Juliana Sobral de Barros

Alterações de número de cópias genômicas em
hepatoblastomas: microarranjos genômicos e
sequenciamento de nova geração

Chromosomal copy number changes in
hepatoblastomas: genomic microarrays and next
generation sequencing

São Paulo

2019

Juliana Sobral de Barros

Alterações de número de cópias genômicas em
hepatoblastomas: microarranjos genômicos e
sequenciamento de nova geração

Chromosomal copy number changes in
hepatoblastomas: genomic microarrays and next
generation sequencing

Dissertação apresentada ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de concentração Biologia (Genética).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Victorino Krepischi

EXEMPLAR CORRIGIDO

O original encontra-se disponível no Instituto de Biociências.

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Barros, Juliana Sobral de

Alterações de número de cópias genômicas em hepatoblastomas: microarranjos genômicos e sequenciamento de nova geração / Juliana Sobral de Barros; orientadora: Ana Cristina Victorino Krepischi. - São Paulo, 2019.

136 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia evolutiva.

1. Hepatoblastoma. 2. Alteração de número de cópias. 3. Microarranjo genômico. 4. Sequenciamento de nova geração. 5. Tumor embrionário.

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia evolutiva.

COMISSÃO JULGADORA

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Victorino
Krepischi (Orientadora)

Este trabalho foi realizado com auxílios financeiros da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), concedidos à aluna (Bolsa CAPES nível mestrado - 2017/1671499) e à orientadora (FAPESP - CEPID – Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco - 2013/08028-1; 2018/21047-9).

À minha avó Dalva Costa
Aos pacientes desse estudo

AGRADECIMENTOS

À professora Dr.^a Ana Cristina Victorino Krepischi, por me acolher e me dar a oportunidade de ingressar no mestrado, agradeço imensamente pela orientação e por todos os ensinamentos, pela paciência e confiança depositadas em mim!

À professora Dr.^a Carla Rosenberg pela colaboração durante toda a realização desse projeto e pela infraestrutura oferecida. À Dr.^a Silvia Costa e a Ligia Vieira, pelos ensinamentos valiosos das técnicas utilizadas no laboratório, pela parceria, pelas conversas valiosas, pela ajuda, muito obrigada!

Aos pacientes e seus familiares que aceitaram fazer parte dessa pesquisa, sem eles esse trabalho não teria sido realizado. Meus sinceros agradecimentos.

A todos os colaboradores do projeto: Dr.^a Estela Novak, Dr. Vicente Odone-Filho, Dr.^a Silvia Regina Caminada de Toledo, Dr.^a Monica Cypriano, Dr.^a Dirce Maria Carraro, Dr.^a Isabela Werneck da Cunha e Dr.^a Cecília Maria Lima da Costa, pelo encaminhamento dos pacientes, auxílio com os dados clínicos, extração das amostras, análises histológicas e pela dedicação e atenção aos pacientes e a esse projeto, muito obrigada.

À equipe do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células tronco (CEGH-CEL), pelo suporte técnico com os dados de NGS.

Aos professores que tive a honra de ser aluna durante as disciplinas, de compartilhar o café da tarde e de discutir questões científicas e políticas: Dr.^a Angela Morgante, Dr. Paulo Otto e Dr.^a Regina Mingroni, obrigada por dividirem um pouco a experiência de vocês.

Às minhas colegas de pesquisa em tumores pediátricos: Maria Prates, Anne Barbosa e principalmente a Talita Aguiar, pelos ensinamentos, pela ajuda com experimentos e amostras, pelas recomendações de literatura, pelas explicações, discussões, pela paciência, muito obrigada meninas!

Aos colegas de pós-graduação: Darine Villela, Giovanna Tolezano, Sara Pires, Laura Lara, Felipe Galante, Vinicius Magalhães, William Bertani, Camila Martins, André Bueno e Claudia Ismania, pelos cafés, conversas, risadas, pelo auxílio nas crises existenciais e discussões enriquecedoras, pelo companheirismo, muitíssimo obrigada!

Agradeço a minha família, especialmente a minha mãe que sempre esteve ao meu lado me apoiando, não importando as circunstâncias e dificuldades. Eu não teria conseguido nem ingressar no mestrado se não fosse seu apoio e dedicação durante todos esses anos, muito obrigada mãe, te amo! Agradeço e dedico esse trabalho à minha avó e segunda mãe Dalva Costa, obrigada por tudo que fez por mim em vida, jamais te esquecerei.

Agradeço a todos os meus amigos de dentro e fora da academia, em especial aos amigos/irmãos de Londrina, pelo apoio, pelas conversas, pelo incentivo e por me acolherem em momentos difíceis, muito obrigada!

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com esse trabalho e me ajudaram durante toda a jornada até aqui, obrigada por me ajudarem a chegar onde estou.

RESUMO

O hepatoblastoma (HB) é um tumor embrionário muito raro, contudo é o tumor hepático mais comum em crianças. Os genomas dos HBs contêm poucas alterações genéticas, sendo caracterizados principalmente pela ocorrência recorrente de ganho de cromossomos e/ou braços cromossômicos inteiros; porém, a contribuição dessas alterações para a gênese do HB ainda é pouco compreendida. Alterações de número de cópias genômicas (CNAs) segmentares foram também descritas nestes tumores, restritas a regiões específicas de alguns cromossomos, algumas delas em associação a características clínicas como progressão e pior prognóstico.

O principal objetivo deste estudo foi caracterizar o padrão de CNAs em 25 HBs por análise citogenômica, utilizando hibridação genômica comparativa em microarranjos (aCGH - plataforma Agilent 180K), metodologia considerada padrão-ouro para detecção de CNAs submicroscópicas (< 4 Mb).

Com os resultados obtidos pela técnica de aCGH, os 25 tumores analisados foram separados em três categorias de acordo com seu perfil genômico: sete HBs não apresentaram alteração detectável, treze apresentaram poucas CNAs e cinco tumores apresentaram genomas com muitas CNAs (mais de seis alterações maiores do que 3 Mb), considerados complexos. Cento e vinte três CNAs foram detectadas no grupo de tumores, sendo que as CNAs mais prevalentes no grupo de HBs foram ganhos em 1q, 2/2q e 20/20p, e perdas em 1p/1pter e 4/4q.

Além disso, foi possível delimitar seis regiões cromossômicas mais comumente afetadas por CNAs na coorte (*minimum common region* – MCRs), ganhos em 1q31.3q42.3, 2q24.2q24.3 (região de amplificação) e 20p13p11.1 e perdas em 1p36.31, 4p14, 4q21.22q25. Foi possível delimitar um segmento de 5 Mb na MCR em 2q24.2q24.3, região amplificada em nossa coorte, também descrita como amplificada em diversos outros trabalhos, que sugerem que essa região deve conter genes relacionados com progressão tumoral, sendo assim promissora para identificação de possíveis oncogenes. Adicionalmente, dentro de tais regiões, a avaliação em bancos de dados indicou 17 genes (*CHD5*, *BLACAT1*, *KDM5B*, *PARP1*, *LINC00210*, *MDM4*, *CHI3L1*, *PCAT6*, *PROX1*, *UBE2T*, *DPP4*, *FAP*, *HPSE*, *LEF1*, *NFKB1*, *PTPN13* e *JAG1*) como

potencialmente relacionados à tumorigênese e/ou progressão em HB, sendo candidatos para estudos futuros de expressão gênica. Dentre tais genes, apenas dois foram previamente relacionados a HB, ambos localizados na MCR de ganho 1q31.3q42.3: *MDM4* e *PARP1*. Na coorte estudada, 11 tumores apresentaram essa MCR de ganho 1q31.3q42.3; ao analisar a estratificação de risco de tais pacientes, 10/11 eram de risco alto (6) ou intermediário (4), sendo que quatro foram a óbito. Tendo em vista o número elevado de pacientes de risco alto/intermediário nesse subgrupo de tumores, ganho de 1q31.3q42.3 pode estar associado a tumores mais agressivos.

O segundo objetivo deste trabalho foi comparar o desempenho do sequenciamento de nova geração (NGS) (exoma completo, *OneSeq* e painel *TruSight One*), em relação à técnica padrão-ouro (microarranjo genômico) para detecção de CNAs. Nossos resultados referentes a 19 HBs sequenciados mostraram alta concordância entre os dados de aCGH e NGS (~87%); a grande maioria dos casos discordantes (CNAs detectadas apenas por aCGH ou NGS) foram regiões sem cobertura em uma das plataformas (falta de sondas ou baixa cobertura vertical no sequenciamento). O tamanho mínimo detectado de CNA nos dados de NGS foi de 109 Kb em uma amostra sequenciada em exoma completo, não detectada por aCGH por falta de cobertura (sondas no segmento). Verificamos também que é possível detectar em dados de NGS CNAs em mosaico (frequência mínima do mosaico de ~10% para perdas e ~20% para ganhos) e regiões em homozigose ou cnLOH (*copy-neutral losses of heterozygosity*). Contudo, existem certas limitações inerentes aos dados de NGS produzidos com captura de regiões genômicas (exoma e painéis), como a falta de uniformidade de cobertura horizontal e distribuição irregular de exons pelo genoma, que dificultam a detecção do espectro total de CNAs e delimitação de pontos de quebra. Além disso, foi possível constatar que a profundidade do sequenciamento é um fator preponderante para a qualidade dos dados de CNAs obtidos a partir de NGS, uma vez que regiões com baixa profundidade de cobertura tem detecção ou delimitação de tamanho prejudicadas. Apesar de tais limitações, o grande potencial para obtenção de resultados acurados referentes a mutações e CNAs já possibilita a substituição dos microarranjos genômicos pelas plataformas de NGS como primeira linha de investigação genômica.

Palavras chave: hepatoblastoma, tumor embrionário, *copy number alteration*, CNA, microarranjo genômico, sequenciamento de nova geração, NGS, exoma.

ABSTRACT

Hepatoblastoma (HB) is a very rare embryonic tumor, although it is the most common liver tumor in children. HBs genomes contain few genetic alterations, being mainly characterized by the occurrence of recurrent chromosome gains and/or gains of whole-chromosome arms; However, the contribution of these changes to the genesis of HB is still poorly understood. Segmental genomic copy number alterations (CNAs) have also been described in these tumors, restricted to specific regions of some chromosomes, few of them in association with clinical features such as progression and poor prognosis.

The main aim of this study was characterizing the CNA pattern of 25 HBs by cytogenomic analysis using comparative genomic hybridization in microarrays (aCGH - Agilent 180K platform), considered the gold-standard methodology for detection of CNAs (<4 Mb).

Based on the results obtained by the aCGH technique, the 25 tumors could be classified in three categories according to their genomic profile: seven HBs showed no detectable alteration, thirteen presented few CNAs, and five tumors carried several CNAs (more than six alterations > 3 Mb), the latter considered tumors with complex genomes. One hundred and twenty-three CNAs were detected in the HB group, and the most prevalent CNAs were gains at 1q, 2/2q and 20/20p, and losses at 1p/1pter and 4/4q.

In addition, it was possible to delimit six chromosomal regions most commonly affected by CNAs in the cohort (minimum common regions - MCRs), gains located at 1q31.3q42.3, 2q24.2q24.3 (amplification), 20p13p11.1 and losses at 1p36.31, 4p14, 4q21.22q25. Moreover, it was possible to further delimit a 5 Mb segment in the MCR 2q24.2q24.3, which was an amplified region, also described as amplified in several other studies, suggesting that this region should contain genes related to tumor progression. Additionally, within such regions, *in silico* evaluation indicated 17 genes (*CHD5*, *BLACAT1*, *KDM5B*, *PARP1*, *LINC00210*, *MDM4*, *CHI3L1*, *PCAT6*, *PROX1*, *UBE2T*, *DPP4*, *FAP*, *HPSE*, *LEF1*, *NFKB1*, *PTPN13* and *JAG1*) as potentially related to tumorigenesis and/or HB progression, being candidates for future gene expression studies. Among these genes, only two of them were previously related to HB, both mapped to the MCR 1q31.3q42.3 gain: *MDM4* and *PARP1*. Eleven HBs presented this MCR

1q31.3q42.3 gain; considering clinical data, all of them but one was either high risk (6) or intermediate risk (4), including four deceased patients. Given the number of high/intermediate risk patients in this subgroup of tumors, 1q31.3q42.3 gain could be associated with more aggressive tumors.

The second aim of this work was comparing the performance of next generation sequencing (NGS) data (whole exome, *OneSeq* and *TruSight One* panel) with the gold-standard technique (genomic microarray) for CNA detection. Our results, based on 19 HBs with sequencing data, showed high rate of concordance between aCGH and NGS data (~87%); the vast majority of the discordant events (CNAs detected only by aCGH or NGS) were regions without coverage in one of the platforms (lack of probes or low vertical coverage in sequencing).

The minimum size of CNA detected in the NGS was 109 Kb in a whole-exome sequencing data, not detected by aCGH due to lack of coverage (probes in the segment). We also found that it is possible to detect mosaic CNAs in NGS data (minimum mosaic frequency of ~10% for losses and ~20% for gains), as well as homozygous regions/cnLOH (copy-neutral losses of heterozygosity). However, there are inherent limitations in NGS data produced by capturing genomic regions (exome and panels), such as the lack of uniformity of horizontal coverage and uneven distribution of exons throughout the genome, which makes it difficult to detect the full spectrum of CNAs and precise size mapping and breakpoint delimitation. Moreover, it was found that sequencing depth is a major issue for CNA detection using NGS data, since regions with low depth coverage have both impaired detection and imprecise size delimitation. Despite these limitations, the great potential for obtaining accurate results both for mutations and CNAs allows the replacement of genomic microarrays by NGS platforms as the first line of genomic research.

