impact of TGF-beta1 gene polymorphisms on breast cancer risk in Indian women: a case-control and population-based study. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e75979, 2013.

POPOV, S. D.; SEBIRE, N. J.; VUJANIC, G. M. Wilms' Tumour - Histology and Differential Diagnosis. In: VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M. (Ed.). **Wilms Tumor**. Brisbane (AU), 2016.

PROVENZI, V. O., et al. Wilms tumor: experience of a hospital in southern Brazil. **Pediatr Int**, v. 56, n. 4, p. 534-540, 2014.

QUAGGIN, S. E.; KREIDBERG, J. A. Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences. **Development**, v. 135, n. 4, p. 609-20, 2008.

RAMOS-FLORES, C. et al. Polymorphisms in the genes related to angiogenesis are associated with uterine cervical cancer. **Int J Gynecol Cancer**, v. 23, n. 7, p. 1198-204, 2013.

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

RONNOV-JESSEN, L.; PETERSEN, O. W. Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. **Lab Invest**, v. 68, n. 6, p. 696-707, 1993.

ROYER-POKORA, B. Genetics of pediatric renal tumors. **Pediatr Nephrol**, v. 28, n. 1, p. 13-23, 2013.

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. 461-70, 2008.

SAXEN, L.; SARIOLA, H. Early organogenesis of the kidney. **Pediatr Nephrol**, v. 1, n. 3, p. 385-92, 1987.

SCHEDL, A. Renal abnormalities and their developmental origin. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 10, p. 791-802, 2007.

SCHMIERER, B.; HILL, C. S. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 12, p. 970-82, 2007.

SEIJO, E. R. et al. Identification of genetic alterations in the TGFbeta type II receptor gene promoter. **Mutat Res**, v. 483, n. 1-2, p. 19-26, 2001.

SELLERI, S. et al. Tumor microenvironment and the immune response. **Surg Oncol Clin N Am**, v. 16, n. 4, p. 737-53, 2007.

- SICA, A. et al. Macrophage polarization in tumour progression. **Semin Cancer Biol**, v. 18, n. 5, p. 349-55, 2008.
- SIEGEL, P. M.; MASSAGUE, J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 11, p. 807-21, 2003.
- SILVERMAN, E. S. et al. Transforming growth factor-beta1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 169, n. 2, p. 214-9, 2004.
- SIMS-LUCAS, S. et al. Redirection of renal mesenchyme to stromal and chondrocytic fates in the presence of TGF-beta2. **Differentiation**, v. 79, n. 4-5, p. 272-84, 2010.
- STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **Am J Hum Genet**, v. 68, n. 4, p. 978-89, 2001.
- SUGIYAMA, H. WT1 (Wilms' tumor gene 1): biology and cancer immunotherapy. **Jpn J Clin Oncol**, v. 40, n. 5, p. 377-87, 2010.
- SUSIANTI, H. et al. The Potential effect of G915C polymorphism in regulating TGF-beta1 transport into Endoplasmic Reticulum for cytokine production. **Bioinformation**, v. 10, n. 8, p. 487-90, 2014.
- TEN DIJKE, P.; HILL, C. S. New insights into TGF-beta-Smad signalling. **Trends Biochem Sci**, v. 29, n. 5, p. 265-73, 2004.
- VAIDYA, A.; KALE, V. P. TGF-beta signaling and its role in the regulation of hematopoietic stem cells. **Syst Synth Biol**, v. 9, n. 1-2, p. 1-10, 2015.
- WONG, K. F. et al. Risk of Adverse Health and Social Outcomes Up to 50 Years After Wilms Tumor: The British Childhood Cancer Survivor Study. **J Clin Oncol**, v. 34, n. 15, p. 1772-9, 2016.
- XU, L. et al. Association between the TGFB1 -509C/T and TGFB2 -875A/G polymorphisms and gastric cancer: a case-control study. **Oncol Lett**, v. 2, n. 2, p. 371-377, 2011.
- YAMAGUCHI, K. et al. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. **Science**, v. 270, n. 5244, p. 2008-11, 1995.
- ZHANG, L. et al. Expression of TGF-beta1 in Wilms' tumor was associated with invasiveness and disease progression. **J Pediatr Urol**, v. 10, n. 5, p. 962-8, 2014.
- ZHANG, L. et al. Transforming growth factor-beta: an important role in CD4+CD25+ regulatory T cells and immune tolerance. **Autoimmunity**, v. 39, n. 4, p. 269-76, 2006.
- ZHANG, Y. E. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. **Cell Res**, v. 19, n. 1, p. 128-39, 2009.

ZHANG, Y.E. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF-beta Family. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 18 2016.

ANEXOS**ANEXO A**

Aprovação do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina

Projeto de Pesquisa:							
Tipo	Número CAAE	Título da Pesquisa	Pesquisador Responsável	Versão	Ultima Modificação	Situação	Gestão da Pesquisa
P	17123113.4.0000.5231	Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer	Maria Angelica Ehara Watanabe	2	30/09/2013	Aprovado	

ANEXO B

Termo de consentimento livre e esclarecido



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Informações sobre a pesquisa:

Você está sendo convidado a participar, como voluntário, da pesquisa intitulada “**Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer**”, que tem por objetivo analisar determinados tipo de moléculas que podem influenciar na imunidade da paciente. Você será esclarecida(o) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Sua participação não é obrigatória e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que isso acarrete qualquer penalidade.

Procedimentos do Estudo:

Os procedimentos da pesquisa envolvem a obtenção de 5mL de sangue periférico para análise das células e moléculas do sistema imunológico. Em caso de tecido tumoral, o tecido retirado durante a cirurgia será encaminhado para análise e o restante será utilizado para a realização deste projeto.

Confidencialidade da Pesquisa

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. As amostras de sangue e tecido obtidos serão utilizadas para obtenção de DNA e RNA para a realização deste projeto. A participação no estudo não acarretará custos para você e não haverá nenhuma compensação financeira adicional. A coordenadora do projeto é a Prof^a. Dr^a Maria Angelica Ehara Watanabe, que pode ser encontrada no endereço: Rod. Celso Garcia Cid, 445, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Tel / Fax: (43) 3371-5629, como também procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371 – 2490

Pesquisador Responsável

RG:: _____

Eu, _____, RG _____, declaro que estou de acordo com as informações contidas neste documento, fui devidamente esclarecido pelo(s) pesquisador(es) dos objetivos e procedimentos da pesquisa de maneira clara e detalhada, e esclareci minhas dúvidas. Concordo em participar voluntariamente desse estudo sendo permitindo a colheita do sangue do meu filho(a) sendo que poderei tirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos no meu atendimento neste projeto.

Londrina, ____ de _____, 20

Assinatura do responsável (ou representante legal): _____