Key words: hepatoblastoma, embryonic tumor, copy number alteration, CNA, genomic microarray, next generation sequencing, NGS, exome.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACCCC	A.C. Camargo Cancer Center
aCGH	<i>Comparative Genomic Hybridization in microarrays</i>
AFP	α -fetoproteína
BAF	<i>B-allele frequency</i>
BWS	<i>Beckwith-Wiedemann Syndrome</i>
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CHIC	<i>Children's Hepatic Tumors International Collaboration</i>
CNA	<i>Copy Number Alteration</i>
cnLOH	<i>copy-neutral Loss of Heterozygosity</i>
CNV	<i>Copy Number Variation</i>
COSMIC	<i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer Genes</i>
FAP	<i>Familial Adenomatous Polyposis</i>
FFPE	<i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i>
FISH	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>
GRAACC	Grupo de Apoio ao Adolescente e à Criança com Câncer
HB	Hepatoblastoma
HCC	<i>Hepatocellular Carcinoma</i>
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
InDels	<i>Insertion or Deletion</i>
ITACI	Instituto de Tratamento do Câncer Infantil
Kb	Kilo bases (1.000 pares de bases)

lncRNA	<i>Long non-coding RNA</i>
LOH	<i>Loss of Heterozygosity</i>
Mb	Mega bases (1.000.000 pares de base)
MCR	<i>Minimum Common Region</i>
M-FISH	<i>Multiplex Fluorescence In Situ Hybridization</i>
mL	Mililitro
N.D	Não disponível
ng	Nanograma
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
p	Braço curto do cromossomo
PRETEXT	<i>PRE-Treatment EXTent of disease</i>
pter	Parte terminal do braço curto
q	Braço longo do cromossomo
qter	Parte terminal do braço longo
SKY	<i>Spectral Karyotype</i>
SIOPEL <i>Liver Tumor</i>	<i>Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique – Epithelial</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SNP-array	<i>Single Nucleotide Polymorphism microarray</i>
SNV	<i>Single Nucleotide Variant</i>
WES	<i>Whole Exome Sequencing</i>
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Câncer	18
1.2 Câncer Pediátrico.....	22
1.3 Tumores embrionários	25
1.4 Hepatoblastoma	26
1.5 Alterações genômicas em hepatoblastoma	31
1.6 Alterações citogenéticas em câncer e métodos de detecção de alterações de número de cópias genômicas	33
1.6.1 Da citogenética à citogenômica: microarranjos genômicos	33
1.6.2 Sequenciamento de nova geração (NGS) ou sequenciamento massivo paralelo	35
2. OBJETIVOS.....	43
2.1 Objetivo geral	43
2.2 Objetivos específicos	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 Aspectos éticos	45
3.2 Casuística	45
3.3 Hibridização genômica comparativa em microarranjo de oligonucleotídeos (aCGH).....	48
3.4 <i>Next-generation sequencing</i> (NGS)	49
3.5 Uso de SNP-array para avaliação de regiões de homozigose ou perda de heterozigose (LOH) e de achados discrepantes entre os dados de aCGH e NGS	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 Levantamento bibliográfico de estudos citogenéticos e citogenômicos em hepatoblastomas.....	55
4.2 Caracterização do perfil genômico da coorte de 25 HBs	64

4.2.1 Identificação e análise de CNAs pela técnica de aCGH	64
4.2.2 Delimitação de regiões mínimas com CNAs mais frequentes e genes candidatos	71
4.3 Detecção de CNAs utilizando dados de NGS	78
4.3.1 Dados discrepantes aCGH <i>versus</i> NGS (WES e <i>OneSeq</i>) avaliados por SNP-array	78
4.3.2. Análise de CNAs utilizando dados do painel <i>TruSight One</i>	88
4.3.3 Detecção de regiões em homozigose em dados de NGS	91
4.3.4 Detecção de CNAs em mosaico pelo NGS.....	94
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
6. CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
APÊNDICE.....	123
Apêndice 1: Descrição completa das CNAs detectadas por aCGH	123
Apêndice 2: Perfil genômico da coorte de hepatoblastomas	132
Apêndice 3: Perfil genômico da amostra HB17T	136

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Estima-se que uma em cada sete mortes no mundo é causada por câncer (*American Cancer Society*, 2015). De acordo com o documento *World Cancer Report* 2014, emitido pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), a incidência de câncer aumentou de 12,7 milhões em 2008 para 14,1 milhões em 2012 e espera-se que esta tendência se intensifique, principalmente devido ao crescimento e ao envelhecimento populacional. A previsão é de que nas próximas duas décadas o número de casos de câncer esteja em torno de 25 milhões (IARC, 2014). No Brasil, estima-se que no biênio 2018-2019 a ocorrência de novos caso de câncer seja de cerca de 1.200.000 casos (INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2017), sendo inquestionavelmente um problema mundial de saúde pública.

Câncer é um termo que se refere a um grupo heterogêneo de doenças, caracterizadas pela proliferação sem controle de células anormais, que têm o potencial de invadir tecidos vizinhos e colonizar outros sítios do organismo (metástase). Trata-se de uma doença multifatorial com elementos etiológicos diversos, que podem ser agrupados em duas grandes categorias: a ambiental e a genética. Dentre os fatores ambientais mais relevantes destacam-se patógenos (como hepatite C e HPV, por exemplo), exposição à radiação ultravioleta, agentes químicos como álcool e tabaco, além de elementos relacionados ao estilo de vida, como dieta e obesidade; já os fatores genéticos, elementos intrínsecos do indivíduo, podem ser mutações germinativas de predisposição ao câncer ou a ocorrência de mutações espontâneas em células somáticas, cruciais para o desenvolvimento tumoral. Em geral, esses fatores atuam simultaneamente de forma sinérgica e sequencial para o desenvolvimento dos tumores (*American Cancer Society*, 2018).

Fatores genéticos constitutivos (*background* genético de um indivíduo) desempenham importante papel na determinação do nível de predisposição de cada indivíduo ao desenvolvimento de certos tipos de tumor. Entretanto, apenas cerca de 5-10% de todos os casos de câncer são considerados hereditários, no sentido de estarem relacionados a mutações germinativas de alta penetrância que conferem grande aumento na susceptibilidade a determinados tipos de câncer (NGEOW; ENG, 2016). Assim, a maioria dos casos de câncer decorre primordialmente da aquisição

de mutações em células somáticas, que progressivamente alteram o equilíbrio celular e tecidual dos processos de proliferação, diferenciação e apoptose (SALETTA; POZZA; BYRNE, 2015).

Para que ocorra a transformação maligna, é necessária a aquisição de várias características e capacidades complementares, que irão permitir o crescimento do tumor e a disseminação metastática. Segundo os autores Hanahan e Weinberg (2011) o que caracteriza o câncer é um conjunto de habilidades biológicas específicas que, quando adquiridas progressivamente por uma linhagem celular, promovem a malignização em um processo de várias etapas. Tais características adquiridas no processo de malignização ficaram conhecidas como *hallmarks of cancer* e incluem: manutenção da sinalização de proliferação; inibição de supressores de crescimento; modificação do metabolismo celular; resistência à morte celular; imortalidade replicativa; indução de angiogênese; inflamação; capacidade de escape do sistema imunológico; ativação de mecanismos invasivos e metastáticos; aquisição de mutações e instabilidade genômica (**Figura 1a**). A aquisição das características mencionadas é pautada pelo conceito da existência de alterações moleculares subjacentes, resultado de alterações genéticas cumulativas em diversos genes.

Um trabalho recentemente publicado (FOUAD; AANEI, 2017) revisitou as *hallmarks* propostas por Hanahan e Weinberg, realizando uma vasta revisão de cada característica com base em trabalhos publicados recentemente. Fouad e Aanei postularam que algumas características deveriam ser condensadas, resultando em sete características derivadas das 10 inicialmente propostas, sendo elas: crescimento seletivo e vantagem proliferativa; resposta alterada ao estresse, favorecendo a sobrevivência celular e a resistência à apoptose; vascularização; invasão e metástase; alterações no metabolismo celular; modulação imunológica; e microambiente favorável (**Figura 1b**). A instabilidade genômica e o processo mutacional seriam subjacentes ao curso de transformação tumoral; de uma perspectiva evolutiva, o acúmulo de alterações genômicas ao longo da trajetória de malignização celular estaria entremeado de ciclos de seleção clonal, que resultariam na aquisição dos sete traços propostos, com o desenvolvimento total do câncer.

Figura 1: *Hallmarks of cancer*. **a)** Ilustração das 10 características do câncer propostas em 2011 por Hanahan e Weinberg. **b)** Ilustração das *hallmarks* revisitadas em 2017 por Fouad e Aanei.

Fonte: **a)** Figura adaptada de HANAHAN; WEINBERG, 2011. **b)** Figura adaptada de FOUAD; AANEI, 2017.

Portanto, o acúmulo progressivo de mutações pontuais em genes-chave de proliferação (proto-oncogenes) e de controle de ciclo celular (genes supressores de tumor), em associação à ocorrência de alterações cromossômicas, promove desequilíbrio das funções celulares normais e instabilidade genômica, facilitando o surgimento de características promotoras da tumorigênese (ANDOR; MALEY; JI, 2017). Posto isto, esse processo requer longos períodos de tempo, fator que torna o câncer uma doença de vida adulta e pós-reprodutiva, em geral. A maioria das mutações somáticas surgem em decorrência de falhas nos mecanismos de reparo do DNA em corrigir erros introduzidos durante as divisões celulares ou associados à exposição a fatores ambientais (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; PARSA, 2012), além do próprio processo de envelhecimento, no qual a eficácia dos sistemas de correção de mutações é diminuída.

Células tumorais derivadas de um mesmo tecido podem apresentar perfis morfológicos e fenotípicos distintos entre si e essas diferenças podem envolver expressão gênica, metabolismo, motilidade, proliferação e potencial metastático. Esse fenômeno, chamado de heterogeneidade tumoral, ocorre tanto entre tumores do mesmo tipo (heterogeneidade intertumoral), quanto dentro de um único tumor (heterogeneidade intratumoral) (MARUSYK; POLYAK, 2010). O conceito da heterogeneidade intertumoral é focado principalmente na subclassificação molecular de tumores baseado em seu perfil genômico e expressão de marcadores histopatológicos. Essa subclassificação molecular permitiu identificar subtipos de pacientes e direcionar terapias, abordagem aplicada com sucesso em certos tipos de câncer, como por exemplo no tratamento de leucemia mieloide crônica e de câncer de mama (LIU; DANG; WANG, 2018).

Em contrapartida, a heterogeneidade intratumoral refere-se a variações genômicas e biológicas dentro de um mesmo tumor. A plasticidade do genoma tumoral permite que alterações genômicas ocorram rapidamente durante o curso da doença e que subpopulações celulares se adaptem rapidamente a pressões do ambiente, inclusive ao estresse imposto pelos tratamentos quimioterápicos, pelo surgimento e seleção de novas alterações genômicas durante o curso da doença; dessa forma, a heterogeneidade intratumoral tem importantes implicações clínicas e tem reflexos diretos na evolução e no tratamento do câncer (MCGRANAHAN; SWANTON, 2015).

Portanto, o estudo da composição genômica dos tumores pode auxiliar não apenas a compreensão da biologia geral de um tipo específico, como também diferenciar subtipos dentro de um mesmo câncer, objetivando desvendar os mecanismos de tumorigênese e progressão e, com isso, melhorar, direcionar e personalizar terapias (SALETTA; POZZA; BYRNE, 2015).

1.2 Câncer Pediátrico

Embora o desenvolvimento de neoplasias seja um evento raro em crianças, representando cerca de 1% de todas as neoplasias diagnosticadas, o câncer é a principal causa de morte por doença entre crianças e adolescentes (0-19 anos) em países desenvolvidos (IARC, 2016). Globalmente, são diagnosticados 215.000 novos casos entre crianças de até 15 anos de idade, além de 85.000 na faixa de 15-19 anos, em média, por ano (IARC, 2016). Um levantamento realizado no Brasil revelou que o câncer foi responsável por cerca de 7% de todos os óbitos em crianças e adolescentes, correspondendo a 2-3% de todos os tumores malignos registrados no país (INCA, 2016).

Embora a taxa de sobrevivência de pacientes pediátricos com câncer seja cerca de 80% em países desenvolvidos (IARC, 2016), muitas crianças que sobrevivem ao câncer sofrem com efeitos adversos de longo prazo devido à quimioterapia citotóxica e radioterapia, incluindo problemas cardiovasculares, endócrinos e reprodutivos, perda auditiva e cânceres secundários, além das sequelas cirúrgicas (BHATIA et al., 2015).

Em comparação à população adulta, crianças são afetadas por tipos diferentes de câncer e vários destes tipos ocorrem quase que exclusivamente em crianças, alguns deles derivados, em teoria, de tecidos parcialmente indiferenciados, como os tumores embrionários (TULLA et al., 2015). Diferentemente dos cânceres que acometem crianças, os tumores predominantes na população adulta são carcinomas, sendo o câncer de mama, próstata, colorretal e pulmão/vias aéreas os mais prevalentes (FITZMAURICE et al., 2017). Os tipos principais de cânceres que acometem crianças na faixa etária entre 0-14 anos são principalmente leucemias, seguidas de tumores do sistema nervoso central e linfomas. Já na faixa etária entre 15-19 anos, os linfomas são mais prevalentes, seguido dos tumores epiteliais e

melanomas. Na **Figura 2** é possível verificar a frequência média dos tipos de cânceres pediátricos que acometem a faixa etária entre 0-19 anos.

Figura 2: Frequência dos tipos de câncer pediátrico em pacientes com idade entre 0-19 anos. Dados do SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*).

Fonte: Figura adaptada de ZHANG, J. et al, 2015.

Além da diferença de prevalência dos tipos de tumores em comparação aos adultos, o câncer pediátrico apresenta outras peculiaridades como, por exemplo, locais primários do tumor, diferentes origens histológicas e comportamento clínico, tendência de apresentar menores períodos de latência, crescimento rápido e propensão a tornar-se bastante invasivo. Por outro lado, os tumores pediátricos em geral são mais responsivos ao tratamento quimioterápico (INCA, 2016). Considerando tais diferenças, é inadequado o tratamento e manejo do câncer pediátrico a partir do que se conhece sobre tumores em adultos.

As causas do câncer infantil são estudadas há várias décadas, mas a raridade de cada tipo tumoral contribui para dificultar a identificação de etiologias. Além da

exposição à radiação de alta dose e a tratamento quimioterápico, não existem fatores de risco ambientais identificados de maneira robusta até o momento. Por outro lado, fatores de risco biológicos inerentes, como baixo ou alto peso ao nascer, idade dos pais e presença de anomalias congênitas são características consistentemente associadas ao câncer pediátrico (SPECTOR; PANKRATZ; MARCOTTE, 2015).

Um dos fatores de risco mais robustos é a presença de anomalias congênitas ao nascimento; estes casos sugerem que tumorigênese e ocorrência de anomalias congênitas poderiam ter uma base comum de desenvolvimento em alguns tipos de câncer pediátrico (DAWSON et al., 2015). Síndrome de Down e predisposição a leucemia (MATEOS et al., 2015) e síndrome de Beckwith-Wiedemann e predisposição a diversos tipos de tumores, em especial embrionários (MUSSA et al., 2016), são exemplos de associações bem documentadas e consistentes entre anomalias congênitas e câncer, indicando que genes associados a distúrbios de desenvolvimento estariam também relacionados à oncogênese, visto que muitos destes genes estão ativos durante o desenvolvimento fetal e seus efeitos podem perdurar após o nascimento (MOORE, 2009; DAWSON et al., 2015).

Com o aprimoramento das tecnologias de análise genômica, muitos grupos de pesquisa têm se dedicado a compreender os fatores genéticos associados ao câncer pediátrico, tanto no que se refere à predisposição (mutações germinativas), quanto no que tange ao genoma tumoral (mutações somáticas) (DEAN; FARMER, 2017). Mutações germinativas são variantes genéticas presentes em todas as células de um indivíduo, tendo sido herdadas, na grande maioria das vezes, dos genitores, com exceção dos casos de mutações novas. Caso a mutação esteja em um gene de predisposição a câncer, o indivíduo apresentará risco aumentado de desenvolver determinado tipo de tumor (DEAN; FARMER, 2017), associado àquele gene específico. Tais condições clínicas são responsáveis pela minoria dos cânceres pediátricos, uma vez que a predisposição genética ao câncer em crianças representaria cerca de apenas 7-8% dos casos (GRÖBNER et al., 2018). Embora a predisposição genética ao câncer compreenda apenas uma pequena parcela dos casos, a identificação de portadores de mutações germinativas é extremamente relevante, permitindo o planejamento de intervenções, que podem compreender desde aconselhamento genético familiar até prevenção, monitoramento clínico e tratamento precoce (SALETTA; POZZA; BYRNE, 2015).

Portanto, a aquisição de (epi)mutações somáticas é a causa principal de aproximadamente 90% dos casos de câncer, incluindo pediátrico (SALETTA; POZZA; BYRNE, 2015), sendo a contribuição do *background* genômico para o desenvolvimento tumoral restrita a variantes que apresentam frequência populacional mais alta (polimorfismos) e que, individualmente, conferem aumento de risco modesto, de moderado a baixo.

1.3 Tumores embrionários

Os tumores embrionários, classificados como um subtipo de câncer pediátrico, são definidos primariamente pela idade muito precoce de manifestação e pelas características histopatológicas específicas. São um grupo heterogêneo de tumores cujas células são indiferenciadas/parcialmente indiferenciadas e se assemelham aos tipos celulares encontrados nos órgãos em desenvolvimento durante a embriogênese (MARIS e DENNY, 2002; TULLA et al., 2015).

Os tumores embrionários tendem a apresentar menores períodos de latência, sendo que a idade média de diagnóstico varia de 1,5 a 3 anos de idade; além disso, exibem maior potencial invasivo que outros tipos tumorais, embora sejam tumores de bom prognóstico e responsivos ao tratamento (MARIS e DENNY, 2002). Os principais tipos de tumores embrionários são: neuroblastoma, nefroblastoma (tumor de Wilms), retinoblastoma, hepatoblastoma, blastoma pulmonar e pancreatoblastoma (GATTA et al., 2012). Os tumores embrionários são responsáveis por cerca de 20% de todos os tumores infanto-juvenis e quase nunca ocorrem em outra faixa etária (INCA, 2016).

Supõe-se que a rápida evolução tumoral, característica dos tumores pediátricos em geral e embrionários em particular, ocorra quando o tumor é derivado de células precursoras não diferenciadas ou, alternativamente, quando uma célula pré-natal já diferenciada adquire propriedades de células embrionárias, conferindo vantagem proliferativa para sobrevivência nos ambientes pré-natal e pós-natal (MARSHALL et al., 2014).

Dessa forma, diferentemente dos tumores que acometem adultos (onde o câncer surge em decorrência do acúmulo de alterações somáticas adquiridas ao longo de um período de anos), o desenvolvimento de tumores pediátricos em curta janela temporal dependeria da existência de mutações germinativas de predisposição ao desenvolvimento de câncer e/ou da ocorrência de mutações tumorigênicas altamente

penetrantes em células ainda indiferenciadas (MARSHALL et al., 2014; MARIS, 2015), provavelmente em associação a distúrbios epigenéticos.

1.4 Hepatoblastoma

O hepatoblastoma (HB) é um tumor pediátrico raro, porém é o tumor hepático primário mais comum em crianças, sendo geralmente diagnosticado nos 3 primeiros anos de vida (DEVI et al., 2014), sendo um pouco mais frequente no sexo masculino (SPECTOR; BIRCH, 2012). Tem uma incidência anual de 1,2-1,5 casos por milhão (CZAUDERNA et al., 2016), compreendendo cerca de 1% dos casos de câncer pediátrico (BELL et al., 2017). No Brasil, a média da incidência é de 1,07 casos por milhão na faixa etária de 0-14 anos (INCA, 2016).

O sinal clínico mais comum de HB é a presença de uma massa abdominal, além de fadiga, perda de apetite e anemia secundária. A ultra-sonografia abdominal geralmente revela uma grande massa no fígado, porém para realizar precisamente o diagnóstico, a tomografia computadorizada multifásica ou a ressonância magnética são mais adequadas (HIYAMA, 2014).

O HB é um tumor embrionário, tendo provavelmente origem a partir de células precursoras de hepatócitos, os hepatoblastos, que teriam sofrido alterações durante estágios de diferenciação celular, com subsequente malignização e desenvolvimento tumoral. A histologia do HB recapitula o desenvolvimento embrionário do fígado, exibindo uma combinação de padrões histológicos de diferentes estágios da diferenciação celular; por este motivo, do ponto de vista histológico, os HBs são bastante heterogêneos (CZAUDERNA et al., 2014). Os tipos histológicos encontrados mais comumente são: **epitelial**, que pode consistir de células com fenótipo fetal e/ou embrionário, e **mesenquimal**, que geralmente se apresenta com um padrão misto epitelial-mesenquimal (DEVI et al., 2014).

As células com padrão fetal (**Figura 3a**) se assemelham às células do fígado fetal pré-natal, sendo poligonais, uniformes e menores do que os hepatócitos maduros, apresentando núcleos redondos em posicionamento central e membranas nucleares bem delineadas, cromatina pontilhada (*stippled chromatin*) e nucléolos discretos (SHARMA; SUBBARAO; SAXENA, 2017). Já o padrão embrionário (**Figura 3b**) se assemelha a células do fígado com idade gestacional de 6-8 semanas, composto por células redondas ou mais comumente anguladas, com pouco

citoplasma, muitas vezes formando estruturas tubulares ou acinares ao redor de um lúmen central (SHARMA; SUBBARAO; SAXENA, 2017). Componentes embrionários são comuns em HB e geralmente ocorrem conjuntamente com o padrão fetal (ZIMMERMANN, 2016). O tipo epitelial-mesenquimal misto (**Figura 3c**) é uma variante bastante comum em HB, caracterizada pela presença de componentes mesenquimais variáveis, como estroma fibroblástico, músculo, osteóide ou cartilagem. Em alguns casos, o HB pode apresentar uma mistura de elementos heterólogos, tais como células de endoderma, neuroectoderma ou células contendo melanina, misturados com várias linhagens de células epiteliais, sendo classificado como subtipo teratóide (SHARMA; SUBBARAO; SAXENA, 2017). Um tipo histológico raro em HB, porém importante de ser mencionado por estar relacionado a agressividade tumoral e prognóstico ruim, é o HB de pequenas células indiferenciadas (**Figura 3d**), correspondendo a apenas 5% de todos os casos diagnosticados (SHARMA; SUBBARAO; SAXENA, 2017). Geralmente, este tipo histológico está associado a baixos níveis séricos do marcador α -fetoproteína (AFP) e pouca resposta à quimioterapia (CZAUDERNA et al., 2014). Contudo, embora evidências mostrem que, no geral, o prognóstico de tumores com histologia fetal seja bom e que o prognóstico de tumores indiferenciados de pequenas células seja ruim, a significância prognóstica dos subtipos histológicos não é uniforme na literatura (MEYERS et al., 2017).

A AFP é uma glicoproteína sintetizada no saco vitelínico fetal, fígado e trato gastrointestinal, com meia vida de 5-7 dias, sendo um marcador inespecífico para várias doenças e um marcador sensível de HB. Cerca de 90% dos pacientes com HB apresentam níveis aumentados de AFP, superiores a 100 ng/mL ao diagnóstico, sendo o nível sérico de AFP utilizado como marcador tumoral para HB (KOH et al., 2011; GOEDEKE et al., 2011). Cerca de 5-10% dos casos de HB apresentam níveis baixos ou normais de AFP, em geral encontrando-se em estágio avançado da doença ao diagnóstico e/ou apresentando resistência ao tratamento quimioterápico; desse modo, o nível de AFP <100 ng/mL tem sido relatado como um marcador de prognóstico ruim (CZAUDERNA et al., 2016; MEYERS et al., 2017).

Figura 3: Padrões histológicos mais comuns de Hepatoblastoma. **a)** Histologia fetal, **b)** Histologia embrionária, **c)** Histologia epitelial-mesenquimal mista, **d)** Histologia de pequenas células indiferenciadas.

Fonte: Figura adaptada de ZIMMERMANN, 2016.

A cirurgia é um fator preponderante no tratamento de HB, com indicação de ressecção completa do tumor sempre que possível, embora existam tumores irresssecáveis em função do tamanho e/ou grau de envolvimento do fígado, sendo recomendado transplante (CZAUDERNA et al., 2014). Ao longo das últimas quatro décadas, a sobrevivência global (5 anos) de pacientes com HB aumentou de aproximadamente 30% para cerca de 80%. Por volta de 1980, a cura do HB se dava somente através de ressecção cirúrgica completa do tumor; a introdução de quimioterápicos (cisplatina e doxorubicina) e a adoção da quimioterapia pré-operatória (neoadjuvante), auxiliando tanto na redução de massa tumoral, quanto na diminuição de hemorragia durante o procedimento cirúrgico, resultaram em um aumento de ressecções tumorais (HIYAMA, 2014; MEYERS et al, 2014).

Além de determinar o tipo histológico do HB e os níveis séricos de AFP do paciente, é de extrema importância avaliar a extensão do tumor, os segmentos

comprometidos e sua relação com os principais vasos hepáticos, fatores-chave para delimitar procedimentos de tratamento, como número de ciclos de quimioterapia e eventual cirurgia. Para tal, o Grupo de Estudos do Tumor do Fígado da Infância da Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica (*Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique – Epithelial Liver Tumor Study Group – SIOPEL*, recentemente renomeado *International Childhood Liver Tumors Strategy Group*) desenvolveu um protocolo de avaliação pré-operatória de sistema de estadiamento da extensão tumoral chamada PRETEXT (*Pretreatment extent of disease*), que classifica os tumores HB em quatro grupos de risco, de acordo com resultados de exames de imagem (TOWBIN et al., 2018).

Resumidamente, o sistema PRETEXT possui dois componentes de avaliação de risco: o primeiro é o grupo PRETEXT (I, II, III e IV), que descreve a extensão tumoral. O fígado é virtualmente dividido em quatro setores e a avaliação baseia-se na determinação do número de secções hepáticas contínuas sem tumores, determinando o número de secções que teriam que ser retiradas para remover completamente o tumor. O segundo componente são os fatores de anotação PRETEXT (V, P, E, F, R, C, N, M), que descrevem características associadas ao tumor, sendo elas: envolvimento vascular/veia cava inferior (V), envolvimento da veia porta hepática (P), doença extra-hepática contígua ao tumor principal do fígado (E), tumores multifocais (F), ruptura tumoral (R), envolvimento do lobo caudado (C), metástase de linfonodo (N) e metástase à distância (M); dessa forma, quanto mais anotações PRETEXT, maior é o risco do paciente. Além da importância prognóstica, a avaliação do PRETEXT é importante fator na decisão do protocolo de tratamento e do planejamento cirúrgico (TOWBIN et al., 2018).

Por ser um tumor raro, o hepatoblastoma demanda um esforço colaborativo de várias instituições médicas e grupos de pesquisa para que sua biologia tumoral possa ser melhor compreendida. Dentre essas iniciativas pode-se destacar o consorcio *Children's Hepatic tumors International Collaboration* (CHIC), que se propôs a compilar dados sobre hepatoblastomas dos principais grupos de estudo desse tumor (*Children's Oncology Group - COG*; *German Society for Pediatric Oncology and Haematology - GPOH*; *Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumors - JPLT* e *SIOPEL*), a fim de chegar a fatores de prognóstico e biologia tumoral, com o objetivo

principal de desenvolver uma abordagem global única para estratificação de risco dos pacientes (CZAUDERNA et al., 2016).

Um trabalho recentemente publicado sobre os dados compilados pelo CHIC (MEYERS et al., 2017) propôs variáveis prognósticas consideradas importantes para a sobrevida livre de eventos, além de determinar níveis de significância prognóstica, resultando em uma série de categorias de risco. Foram considerados como fatores diagnósticos importantes para a análise inicial de prognóstico: o grupo PRETEXT; metástase; idade (inferior a 3 anos, entre 3 e 7 anos e 8 anos ou mais); concentração de AFP (100 ng/mL ou menor e 101-1000 ng/mL); os fatores PRETEXT (V, P, E, F, R). Baseado nesses fatores, foram definidos como aspectos clinicamente relevantes em relação a pior prognóstico: o grupo PRETEXT IV; presença de metástase (M+); pacientes com mais de 8 anos de idade; concentração de AFP ao diagnóstico ≤ 100 ng/mL e positivo para fatores de anotação do PRETEXT. Além disso, para os pacientes com PRETEXT I e II, foi adicionada uma avaliação de ressecabilidade cirúrgica do tumor ao diagnóstico como fator para avaliação de risco. Como resultado, foram determinados quatro grupos de estratificação de risco: muito baixo, baixo, intermediário e alto.

Em relação aos fatores de risco para o desenvolvimento de HB, a prematuridade e baixo peso ao nascimento são relatados como fatores de risco com significância estatística para o desenvolvimento de HB (HIYAMA, 2014), embora os dois fatores estejam inextricavelmente ligados.

Uma fração considerável dos casos de HB (15-20%) está associada a malformações congênitas e/ou síndromes genéticas (TOMLINSON; KAPPLER, 2012; VENKATRAMANI et al., 2014), como a síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS), síndrome de Simpson-Golabi-Behmel tipo 1, síndrome de Sotos e polipose adenomatosa familiar (FAP) (SHARMA; SUBBARAO; SAXENA, 2017), causadas, respectivamente, por mutação ou deleção de genes de *imprinting* na região 11p15 (KIM et al., 2017b), mutação de perda de função no gene *GPC3* no cromossomo X (LUO; CONRAD; LIN, 2014), haploinsuficiência do gene *NSD1* em 5q35 (KATO et al., 2009) e mutações germinativas no gene *APC* (VENKATRAMANI et al., 2014; KIM et al., 2017b). Curiosamente, pelo menos trinta e nove casos de HB foram reportados em crianças com trissomia 18 (Síndrome de Edwards) (AHMAD et al., 2016; INOUE et al., 2018), sugerindo uma possível associação etiológica entre essa alteração

numérica e o desenvolvimento de HB, considerando a raridade das duas condições. Entretanto, devido à alta taxa de mortalidade nos pacientes com essa trissomia e à própria raridade da mesma, torna-se difícil estabelecer uma associação inequívoca entre as duas condições.

1.5 Alterações genômicas em hepatoblastoma

O hepatoblastoma é um tumor que carrega relativamente poucas alterações genéticas. Um estudo recente (GRÖBNER et al., 2018) revelou que o HB carrega em média cerca de apenas 0,02 mutações codificadoras por Mb em seu genoma tumoral. O único gene descrito com mutação somática recorrente em HB é o gene *CTNNB1*, codificador da β -catenina, localizado no braço curto do cromossomo 3, embora alguns poucos estudos recentes de sequenciamento de exoma tumoral tenham identificado outros genes relevantes, mutados em raros casos, tais como *NFE2L2*, *CAPRN2*, *AXIN1*, *AXIN2* e *TERT* (JIA et al., 2014; HAN, 2014; SUMAZIN et al., 2016; DONG; ZHENG; DONG, 2015).

A β -catenina é uma proteína intracelular envolvida na adesão, regulação transcricional e sinalização celular, interagindo com reguladores de sinalização (como *APC*, *AXIN1*, *AXIN2* e *NHERF1*) e reguladores epigenéticos ou transcricionais, sendo central seu papel na via de sinalização Wnt (KATOH, 2018). A via Wnt/ β -catenina regula importantes funções celulares, incluindo proliferação, diferenciação, migração, estabilidade genômica, apoptose e renovação de células-tronco, sendo um importante componente durante a embriogênese e a organogênese (PAI et al., 2017). Mutações de ganho de função no gene *CTNNB1* foram detectadas em diversos tipos de câncer (câncer de bexiga, câncer colorretal, câncer gástrico, câncer de fígado, câncer de pulmão, câncer de pâncreas, entre outros) (KATOH, 2018).

A maioria das mutações em HB são deleções intersticiais ou mutações pontuais do tipo *missense* no exon 3 do gene *CTNNB1*, mutações essas identificadas em cerca de 60-70% dos casos de HB. Assim, alterações em genes que causam anormalidades na via Wnt, incluindo *CTNNB1*, são responsáveis por até 90% das alterações genéticas nesse tipo de tumor (BELL et al., 2017).

Citogeneticamente, o HB é caracterizado por algumas anormalidades cromossômicas recorrentes, principalmente aneuploidias de ganhos e perdas de cromossomos inteiros (TOMLINSON, 2012). Alterações genéticas envolvendo ganhos

dos cromossomos 2, 8 e 20, bem como as regiões 1q, 2q, e 8q são frequentemente encontradas, além de perdas envolvendo a região 4q (ARAI et al., 2010) e o cromossomo 18, este último achado em aparente contradição com o número de casos de HB em crianças com trissomia do cromossomo 18 (TOMLINSON; KAPPLER, 2012; INOUE et al., 2018). Relatos de outras alterações citogenéticas mais raras associadas ao hepatoblastoma são provenientes de estudos com número limitado de casos e, dessa forma, o significado dessas anormalidades ainda é incerto (MA et al., 2000; TOMLINSON, 2012; WEBER et al., 2000).

A alteração cromossômica estrutural mais recorrente em hepatoblastoma foi descrita por Schneider et al (1997), sendo a translocação entre os cromossomos 1 e 4, que resulta no ganho do braço longo do cromossomo 1 e perda de braço longo do cromossomo 4 (cromossomo derivativo der(4) t(1;4)(q12;q34). A **Figura 4** mostra um cariótipo de HB com as alterações mais recorrentemente encontradas.

Figura 4: Cariótipo de um hepatoblastoma, exibindo as trissomias mais comumente encontradas (cromossomos 2, 8 e 20) neste tipo tumoral e a translocação mais recorrente der(4) t(1;4), na qual o braço longo do cromossomo 1 é translocado para o braço longo do cromossomo 4, resultando no cromossomo derivativo der(4). As setas indicam as trissomias e o cromossomo der(4).

Fonte: Figura modificada de TOMLINSON et al., 2012.

1.6 Alterações citogenéticas em câncer e métodos de detecção de alterações de número de cópias genômicas

1.6.1 Da citogenética à citogenômica: microarranjos genômicos

Uma característica fundamental da maioria dos tumores sólidos é a ocorrência de ganhos e perdas cromossômicos, parciais ou mesmo de cromossomos inteiros, em associação a rearranjos cromossômicos estruturais (ANDOR; MALEY; JI, 2017). Amplificação de oncogenes e deleção de genes supressores de tumor são eventos comuns na progressão do câncer, associados a ganhos e perdas de material genômico, respectivamente (CHO, 2011). É possível supor que segmentos com alterações recorrentes no genoma de determinado subtipo tumoral contenham oncogenes com expressão aumentada em regiões com maior número de cópias, ou genes supressores de tumor com expressão reduzida, em região de perda genômica.

Alterações de expressão gênica são frequentemente associadas à carcinogênese (BROUSTAS; LIEBERMAN, 2014) e parte dessas alterações são decorrentes da presença de alterações cromossômicas afetando genes sensíveis à dosagem (número de cópias) (DÜRRBAUM; STORCHOVÁ, 2015). Reconhecidamente, as alterações no número de cópias (*copy number alterations* - CNA) de maneira geral exercem grande influência na expressão gênica, afetando a atividade de várias vias de sinalização. Estudo realizado em carcinoma hepatocelular (ZHOU et al., 2017), por exemplo, demonstrou correlação entre os achados de número de cópias e a expressão gênica, similar aos resultados de nosso grupo em HB (RODRIGUES et al., 2014).

O estudo da citogenética de neoplasias pediátricas já resultou na identificação de genes e mecanismos cruciais para o processo oncogênico em geral, como por exemplo deleção do gene *RB1* em retinoblastoma (ORTIZ; DUNKEL, 2015) e deleção do gene *WT1* em tumores de Wilms (AL-HUSSAIN; ALI; AKHTAR, 2014). Em alguns cânceres infantis, a escolha do tratamento, bem como o prognóstico da doença são fortemente influenciados pelo padrão citogenético do genoma tumoral (IRWIN; PARK, 2015; MOLICA; MASSARO; BRECCIA, 2017). Como exemplo, alterações cromossômicas encontradas na leucemia infantil, principalmente trissomia dos cromossomos 4 e 10), estão associadas a prognóstico favorável, ao passo que a presença do cromossomo Philadelphia confere prognóstico ruim (HARRIS et al.,

1992). Outro exemplo marcante a ser mencionado é o neuroblastoma, no qual alterações cromossômicas recorrentes atuam como fatores de prognóstico, como a amplificação do oncogene *MYCN*, indicador de agressividade tumoral; adicionalmente, alterações segmentares em neuroblastomas, como deleção de 1p e 11q, identificam um subgrupo de alto risco em tumores sem amplificação de *MYCN*, assim como ganhos de 17q, sendo eventos associados a prognóstico ruim (NEWMAN; NUCHTERN, 2016).

As alterações cromossômicas de diversos tumores, incluindo HB, foram descritas inicialmente pela análise de cariótipo convencional. Atualmente, ganhos e perdas de DNA, incluindo alterações submicroscópicas, podem ser identificados por técnicas moleculares baseadas em microarranjos genômicos, como por exemplo a hibridação genômica comparativa em microarranjos (*Array Comparative Genomic Hybridization* - aCGH), técnica amplamente utilizada para análise de CNAs. A técnica de aCGH ganhou espaço de destaque particularmente no estudo de tumores sólidos, uma vez que é baseada em DNA e independe da análise de metáfases derivadas de cultura celular (CHO, 2011).

Uma outra técnica de microarranjo genômico é baseada em sondas de polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*; SNP-array), também possibilitando alta resolução para a identificação de CNA, além de fornecer informações adicionais sobre regiões em homozigose ou perda de heterozigosidade (*loss of heterozygosity* - LOH) e/ou dissomia uniparental (SONG; SHAO, 2015). A perda de heterozigosidade em genomas tumorais geralmente decorre de um processo que se inicia com deleção em heterozigose de determinado segmento genômico, com subsequente duplicação do mesmo segmento do cromossomo homólogo, resultando em número de cópias inalterado, mas em homozigose; esse tipo de alteração não é detectável pela técnica de aCGH (ETEBARI; NAVARI; PICCALUGA, 2015), mas pode ser identificado pelo SNP-array. Desde o desenvolvimento dos SNP-arrays, eles têm sido amplamente aplicados na análise de muitos tumores, incluindo por nosso grupo (COSTA et al., 2013).

Assim, análises citogenômicas de alta resolução permitem o refinamento de regiões com alteração recorrente do tipo CNA e LOH, restringindo áreas menores do genoma para identificação de genes candidatos. A identificação de alterações citogenéticas recorrentes pode oferecer uma base para a compreensão de aspectos

moleculares subjacentes a subgrupos clínicos, permitindo esclarecer mecanismos moleculares e levando à estratificação de risco. Nesse sentido, nosso grupo vem desenvolvendo diversos trabalhos em citogenômica de tumores (KREPISCHI; PEARSON; ROSENBERG, 2012; COSTA et al., 2013; SILVA et al., 2013; FIDALGO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014; TORREZAN et al., 2014; MARIANO et al., 2015; KREPISCHI et al., 2016).

1.6.2 Sequenciamento de nova geração (NGS) ou sequenciamento massivo paralelo

Há cerca de uma década, desenvolveram-se novas tecnologias de sequenciamento que foram denominadas "sequenciamento de nova geração" (NGS) ou "sequenciamento paralelo massivo". Em comparação ao sequenciamento de Sanger, o NGS permitiu um aumento massivo da quantidade de regiões e amostras sequenciadas em período de tempo muito reduzido. Este novo sequenciamento de DNA pode ser direcionado para painéis de genes ou regiões genômicas específicas (*target sequencing*) de tamanhos variáveis, todo o exoma (*whole-exome sequencing* - WES), todo o genoma (*whole-genome sequencing* - WGS), assim como existem inúmeros métodos para sequenciamento de RNA ou transcriptoma (*transcriptome sequencing* - RNAseq) (MÜLLAUER, 2017) e epigenoma (PENG; XIA; YI, 2016).

A aplicação clínica mais comum das técnicas de NGS é o estudo de doenças genéticas e genomas tumorais (ZIOGAS; KYROCHRISTOS; ROUKOS, 2017). Moléculas de DNA e RNA extraídas de tecido tumoral congelado a fresco ou mesmo de tecido fixado em formalina e embebido em parafina (FFPE) podem ser utilizadas; amostras derivadas de tecidos FFPE apresentam qualidade inferior e, conseqüentemente, levam à obtenção de dados mais restritos. O conjunto de moléculas de DNA ou RNA a ser sequenciado é chamado de "biblioteca", e tais bibliotecas podem abranger desde apenas alguns genes a todo o genoma ou transcriptoma. O sequenciamento da biblioteca produz sequências de DNA (*reads*), base a base, que serão alinhados ao genoma referência e utilizados na análise (MÜLLAUER, 2017).

O objetivo principal ao se realizar uma análise NGS é a detecção de variantes genômicas que possam ter consequências biológicas funcionais. As mutações de nucleotídeo único (*single nucleotide variant* - SNV) e InDels (pequenas inserções e

deleções – por convenção < 1 Kb) são o foco principal na análise dos dados NGS, sendo também muito prevalentes no genoma tumoral (PLEASANCE et al., 2010). Entretanto, os dados do sequenciamento de genomas, exomas e painéis genômicos carregam o potencial de produzir informação não apenas acerca de mutações de ponto, mas também propiciam uma nova abordagem para a identificação de CNAs e rearranjos estruturais (NORD et al., 2011; ALKAN et al., 2009; CAMPBELL et al., 2008). Portanto, seu uso tem despertado extremo interesse no cenário de pesquisa e também de diagnóstico, uma vez que sua aplicação como teste único evitaria a necessidade de estudos com microarranjos genômicos (LONIGRO et al., 2011).

Células tumorais apresentam translocações, inversões, aneuploidias e CNAs, como já discutido anteriormente. Inúmeros estudos recentes têm explorado os dados derivados de NGS para a identificação de tais alterações (LONIGRO et al., 2011; VALDÉS-MAS et al., 2012; WANG et al., 2015).

A detecção de CNAs baseada em microarranjo genômico ainda é considerada o padrão-ouro de análise, em decorrência do fato de que as tecnologias de microarranjo foram aperfeiçoadas durante um longo período, bem como as estratégias de análise de tais dados para detecção robusta de CNAs. A detecção de CNAs a partir de dados de NGS não é ainda uma tarefa corriqueira, em parte devido à enorme quantidade de dados e decorrente complexidade no processamento e análise (LIU et al., 2013).

O WES tem se tornado uma plataforma cada vez mais popular para o estudo genômico de tumores, especialmente pela vantajosa relação de custo-benefício e interpretação rápida de mutações em regiões codificadoras; além disso, estudos tem demonstrado que o WES pode ser usado de forma robusta para detecção de CNAs (KOBOLDT et al., 2012; RENNERT et al., 2016; KIM et al., 2017a). Contudo, uma importante limitação no que tange à detecção de CNAs por WES é o fato de que as plataformas de exoma disponíveis comercialmente utilizam a construção de bibliotecas baseadas apenas em regiões exônicas, sem sequenciamento de regiões genômicas sem genes (a grande maioria do genoma), produzindo *reads* referentes a apenas 1-2% do genoma humano. Essa falta de uniformidade de cobertura horizontal, devido à estrutura inerente ao WES e pelo fato dos exons estarem distribuídos irregularmente pelo genoma, torna a detecção do espectro total de CNAs e pontos de

quebra, principalmente envolvendo regiões intergênicas, difícil de ser completamente caracterizado (ZHAO et al., 2013; WANG et al., 2015).

Uma exceção a esse cenário é a plataforma *OneSeq* da *Agilent*, que contém exoma clínico complementado com sondas para detecção de CNA em todo o genoma (*backbone*), possibilitando a análise de CNAs e mutações de maneira robusta em um único ensaio. Segundo a *Agilent Technologies*, a plataforma *OneSeq* permite a detecção combinada de CNAs e mutações pontuais, com uma resolução efetiva para detecção de CNAs de ~300 Kb ao longo do genoma e com resolução maior (25-50 Kb) em regiões contendo genes já associados a doenças.

Alguns estudos foram realizados para comparar o desempenho de NGS com as técnicas de microarrays genômicos para detecção de CNAs. Um estudo realizado em leucemia linfocítica crônica (VALDÉS-MAS et al., 2012) comparou os resultados de CNAs detectadas por WES e aCGH, encontrando correlação alta entre os achados, sendo que mais de 86% das CNAs detectadas no exoma foram validadas nos dados de aCGH. Outro estudo comparando as duas tecnologias foi realizado em câncer de próstata (LONIGRO et al., 2011), no qual houve forte concordância entre os achados de CNAs das duas abordagens; além disso, examinando CNAs de regiões já conhecidas no câncer de próstata, uma amplificação focal detectada por ambas as tecnologias teve a amplitude da variação no número de cópias estimada em valores muito próximos (4,5 cópias pelo aCGH e 4,57 cópias pelo exoma), revelando também concordância na avaliação do número relativo de cópias do segmento. Porém, outros estudos reportaram baixa concordância entre os achados (YAO et al., 2017), além da porcentagem de concordância variar a depender da ferramenta ou algoritmo de análise utilizados (KIM et al., 2017a). Esse cenário indica que estudos adicionais precisam ser realizados para a transição robusta de microarranjos genômicos para NGS na detecção de CNAs.

Já a metodologia de WGS, além de detectar mutações pontuais e InDels por todo o genoma, oferece o potencial para caracterizar CNAs com maior precisão, fornecendo informações sobre posição e orientação da alteração, possibilitando a identificação exata dos pontos de quebra, e assim, fornecendo informações sobre os mecanismos pelos quais tais alterações estruturais foram formadas. A interpretação dos dados de CNA também pode ser estendida, possibilitando a análise de sequências gênicas não codificantes, como, por exemplo; promotores, regiões não

traduzidas e sequências intrônicas, tornando o WGS um teste genético completo, que combina a detecção de todos os tipos de variantes genômicas e oferece a possibilidade de interpretar essas variantes dentro de seu contexto genômico (HEHIR-KWA; PFUNDT; A VELTMAN, 2015). Entretanto, apesar da maior precisão de detecção de CNA, o custo do WGS é muito maior do que o do WES, além dos dados gerados por WES serem mais facilmente interpretáveis (WANG et al., 2015).

Muitos métodos podem ser aplicados para a identificação de CNA e outros rearranjos cromossômicos utilizando dados de NGS, sendo esses métodos categorizados em cinco diferentes estratégias (**Figura 5**):

a) *paired-end mapping* (PEM), detecta CNAs por meio da identificação de *reads* mapeadas de forma discordante; um mapeamento discordante é produzido se a distância entre duas extremidades de um par de *reads* for significativamente diferente do tamanho médio predeterminado. Essa estratégia pode identificar eficientemente não apenas inserções e deleções, mas também inserções de elementos móveis, inversões e duplicações em série (ZHAO et al., 2013).

b) *split read* (SR), utiliza leitura incompleta de *reads* mapeadas de cada par para identificar pequenas CNAs. Esse método é baseado em pares de *reads*, onde uma das *reads* de cada par é alinhada ao genoma referência, enquanto a outra *read* pode não alinhar na mesma região ou alinhar apenas parcialmente; tais leituras não mapeadas ou parcialmente mapeadas potencialmente fornecem pontos de quebra precisos ao nível de um único nucleotídeo. Os métodos SR dividem as leituras incompletamente mapeadas em vários fragmentos, o primeiro e o último fragmentos de cada divisão são então alinhados ao genoma de referência independentemente, uma etapa chamada de remapeamento que forneceria as posições genômicas exatas de início e fim dos eventos de inserção/deleção (ZHAO et al., 2013).

Embora os métodos baseados em PEM sejam eficazes na detecção de duplicações, deleções e inversões e os métodos baseados em SR ofereçam maior precisão em relação aos pontos de quebra, esses métodos dependem de *reads* emparelhadas (*paired-end reads*) abrangendo toda a região da CNA ou *reads* mapeadas de forma abrangente através de todo o ponto de quebra da CNA para detecção precisa da alteração. Como o tamanho da maioria das regiões exônicas é pequeno, geralmente em torno de 100-300 pares de bases, a detecção de CNAs

através de dados de WES com esses métodos é mais desafiadora do que utilizando dados de WGS (TAN et al., 2014).

c) *read depth* (RD), métodos baseados na profundidade ou cobertura vertical das *reads* (*read depth*), se tornaram uma abordagem importante para estimar CNAs. Esses métodos assumem que a profundidade da cobertura em uma região genômica estaria correlacionada com o número de cópias dessa região; por exemplo, um ganho de número de cópias deve resultar numa maior profundidade de cobertura (número maior de reads) do que o esperado para aquele segmento. Em comparação com as ferramentas baseadas em PEM e SR, os métodos baseados em RD podem detectar CNAs mais precisamente, já que os métodos PEM/SR usam apenas as informações de posição. Além disso, métodos baseados em RD podem detectar grandes inserções e CNAs em regiões genômicas complexas, que são difíceis de detectar usando os métodos PEM e SR. Adicionalmente, este em geral é o método de escolha para detecção de CNAs a partir de dados de exoma pelos motivos já discutidos acima, sendo dependente de alta cobertura para melhor desempenho (ZHAO et al., 2013).

d) *de novo assembly of a genome* (AS); nessa metodologia, primeiro se reconstrói fragmentos de DNA (*contigs*) a partir de *reads* curtas, montando leituras de sobreposição. Ao comparar os *contigs* reunidos ao genoma de referência, regiões com número de cópias discordantes podem ser identificados (ZHAO et al., 2013).

e) combinação de abordagens (CB); nenhuma das 4 abordagens isoladamente é capaz de detectar todo o espectro de CNAs com alta sensibilidade e especificidade. Para superar as limitações inerentes às demais abordagens e aproveitar as vantagens dos diferentes tipos de métodos, várias ferramentas foram desenvolvidas tentando integrar as diferentes abordagens, como por exemplo, reunir informações de RD e PEM para detectar CNAs, visando aumentar o desempenho na detecção de CNAs e reduzir falsos-positivos (ZHAO et al., 2013).

Vale ressaltar que a maioria das ferramentas baseadas em PEM, SR e CB não são específicas para detecção de CNA, mas sim para identificação de alterações estruturais, enquanto a maioria das ferramentas baseadas em RD e AS são desenvolvidas especificamente para a detecção de CNAs. Além disso, devido à natureza não contígua dos exons, os métodos de chamada CNA existentes baseados em WGS não podem ser aplicados com sucesso aos dados de exoma, até o momento,

somente a abordagem de RD foi integrada com sucesso para chamada de CNA em WES (TAN et al., 2014).

Figura 5: Cinco diferentes abordagens para detecção de CNAs a partir de dados de NGS. **a)** *Paired-end mapping* (PEM); **b)** *Split read* (SR); **c)** *Read depth* (RD); **d)** *de novo assembly of a genome* (AS); **e)** combinação de abordagens (CB).

Fonte: Figura retirada de ZHAO et al., 2013.

Diferentemente do WGS, os dados de WES em geral são gerados com maior profundidade de *reads* nas regiões alvo, o que é ideal para detecção de CNAs usando a abordagem de *Read Depth*. Para acompanhar o fluxo de dados do WES, muitas ferramentas baseadas em *Read Depth* para detecção de CNA foram já desenvolvidas, sendo algumas delas: CoNIFER, que utiliza um algoritmo de decomposição de valor singular para normalizar o número de cópias, evitando a polarização de resultados

(*bias*), integrando várias amostras;XHMM (*eXome-Hidden Markov Model*), algoritmo que calcula a abrangência de cobertura do exoma, filtra os dados de cobertura com base no conteúdo GC, normaliza a cobertura e usa os valores normalizados para estimar estatisticamente CNAs; ExomeCNV, que utiliza a profundidade das *reads* em associação à frequência alélica para detectar CNAs e LOHs; CONTRA, que compara as razões logarítmicas calculadas a partir da profundidade das *reads* de amostras de interesse com controles; VarScan2, que usa comparações pareadas de profundidade de *reads*, com normalização em cada posição exônica para estimar CNA (ZHAO et al., 2013; FROMER; PURCELL, 2014).

Nosso grupo realizou estudo recente (VILLELA et al., 2017) para comparar microarranjos genômicos e NGS para detecção de CNAs utilizando a plataforma *OneSeq* (*Agilent Technologies*); os resultados mostraram que todas as alterações previamente identificadas com microarranjos (tamanhos entre 23 Kb - 27 Mb) puderam ser identificadas com os dados de NGS-OneSeq, com estimativa de tamanho bastante similar. Portanto, dados de NGS, incluindo derivados de outras plataformas que não genoma completo, podem em princípio detectar CNAs com resolução e sensibilidade similar aos microarranjos genômicos, além de permitir a detecção simultânea de mutações de ponto e InDels.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o perfil de alterações de número de cópias genômicas (CNAs) em uma coorte de hepatoblastomas para identificação de regiões e genes relevantes para sua biologia e comparação de duas abordagens metodológicas diferentes para detecção de CNAs (aCGH e NGS).

2.2 Objetivos específicos

- Revisão detalhada da literatura acerca das alterações cromossômicas já identificadas em hepatoblastomas por citogenética clássica e citogenômica.
- Delinear o perfil de CNAs de uma coorte de 25 hepatoblastomas utilizando microarranjos genômicos.
- Delimitar regiões cromossômicas mínimas alteradas de maneira recorrente na coorte de HB para eventual identificação de oncogenes e supressores tumorais.
- Avaliar o uso de diferentes tipos de plataformas de sequenciamento paralelo massivo para detecção de CNAs, mosaico e regiões com ausência de heterozigose em comparação à técnica padrão-ouro de microarranjo genômico.
- Investigar eventuais dados discrepantes entre aCGH e NGS utilizando a técnica de SNP-array de alta resolução.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O estudo foi realizado em parceria com três grandes grupos médicos de hospitais de câncer infantil, A. C. Camargo Cancer Center (chefiado pela Dra. Cecília Maria Lima da Costa), GRAACC (colaboração com Dra. Silvia Regina Caminada de Toledo e Dra. Monica Cypriano) e ITACI - Instituto de Tratamento do Câncer Infantil (chefiado pelo Dr. Vicente Odone). A inclusão dos pacientes e respectivas amostras encaminhadas por estes grupos colaboradores ocorreu por meio de projetos previamente aprovados nos comitês de ética em pesquisa das respectivas instituições (Hospital das Clínicas da FMUSP, CAAE 47277115.0.0000.0068; Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente – AC Camargo Câncer Center, 1987/14). Os pais ou responsáveis legais pelos pacientes participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, para posterior coleta de dados familiares, clínicos e amostras biológicas.

3.2 Casuística

Este estudo tem caráter retrospectivo. O material biológico utilizado havia sido previamente coletado e armazenado a partir de projetos anteriores do grupo em estudos genômicos de hepatoblastomas (Tese de RODRIGUES, T., 2015; Tese de AGUIAR, T., 2019). Foram utilizadas amostras de DNA extraídas de tecido congelado de tumor e fígado pareado não-tumoral (“borda”), sendo obtidas mediante requisição aos Biobancos do A.C.Camargo Cancer Center, GRAACC e ITACI.

A análise histológica para confirmação de diagnóstico e identificação dos tipos histológicos de cada tumor foi realizada pelos centros de referência de acordo com a rotina de cada instituição, bem como o encaminhamento dos dados clínicos de cada paciente, recuperados dos respectivos prontuários médicos.

A coorte de HB estudada no presente projeto é constituída por 25 tumores. A **Tabela 1** exhibe os dados clínicos mais relevantes de cada paciente e características do respectivo tumor.

HB40T	1 ano e 10 meses	M	GRAACC	Epitelial embrionário e fetal	1.842,6	Não	Baixo	Não	>6 anos
HB41T	1 anos e 9 meses	M	GRAACC	Epitelial embrionário e fetal	201.733	Pulmonar	Alto	Não	>5 anos
HB42T	3 anos e 9 meses	M	GRAACC	Epitelial fetal	1.267	Não	Baixo	Não	>14 anos
HB43T	1 ano e 8 meses	M	GRAACC	Epitelial embrionário	183.476	Não	Intermediário	Não	>7 anos
HB44T	5 meses	M	GRAACC	Epitelial e mesenquimal misto	>30.000	Não	Intermediário	Não	>8 anos
HB45T	5 meses	F	GRAACC	Epitelial fetal	445.611	Não	Baixo	Sim	1 ano e 1 mês
HB46T	2 anos e 4 meses	M	ACCCC	Epitelial e mesenquimal misto	>200.000	Pulmonar	Alto	Não	>9 meses
HB66T	10 meses	M	ACCCC	Epitelial embrionário e fetal	409.596	Pulmonar	Alto	Sim	1 ano e 3 meses
HB70T	6 anos	F	ITACI	Epitelial fetal	46.809	Pulmonar	Alto	Sim	20 meses
HB79T	1 ano e 7 meses	M	ITACI	Epitelial fetal	>50000	Não	Alto	Não	>8 meses
HB81T	1 ano e 8 meses	M	ITACI	Epitelial e mesenquimal misto	>100.000	Pulmonar	Alto	Não	>1 ano

Legenda: M = Masculino; F = Feminino; ACCCC = A.C. Camargo Cancer Center; ITACI = Instituto de Tratamento do Câncer Infantil; N.D = Não disponível.

*Amostras publicadas por RODRIGUES et al., 2014; porém reavaliadas nessa dissertação com outros critérios.

** MEYERS et al., 2017

3.3 Hibridização genômica comparativa em microarranjo de oligonucleotídeos (aCGH)

Para a identificação primária de CNA foi utilizada a técnica padrão-ouro, aCGH, que permite a detecção de variações no número de cópias de segmentos de DNA da amostra-teste em relação a uma amostra-referência.

Todas as 25 amostras foram testadas utilizando plataforma de *oligoarray* da *Agilent Technologies*, contendo 180.000 sondas (180K), seguindo protocolo já estabelecido há anos no Laboratório de Genética Humana do IBUSP. O protocolo consistiu na utilização de DNA extraído da amostra de interesse (tumor) e de um DNA controle marcados com diferentes fluorocromos, cianina 3 (Cy3) e cianina 5 (Cy5) respectivamente. Após a marcação, as amostras foram co-hibridadas em uma lâmina de *array*, contendo sondas (oligonucleotídeos) representativas de todo o genoma humano, nas quais o DNA teste e o DNA controle hibridizaram competitivamente. Posteriormente à fase de hibridização e lavagem, a intensidade da fluorescência de cada sonda foi lida pelo *scanner* de *microarray* da *Agilent Technologies* e imagens dos microarranjos foram obtidas pelo software *SureScan High Resolution* (*Agilent Technologies*). Os sinais de fluorescência foram medidos quantitativamente e extraídos utilizando o software *Feature Extraction* (*Agilent Technologies*).

Os dados gerados foram analisados para detecção de CNAs utilizando o programa *Nexus Copy Number 9.0* (*BioDiscovery*), utilizando o algoritmo *FASST2 Segmentation*, baseado em *Hidden Markov Model*. Os dados de cada sonda são plotados ao longo dos cromossomos em um gráfico, dependendo da sua localização genômica e intensidade de fluorescência. Na análise, foram consideradas apenas alterações que eram compostas por no mínimo três sondas consecutivas e com a razão entre teste/controle em $\log_2$ de $\geq 0,1$ para ganhos e $\leq -0,1$ para perdas; este critério foi selecionado para permitir a detecção de alterações em mosaico. Alterações com $\log_2$ da razão entre teste/controle acima de 1,2 foram consideradas como amplificações (número de cópias superior a 3) e abaixo de -1,2 foram consideradas como perdas em homozigose.

Durante a análise, foram desconsideradas variantes de número de cópias frequentes na população (CNVs), descritas em três ou mais estudos feitos em população controle depositados no banco de dados *Database of Genomic Variants* – DGV (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>). A anotação do genoma humano utilizada foi

a GRCh37/hg19 do *Genome Browser da University of California Santa Cruz - UCSC* (<https://genome.ucsc.edu/>).

3.4 Next-generation sequencing (NGS)

Os dados de sequenciamento de exoma e painel utilizados para detecção de CNAs foram obtidos de projetos anteriores do nosso grupo (Tese de RODRIGUES, T., 2015; Tese de AGUIAR, T., 2019). Diferentes plataformas de sequenciamento foram testadas quanto à reprodutibilidade dos dados e à detecção de CNAs em comparação aos dados do aCGH. Na **Tabela 2** é possível verificar as plataformas de NGS utilizadas para cada amostra.

O sequenciamento de exoma foi realizando em nove amostras, seis delas sequenciadas pela empresa *Oxford Gene Technologies* utilizando a plataforma *244k Agilent SureSelect Target Enrichment - kit TruSeq V3 chemistry (Agilent Technologies)* e três sequenciadas no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP), sendo duas com a plataforma *SureSelect Human All Exon V6 (Agilent Technologies)* e uma com a plataforma *xGen Exome Research Panel v1.0 (Integrated DNA Technologies - IDT)*. Também foram analisados dados provenientes de sequenciamento de painéis, sendo cinco amostras obtidas com o painel *OneSeq (Agilent Technologies)* e outras seis amostras com o painel *TruSight One (Illumina)*; as bibliotecas desses exomas e painéis foram construídas pela Dra. Silvia Souza da Costa e as corridas foram realizadas no CEGH-CEL do IBUSP.

OneSeq (Agilent Technologies) é um produto que permite analisar o genoma inteiro em relação a alteração no número de cópias e perdas de heterozigose neutras em relação ao número de cópias (*copy-neutral losses of heterozygosity - cnLOH*), além de simultaneamente detectar mutações pontuais e *indels* em regiões específicas de interesse. Cada biblioteca de captura do *OneSeq* inclui dois componentes: *Backbone* para identificação de CNAs e *Targeted design* para a identificação de mutações e *indels*. A plataforma escolhida para sequenciamento das amostras foi o *OneSeq Constitutional Research Panel*, com design de *backbone* de 300 kb de alta resolução, com maior resolução (25-50 kb) em regiões associadas à doença (ClinGen), e resolução de 5 Mb para cnLOH. O *Targeted design* foi o *Agilent*

SureSelect Focused Exome Panel, que enriquece regiões associadas a doenças conhecidas, identificadas pelos bancos de dados HGMD, OMIM e ClinVar.

O *TruSight One Sequencing Panel (Illumina)* apresenta cobertura abrangente de mais de 4800 genes clinicamente relevantes, com um conjunto de sondas projetadas para enriquecer aproximadamente 62.000 exons.

A análise de CNA a partir de dados de NGS foi realizada no programa *Nexus Copy Number 9.0 (BioDiscovery)*. A metodologia de detecção de CNA do programa se baseia na utilização um arquivo de referência criado pelo software *MultiScale BAM Reference Builder (BioDiscovery)* a partir de arquivos BAM de um conjunto mínimo de 6 amostras controle obtidas pela mesma plataforma de sequenciamento, sendo opcional o uso do arquivo BED (arquivo que contém informações referentes aos intervalos genômicos das regiões alvos do sequenciamento, como os genes alvo e posição inicial/final das regiões genômicas das sondas), que é único para cada plataforma de sequenciamento utilizada. Dessa forma, foram criados cinco arquivos de referência relativos a cada plataforma de sequenciamento utilizada nesse trabalho. Foram testadas ambas as abordagens, a utilização de referências feitas com e sem o arquivo BED, a fim de avaliar qual seria a melhor opção para detecção de CNAs.

A referência criada no programa Nexus é então comparada com a amostra teste pelo algoritmo selecionado para detecção de CNA. O algoritmo utilizado neste estudo para análise foi *SNP-FASST2 Segmentation*, baseado em *Hidden Markov Model*. Foram consideradas apenas alterações compostas por no mínimo dez sondas consecutivas e com a razão entre teste/controle em $\log_2$ de $\geq 0,1$ para ganhos e $\leq -0,1$ para perdas (consideradas CNAs em mosaico). Alterações com $\log_2$ da razão entre teste/controle acima de 1,2 foram consideradas como amplificações e abaixo de -1,2 foram consideradas com perdas em homozigose. Assim como na análise dos dados de aCGH, foram desconsideradas CNVs populacionais.

Para chamada de regiões em homozigose ou de perda de heterozigose (*copy neutral loss of heterozygosity - cnLOH*), consideramos apenas segmentos genômicos com tamanho mínimo de 10 Mb.

Tabela 2: Experimentos realizados nas amostras tumorais estudadas.

ID	aCGH	NGS	SNP-array
HB15T	Agilent 180K	Agilent OneSeq	Illumina CytoSNP-850K
HB16T	Agilent 180K	244k Agilent SureSelect V3	-
HB17T	Agilent 180K	244k Agilent SureSelect V3	Illumina CytoSNP-850K
HB18T	Agilent 180K	244k Agilent SureSelect V3	-
HB28T	Agilent 180K	244k Agilent SureSelect V3	-
HB30T	Agilent 180K	Agilent OneSeq	Illumina CytoSNP-850K
HB31T	Agilent 180K	Agilent OneSeq	Illumina CytoSNP-850K
HB32T	Agilent 180K	244k Agilent SureSelect V3	-
HB33T	Agilent 180K	244k Agilent SureSelect V3/ Agilent OneSeq	Illumina CytoSNP-850K
HB34T	Agilent 180K	-	-
HB35T	Agilent 180K	Illumina TruSight One	-
HB36T	Agilent 180K	-	-
HB38T	Agilent 180K	Illumina TruSight One	-
HB39T	Agilent 180K	Illumina TruSight One	-
HB40T	Agilent 180K	Illumina TruSight One	-
HB41T	Agilent 180K	Illumina TruSight One	-
HB42T	Agilent 180K	-	-
HB43T	Agilent 180K	-	-
HB44T	Agilent 180K	-	-
HB45T	Agilent 180K	Illumina TruSight One	-
HB46T	Agilent 180K	Agilent SureSelect Human All Exon V6	Illumina CytoSNP-850K
HB66T	Agilent 180K	Agilent OneSeq	-
HB70T	Agilent 180K	-	-
HB79T	Agilent 180K	IDT xGen Exome Research Panel v1.0	Illumina CytoSNP-850K
HB81T	Agilent 180K	Agilent SureSelect Human All Exon V6	Illumina CytoSNP-850K

3.5 Uso de SNP-array para avaliação de regiões de homozigose ou perda de heterozigose (LOH) e de achados discrepantes entre os dados de aCGH e NGS

Alguns achados discrepantes entre os dados de aCGH e de NGS foram avaliados utilizando SNP-arrays; da mesma forma, as regiões de LOH detectadas por NGS foram validadas por SNP-array. No total, 6 amostras (HB15T, HB17T, HB30T, HB31T, HB33T, HB46T) apresentaram dados discrepantes e foram avaliadas. Outras duas amostras (HB79T e HB81T) também foram avaliadas por SNP-array.

Nesse método, o DNA do paciente é marcado com fluorocromo e hibridado em uma lâmina de microarranjo contendo micropoços com oligonucleotídeos específicos, representando alelos diferentes (A ou B) para um *locus* específico do genoma. Após a hibridação, a lâmina é lida por um *scanner* que mede a intensidade de fluorescência para cada *locus*. Um *locus* heterozigoto terá intensidade igual para os dois alelos (A e B), para os *loci* homozigotos a intensidade será predominante de acordo com o alelo presente (AA ou BB). A informação gerada pelas intensidades de fluorescência dos alelos fornece um dado de frequência alélica, conhecido como frequência do alelo B (*B-allele frequency* – BAF), e com essa informação é possível determinar, por exemplo, regiões com LOH.

Para obtenção de informações acerca do número de cópias, o *software* compara *in silico* os dados gerados com um arquivo de referência, posteriormente plotando cada sonda ao longo dos cromossomos dependendo da sua localização genômica e intensidade de fluorescência.

A plataforma utilizada foi a *CytoSNP-850K BeadChip (Illumina)*, que contém aproximadamente 850.000 SNPs (850K) abrangendo todo o genoma, com cobertura de alta densidade em 3.300 regiões genômicas de relevância citogenética conhecida, baseadas em atualizações da Colaboração Internacional para Genômica Clínica (*International Collaboration for Clinical Genomics* - ICGG), do Consórcio de Microarranjos de Câncer Citogenético (*Cancer Cytogenetics Microarray Consortium* - CCMC) e da lista de genes de câncer COSMIC. Também inclui cobertura de alta densidade de regiões subteloméricas, regiões pericentroméricas e cromossomos sexuais.

Após o procedimento de marcação, hibridação e lavagem, realizadas de acordo com o fabricante, as lâminas foram escaneadas utilizando o programa *iScan System (Illumina)*, no qual foram gerados arquivos .gtc, Estes arquivos foram analisados

utilizando o programa *BlueFuse Multi Software v3.2 (Illumina)*. Posteriormente, um arquivo .txt foi gerado para que esses dados fossem também carregados no programa *Nexus Copy Number 9.0 (BioDiscovery)* a fim de manter todas as análises em um único programa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Levantamento bibliográfico de estudos citogenéticos e citogenômicos em hepatoblastomas

Até o presente momento, cerca de 50 trabalhos foram publicados com dados de HB relatando alterações cromossômicas numéricas e estruturais, totalizando em torno de 500 tumores caracterizados em um período de aproximadamente 30 anos. A tabela a seguir (**Tabela 3**) descreve a revisão de literatura realizada a cerca dos estudos citogenéticos e citogenômicos em HB, incluindo informações em relação ao número de tumores, técnica utilizada para as análises e resumidamente as regiões envolvidas em ganhos, amplificações, perdas e rearranjos.

Foram incluídos no levantamento bibliográfico todos os trabalhos encontrados na literatura que realizaram análises cromossômicas, caracterizando completamente o genoma de tumores primários do tipo HB. Estudos envolvendo linhagens celulares foram excluídos do levantamento, porém vale a pena citar os trabalhos de Doi (1976) e Miyamoto et al (1980), que estabeleceram e caracterizaram citogeneticamente, respectivamente, a linhagem celular de hepatoblastoma HUH-6-clone 5, com cariótipo modal: 49, XY, +12, + 20, +i(8q), produzindo as primeiras informações citogenéticas descritas na literatura sobre esse tipo de tumor.

Trabalhos com informações incompletas acerca das CNAs dos tumores também foram excluídos, como por exemplo, o trabalho de Douglass et al (1985) que relatou somente alterações envolvendo o cromossomo 1 e o breve relato de Kiechle-schwarz, Scherer e Kovacs (1989) que descreveram apenas alterações relacionadas aos cromossomos 2 e 11. Ademais, os resultados do trabalho de Rodrigues et al (2014) também não foram inclusos na tabela, serão apresentados junto aos dados obtidos dessa dissertação, uma vez que parte da casuística é compartilhada.

Tabela 3: Revisão de literatura acerca de alterações citogenéticas encontradas em HB, atualmente com cerca de 500 tumores estudados. Trabalhos agrupados de acordo com o tipo de técnica empregada, citogenética clássica e citogenômica.

Tumores (n)	Técnica	Ganho	Amplificação	Perda	Rearranjos estruturais	Referência
1	Cariótipo	mar	-	2	der(19)t(4;19)	PETKOVIĆ <i>et al.</i> , 1985
2	Cariótipo	20	dmin	-	-	MASCARELLO <i>et al.</i> , 1990
1	Cariótipo	Hiperplóide (91-95 cromossomos)	-	1p22	i(8q)	BARDI <i>et al.</i> , 1991
4	Cariótipo	dic(1)(p12), 2, 2q, 5, 6, 6p, 7, 8, 8, 12, 15, 17, 20, 22	dmin	1q32	i(8q), t(X;1)(p22;q21), inv(9)(p11q21)c	FLETCHER <i>et al.</i> , 1991
1	Cariótipo	20	-	-	der(4)t(2;4)(q21;q35), der(9)t(9;?)(p24;?)	RODRIGUEZ <i>et al.</i> , 1991
2	Cariótipo	2, der(2), der(5), del(6)(q15), 12, 20, r(20?)	-	-	der(2)t(1;2)(q23;p21), inv(5)(q22q35), der(5)t(1;5)(q25;q35)	SOUKUP; LAMPKIN, 1991
1	Cariótipo	2q, 4(q12q26), 20	-	-	t(3;5)(p25;q31)	ANNERÉN <i>et al.</i> , 1992
1	Cariótipo	2	-	-	-	BARDI <i>et al.</i> , 1992
1	Cariótipo	-	-	-	t(10;22)(q26;q11)	HANSEN <i>et al.</i> , 1992
1	Cariótipo	18c	-	-	-	TANAKA <i>et al.</i> , 1992
6	Cariótipo	1q, 2, 2q, 6, 7, 20	-	1p	dirdup(1)(pter-q42::q23-q32::q21+qter), dirdup(2)(pter-q33::q21-qter)	DRESSLER <i>et al.</i> , 1993
3	Cariótipo	2, 20	-	17p	-	TONK <i>et al.</i> , 1994
1	Cariótipo	18c, 20	-	1p35	der(11)t(1;11)(q25;q25) der(17)t(2;17)(p23;p36)	BOVE <i>et al.</i> , 1996
1	Cariótipo	20	-	-	der(2)t(2;2)(p25;q21), der(22)t(1;22)(q22;p13)	SWARTS <i>et al.</i> , 1996
4	Cariótipo	2, 5, 6, 7, 8, 8, 13, 19, 20, 21, Y, ace	dmin	-	der(4)t(1;4)(q12;q34), der(4)t(1;4)(q25;q32)	SCHNEIDER <i>et al.</i> , 1997

1	Cariótipo	Hiperplóide (72-77 cromossomos)	-	1q, 3q12	i(8)x2, der(1;3)(p10;p10), inv(6)(p25q15), der(8)t(X;8)(q13;p12), der(12)t(3;12)(q21;p11) der(12)t(7;12)(q31;q24) der(17)t(Y;17)(q11;p11)	PARADA <i>et al.</i> , 1997
1	Cariótipo	18c	-	-	-	TERAGUCHI <i>et al.</i> , 1997
1	Cariótipo/FISH	add(4)(q35), 20	-	-	der(9)ins(9;2)(p22;q?21q?25)	BALOGH <i>et al.</i> , 1998
9	Cariótipo/FISH	add(1)(p32), 2, der(2), 6, i(6), add(12q), 7, 8, 8, 15, 16, 17, 17, 19, 20, 21, 22, add(22q)	-	4	i(1)(q10), der(2)t(1;2)(q21;q36), t(1;4)(q21;q32), i(6)(p10), der(12)t(12;15)(q24;q13)	SAINATI <i>et al.</i> , 1998
2	Cariótipo	2, 8	-	-	der(2)t(1;2)(q32;q37), der(6)t(1;6)(q12;q27), der(7)t(2;7)(q23;p22), der(21)t(2;21)(q23;p12)	NAGATA <i>et al.</i> , 1999
1	Cariótipo	2, der(14), 19	-	-	der(14)t(1;14)(q21;p11.1)	PARK <i>et al.</i> , 1999
2	Cariótipo	Hiperplóide (59-61 cromossomos) add(5)(q31)	-	-	der(4)t(1;4)(q12;q34)	MA <i>et al.</i> , 2000
7	Cariótipo/FISH	Hiperplóide (88-92 cromossomos) 2, der(2), 5, 7, 8, 10, add(10)(p11), 12, 16, add(16)(q22), 20, mar	-	9p22, 7q11.2	der(2)del(2)(q11q23)t(1;2)(q12;p1 1), dic(1;4)(p13;q35), der(4)t(1;4)(q21;q31),i(8)(q10), der(11)t(1;11)(q12;q25)	PARADA <i>et al.</i> , 2000
1	Cariótipo/SKY	der(2), 20, Y	-	-	der(2)t(2;3)(q35;q25), der(3)t(1;3)(q12;q25)	YEH <i>et al.</i> , 2000

11	Cariótipo/FISH	2, 8, 20	-	-	der(X)t(X;1)(q21;q21)	<i>SAINATI et al., 2002</i>
2	Cariótipo	2, 2q, 20	-	-	der(1)t(1;1)(p36;q12) del(1)(q32), t(7;8;11)(q34;p11.2;q13), der(11)t(2;11)(q21;q25)	<i>ALI et al., 2002</i>
1	Cariótipo	Hiperplóide (91-91 cromossomos)	-	-	t(22;22)(q11;q13)	<i>GUNAWAN et al., 2002</i>
1	Cariótipo	-	-	3q11.2q13.2	-	<i>SANDOVAL et al., 2002</i>
10	Cariótipo/FISH	2, 8, 20	-	-	-	<i>SURACE et al., 2002</i>
111	Cariótipo	Hiperplóide (54-81 cromossomos)1, 1pter, 1q, 2, 2, 2q, 3, 5, 6, 7, 8, 8, 9, 10, 11, 12, der(12), 13, 14, 15, 16, 17, 17, 19, 20, 20, 21, 22, X, Y, mar, r	dmin	1pter, 4, 6p23, 8, 8q24, 14q22, 16, 17, 18, 22q	dicder(1)t(1;1)(p36;p13) der(1)t(1;1)(p36;q12), der(1)t(1;1)(p36;q12), i(1)(q10), der(1;1)(1q25;1p34.3), der(1)t(1;8)(p34.3;q22), inv(2)(p11.2q13)c, der(2)t(2;2)(2q21;2p11) der(2)t(1;2)(q12;q35), der(2)t(1;2)(q12;q37), der(2)t(1;2)(q21;q37), der(3)t(1;3)(q12;q27), der(3)t(2;3)(q21;p25), der(4)t(1;4)(q12;q33), der(4)t(1;4)(q12;q34), der(4)t(1;4)(q12;q35), der(4)t(1;4)(q25;q32),	<i>TOMLINSON et al., 2005</i>

					der(5)t(1;5)(q21.3;q31.3), der(6)t(1;6)(q12;q23), der(6)t(1;6)(q12;q22.2), der(6)t(1;6)(q21;q25), i(6)(p10), der(11)t(1;11)(q21;q25)der(12)t(1; ;12)(q12;q24.1),der(12)t(1;12)(q1 2;q24.3), der(14)t(1;14)(q12;p12), der(14;21)(q10q10), t(15;22)(q26;q11.2), t(X;13)(q22;p13)	
2	Cariótipo	del(1)(p22), 2, add(4)(q35), 4, 5, 6, 7, 8, del(12)(p12), 18, 19, 20, 22	-	-	-	NAGATA <i>et al.</i> , 2005
1	Cariótipo	add(2p), 20	-	7c	-	NEAS <i>et al.</i> , 2006
1	Cariótipo	-	-	-	-	PEREIRA <i>et al.</i> , 2012
2	Cariótipo	18c	-	-	der(11)add(11)(p13)add(11)(q13)	TAN <i>et al.</i> , 2013
16	CGH	1, 1p, 1q, 2, 2p, 2q, 3p, 3q, 4, 4q, 5q, 6q, 7, 7p, 7q, 8, 8q, 9p, 9q, 10p, 10q, 11p, 11q, 12q, 13q, 15q, 16, 17, 17q, 18q, 19, 20, 20q, 22, Y	-	10p, 10q, 15q, 19, 20, X, Xq	-	STEENMAN <i>et al.</i> , 1999
10	CGH	1q, 2, 2q, 3, 6, 8q, 9p, 12, 16p, 17, 17q, 20	1q32, 2q24	4, 8pter, 11, 18	-	HU <i>et al.</i> , 2000

18	CGH	1q, 2, 2q, 4q, 8q, 9q32qter, 17q22qter, 19, 20, 20p, 20q	2q22-q24	2p, 2q22, 3, 3q23q25, 4q, 6q, 7q31, 8p, 9, 9p, 9qter, 11p, 11q, 12p, 12qter, 13q, 14, 14q, 15q, 18, 18p, 18q, 21q	-	GRAY <i>et al.</i> , 2000
34	CGH	1q, 2, 2q, 5, 7q, 8, 10p, 11, 12, 12q, 13q, 17, 20, 22, X	2q24, 8q11.2q13, 8q11.2q21.3, 10q24q2	1p, 4p, 4q, 10p, 10q, 16q, 18q	-	WEBER <i>et al.</i> , 2000
38	Cariótipo/CGH /FISH	1pter, 1q, 2, 2q, 3, 5, 6, 6p, 6q, 7, 8, 8, 9, 10q, 12, 12q, 15, 16, der(16), 17, 17q, 18q, 19, 20, 20q, 21, 22, X, mar, ace	1q21qter, 2q13q36, 2q23q31, 2q24q34, 5q31, 8q, dmin	1pter, 4q, 11p, 18, X	i(1)(q10), der(4)t(1;4)(q21;q34), der(16)t(1;16)(q12;q24) der(17)t(1;17)(q21;q12)der(20)t(1 ;20)(q12;q11) der(21)t(1;21)(q21;p11)der(22)t(1 ;22)(q12;p11)	KUMON <i>et al.</i> , 2001
35	CGH/FISH	1pter, 1q, 2p, 3, 3p, 3q, 2q, 4pter, 4q, 5p, 5q, 6p, 6q, 7, 7q, 8, 8q, 9qter, 10q, 12p, 12q, 13q, 14q, 17, 20q, X, Y	-	1p, 1qter, 2p, 2q, 3p, 3q, 4p, 4q, 5q, 6q, 8p, 8q, 9p, 9q, 10p, 10q, 11q, 12p, 12q, 13q, 15q, 16q, 17, 18q, 20q, 21q, X, Y	-	TERRACCIAN O <i>et al.</i> , 2003

17	SNP-array	1q, 2, 2p, 2q, 3p, 4q, 5, 5pter, 6, 6p, 6q, 7, 7q, 8, 8q, 10, 10pter, 10q, 11p, 12, 12pter, 13, 14, 14q, 15, 15q, 16, 16p, 17, 17q, 19, 20, 21, 22	2q34,3p25.2, 7q34, 11q22.2q22.3, 14q11.2	1pter, 1qter, 2p, 3, 3pter, 3q, 4q, 5pter, 5qter, 6pter, 6qter, 8, 9, 11qter, 12p, 18q, 19, 22	-	SUZUKI <i>et al.</i> , 2008
1	SNP-array	2	2q24	5q35	-	KATO <i>et al.</i> , 2009
9	Cariótipo/ M-FISH/aCGH	1q, i(1), 2, 2q, der(2), 5, der(6), add(6)(q27), 7, 8, i(8), 17, 20, 22	-	1p	i(1)(q10), der(1)t(1;?17)(p36;q21), t(1;6)(q21;q26), der(4)t(1;4)(q25.2;q35.1),der(6)t(1;6)(q21;q26)i(8)(q10), der(10)t(1;10)(q23;q26)	STEJSKALOVÁ <i>et al.</i> , 2009
4	Cariótipo/ aCGH	-	-	22q11, 22q12	t(10;22)(q26;q11), t(22;22)(q11;q13)	TROBAUGH- LOTRARIO <i>et al.</i> , 2009
15	Tipagem alélica por microsatélite	-	-	1q44, 4q21q22, 13q14, 17p13, 17q11.2	-	TERADA <i>et al.</i> , 2009
56	SNP-array /FISH	1q, 2, 2p, 2q, 6p, 8q, 17q, 20p, 20q	1q32.1, 2q24.2q24.3, dmin	1p, 4q, 16q	-	ARAI <i>et al.</i> , 2010
6	SNP-array	1q, 12q	-	1p, 4q, 18q	-	JIA <i>et al.</i> , 2014
46	SNP-array	1q, 2, 8q, 12, 20	-	1p, 4q	-	SUMAZIN <i>et al.</i> , 2016
1	SNP-array	1q	-	-	-	KIM <i>et al.</i> , 2017b

Legenda: ace - fragmento acêntrico; add - material adicional desconhecido; c - alteração constitucional; del - deleção; der - cromossomo derivativo; dic - cromossomo dicêntrico; dirdup – duplicação direta; dmin - cromossomos *double minute*; i - isocromossomo; ins - inserção; mar - cromossomo marcador; p - braço curto do cromossomo; pter - parte terminal do braço curto; q - braço longo do cromossomo; qter - parte terminal do braço longo; r - cromossomo em anel;t-translocação.

Ao analisarmos as alterações encontradas nos tumores, as aneuploidias de ganhos são prevalentes e amplificações são também frequentes, principalmente os cromossomos *double minute* (dmin), um dos sinais citogeneticamente visíveis de amplificação gênica. A amplificação do gene *MYCN* relacionada a dmin em neuroblastoma é uma das alterações mais estudadas nesse tipo de tumor, sendo associada a rápida progressão da doença e mau prognóstico (MARRANO; IRWIN; THORNER, 2016). Dessa forma, identificar genes amplificados poderia contribuir como fator prognóstico em HB, porém dos seis estudos relatando a presença de dmin, apenas um foi baseado em microarranjos genômicos, técnica que poderia identificar a origem do segmento amplificado; apenas o trabalho de Arai et al (2010) associou *double minute* detectado na citogenética com amplificação dos genes *PIK3C2B* e *MDM4*.

Alterações envolvendo o cromossomo 2, especialmente o braço longo desse cromossomo, também são bastante significativas, principalmente pelo relato de sete trabalhos que observaram amplificações. Em geral, quando alterado no genoma de HB, o cromossomo 2 normalmente apresenta ganho total (aneuploidia) ou parcial afetando o braço longo. Além de ser um achado comum em HB, ganho de cromossomo 2 e 2q é uma alteração comumente encontrada em rabdomiossarcomas e em outros tumores pediátricos relacionados à síndrome de Beckwith-Wiedemann (SUZUKI et al., 2008). Alguns grupos de pesquisa (STEENMAN et al., 1999; HU et al., 2000; WEBER et al., 2000; KUMON et al., 2001 e ARAI et al., 2010), incluindo o nosso (RODRIGUES et al., 2014), relataram uma região de ganho recorrente em 2q, delimitando um segmento de maior aumento no número de cópias genômicas (amplificação focal) em 2q24 em algumas das amostras tumorais. Esses achados sugerem que genes localizados na região 2q24 poderiam estar com expressão aumentada, conferindo uma vantagem proliferativa ao tumor (KUMON et al., 2001, RODRIGUES et al., 2014). No trabalho realizado por nosso grupo (RODRIGUES et al., 2014), o segmento amplificado foi delimitado em 10 Mb, no qual estavam mapeados 48 genes, cuja expressão foi analisada; aumento de expressão em relação à borda não tumoral foi detectado em cinco desses genes mapeados em 2q24 (*DAPL1*, *ERMN*, *GALNT5*, *SCN1A* e *SCN3A*), que seriam candidatos a contribuir para a tumorigênese e/ou progressão tumoral de HB.

Existe uma translocação recorrente descrita em HB, t(1;4), bastante prevalente, sendo relatada por vários grupos. Porém, translocações envolvendo 1q e outros cromossomos também foram descritas, frequentemente resultando em perda de material do cromossomo envolvido e ganho de 1q (TOMLINSON, 2012), o que evidencia que 1q conteria genes relevantes para o desenvolvimento de HB. O ganho de 1q também foi descrito em outras neoplasias pediátricas como linfoma, tumor de Wilms e sarcoma, indicando que essa alteração estaria relacionada à progressão tumoral em geral (SUZUKI et al., 2008), não sendo específica de HBs.

As deleções mais relatadas foram 1p, principalmente 1pter, 4q e 18. Alterações em 4q foram detectadas em diversos tipos de câncer (BROSENS et al., 2011; JIANG et al., 2008; WRAGE et al., 2009), sendo mais frequentemente encontradas em carcinoma hepatocelular (HCC) do que em outros tumores (XIA, 2009), levando à hipótese de que genes supressores tumorais importantes para a tumorigênese de fígado estejam presentes nessa região. Alterações nessa região podem ser especialmente importantes para tumores produtores de AFP, pois o gene *AFP* está localizado em 4q13.3. Porém, nenhum estudo com HB reportou uma correlação significativa entre a perda do braço longo do cromossomo 4 e prognóstico, sendo este evento mais possivelmente relacionado à sua gênese do que progressão (SUZUKI et al., 2008).

O significado de todas essas translocações e CNAs ainda não está esclarecido, apesar de algumas terem sido relacionadas com pior prognóstico, como é o caso da amplificação focal em 2q24 (KUMON et al., 2001) e alterações envolvendo o ganho de 8q e 20 (WEBER 2000).

4.2 Caracterização do perfil genômico da coorte de 25 HBs

As diferentes técnicas empregadas neste estudo para investigação de CNAs, bem como o número de tumores avaliados utilizando cada técnica, estão sumarizados na figura abaixo (**Figura 6**). Os dados obtidos e a comparação entre os resultados obtidos com as diferentes técnicas serão detalhados nas seções seguintes.

Figura 6: Técnicas empregadas nesta investigação de CNAs na coorte de HBs.

4.2.1 Identificação e análise de CNAs pela técnica de aCGH

A análise do perfil genômico da coorte de HBs mostrou que esse tipo de tumor tem genomas relativamente estáveis do ponto de vista de CNAs. A figura abaixo (**Figura 7**) apresenta uma representação global do perfil de CNAs detectado nesta coorte.

Figura 7: Perfil genômico de CNAs da coorte de 25 HBs de acordo com a análise baseada em aCGH, com as respectivas frequências (%) de ganhos e perdas genômicos no grupo. No eixo X, as sondas da plataforma estão posicionadas de acordo com seu mapeamento genômico nos cromossomos (de 1p a 22q; X; o cromossomo Y não foi avaliado); o eixo Y exibe a frequência de detecção (%) de eventos de ganhos e perdas em todo o grupo (acima da *baseline* 0% estão os ganhos, em azul; abaixo, perdas em vermelho).

No **Apêndice 1** estão detalhadas todas as CNAs encontradas na coorte estudada. A análise de aCGH do grupo de 25 HBs identificou um total de 123 CNAs (detectadas em 18 tumores), correspondendo a um número médio de cinco CNAs por genoma tumoral no grupo inteiro; o tamanho médio das CNAs foi 55,8 Mb (mediana 38,7 Mb).

Como descrito na literatura (TOMLINSON; KAPPLER, 2012), o HB é caracterizado citogeneticamente pelo ganho ou perda de braços cromossômicos ou cromossomos inteiros, sendo essas CNAs únicas ou múltiplas. Em nossa casuística, 16 dentre 18 tumores nos quais CNAs foram detectadas apresentaram esse tipo de alteração e, em alguns casos, também foram detectadas alterações focais (aqui definido como CNAs com tamanho máximo de 3 Mb); a menor CNA detectada afetava segmento de aproximadamente 200 Kb. Como pode ser visualizado na **Figura 7**, as alterações mais prevalentes no grupo foram ganhos em 1q (44%), 2/2q (32%) e 20/20p (20%), enquanto perdas foram preponderantes em 1p/1pter (28%) e 4/4q (20%). Esses achados são condizentes com os dados relatados na literatura (TOMLINSON, 2012), com exceção do aumento do número de cópias do cromossomo 8, que é descrito como recorrente em HB, mas que foi detectado nesta coorte em apenas três tumores (12%). O perfil genômico de cada tumor pode ser visualizado no **Apêndice 2**.

Classificamos estes tumores em três categorias: ausência de CNA, número baixo de CNAs e genomas rearranjados. Sete dentre 25 tumores não apresentaram CNA detectável pela técnica de aCGH; 13 tumores apresentaram poucas CNAs e cinco tumores tinham genomas mais rearranjados (mais de seis alterações maiores do que 3 Mb) (**Figura 8**).

Figura 8: Exemplos de classes de perfil genômico identificados por aCGH nesta coorte de HBs.

A) Tumores com ausência de CNA; B) Tumores com poucas alterações de número de cópias e C) tumores com genomas mais complexos. Os cromossomos estão representados por cores distintas, posicionados do cromossomo 1-22, X (cromossomo Y não avaliado), sondas plotadas de acordo com o mapeamento genômico, do braço curto ao longo; no eixo Y está a escala de valores de número de cópias em $\log_2$ da amostra tumoral/amostra controle (valores próximos a 0 indicam regiões com número de cópias similar entre amostra tumoral e controle, valores positivos representam ganhos, valores negativos, perdas).

A) Ausência de CNA (HB42T)

B) Poucas alterações (HB43T)

C) Genomas rearranjados (HB70T)

Cinco tumores (HB15T, HB30T, HB33T, HB46T, HB70T) destacaram-se por apresentarem genomas mais complexos, com um número alto de CNAs em relação às demais amostras. Em média, os HBs apresentaram quatro CNAs envolvendo cromossomos inteiros, braços cromossômicos inteiros ou quase inteiros por tumor, enquanto esses tumores com genomas complexos continham no mínimo sete alterações desses tipos, além de outras CNAs menores. Três dentre estes cinco pacientes foram a óbito em decorrência da doença, um deles apresentando Fanconi renal congênito; em relação aos pacientes sobreviventes, um é o único caso de HB congênito dessa casuística, enquanto o segundo apresenta características sindrômicas como atraso global de desenvolvimento e craniossinostose complexa.

Outro resultado a ser destacado na análise de CNA de dois tumores foi a detecção de um padrão de várias deleções contíguas, agrupadas em um braço cromossômico (em HB66T) ou afetando 3 diferentes cromossomos (em HB46T). Considerando tais achados inusitados, utilizamos a plataforma de SNP-array Illumina 850K para validação do resultado do tumor HB46T (**Figura 9**). Embora em grau reduzido, este padrão pode ser considerado remanescente ao que ocorre no fenômeno conhecido como cromotripse (*chromothripsis*). Cromotripse é uma forma de instabilidade genômica, caracterizada por vários rearranjos cromossômicos agrupados localmente, afetando um ou poucos cromossomos em um único evento catastrófico, resultando em cromossomos altamente rearranjados, que se formam devido a erros nos mecanismos de reparo (RODE et al., 2015); uma das hipóteses propostas é a de que a célula sobrevivente a esse evento provavelmente adquire forte vantagem seletiva, potencialmente se transformando em célula tumoral. Ambos os pacientes que desenvolveram estes tumores são meninos, compartilhando sinais clínicos como prematuridade, metástases ao diagnóstico e atraso global no desenvolvimento.

Uma alteração relatada na literatura como fator de pior prognóstico em HB é o ganho do cromossomo 20 (WEBER et al., 2000). Nesta casuística, quatro dos cinco pacientes com tumores contendo ganho de cromossomo 20 foram a óbito, sendo a paciente sobrevivente o único caso de HB congênito do grupo. É importante ressaltar que quatro dos cinco tumores com ganho de cromossomo 20 fazem parte do grupo com genomas mais complexos. Dessa forma, neste estudo, não é possível avaliar se

o aumento do número de cópias do cromossomo 20, ou a presença de diversas aneuploidias (ou ambos) seriam os fatores associados à doença mais agressiva.

Figura 9: Perfil genômico dos dois tumores com padrão remanescente de cromotripse: dados de SNP-array (A-C: HB46T) e aCGH (D: HB66T), com detalhamento do padrão de deleções agrupadas em um mesmo braço cromossômico. O eixo Y apresenta valores de número de cópias em $\log_2$ e no eixo X estão plotadas sondas de acordo com as coordenadas genômicas. No painel superior das imagens A-C (SNP-array) estão marcadas as CNAs (em rosa); no painel inferior, estão apresentados os dados referentes ao BAF (em roxo). Em (D) as deleções estão indicadas em rosa.

a) HB46T - Cromossomo 1

b) HB46T - Cromossomo 9

c) HB46T - Cromossomo 18

d) HB66T - Cromossomo 3

4.2.2 Delimitação de regiões mínimas com CNAs mais frequentes e genes candidatos

A análise citogenômica dos tumores permitiu a delimitação de tamanhos mínimos de segmentos genômicos comuns dentro das regiões de CNAs mais frequentes (em inglês, *minimum common region* - MCRs), detectadas em no mínimo cinco tumores. Por serem segmentos menores com alterações de número de cópias em maior frequência na coorte, as MCRs carregam o potencial de revelar genes relevantes relacionados à biologia tumoral ou a fatores prognósticos, visto que a maior prevalência dessas alterações indica que provavelmente não seriam eventos aleatórios. Neste estudo foram identificadas seis MCRs, apresentadas na **Figura 10** e detalhadas na **Tabela 4**.

Adicionalmente, dois tumores do grupo apresentaram amplificação genômica da citobanda 2q24 (HB18T e HB66T), um deles já descrito em trabalho anterior do grupo (RODRIGUES et al., 2014). A estimativa teórica do número de cópias do segmento amplificado, de acordo com os dados de aCGH, seria de 6,2 (HB18T) e 7,3 (HB66T) cópias (estimativa baseada na conversão do valor de $\log_2$, levando em conta os valores teóricos: $\log_2 = 0$ - 2 cópias; $\log_2 = 0,58$, 3 cópias; $\log_2 = -1$, 1 cópia. Como já relatado anteriormente, essa região tem sido identificada como amplificada em diversos casos de HB na literatura, sendo apontada como indicativo de prognóstico ruim em alguns relatos (KUMON et al., 2001) e, em outros trabalhos, descrita como possivelmente associada à progressão tumoral (KATO et al., 2009; ARAI et al., 2010). Os dois tumores nos quais a amplificação 2q24 foi identificada eram de pacientes do sexo masculino, diagnosticados com menos de 1 ano de idade, apresentando níveis elevados de AFP (>200.000 ng/mL). Considerando estes dois tumores, a região mínima comum da amplificação 2q24.2q24.3 pode ser restrita a 5,3 Mb (**Figura 11**), contendo 33 genes. Estes genes foram colocados na ferramenta *VarElect* de priorização de genes (<https://ve.genecards.org/>) em relação ao fenótipo câncer e hepatoblastoma, sendo que os genes *FAP* e *DPP4* obtiveram os maiores escores.

Figura 10: Seis regiões genômicas com tamanho mínimo (MCR) delimitado na coorte de HBs, comuns a no mínimo cinco tumores.

Tabela 4: Detalhamento das seis MCRs delimitadas dentro das regiões de CNAs mais comuns na coorte de HBs.

Coordenada genômica (início_fim; Hg19)	Alteração	Tamanho (Kb)	Amostras	Número total de genes (genes COSMIC*)
1p36.31 (5610508_6198217)	Perda	588	HB15T, HB30T, HB33T, HB39T, HB44T, HB46T, HB70T	4 (0)
1q31.3q42.3 (195777798_235429385)	Ganho	39.652	HB16T, HB30T, HB33T, HB36T, HB39T, HB41T, HB43T, HB44T, HB66T, HB70T, HB79T	421 (MDM4, ELK4, SLC45A3, H3F3A)
2q24.2q24.3 (161699775_167064911)	Ganho/ Amplificação	5.360	HB15T, HB18T , HB33T, HB36T, HB41T, HB43T, HB66T , HB70T	33 (0)
4p14 (39499328_40193134)	Perda	694	HB36T, HB39T, HB40T, HB44T, HB46T, HB70T	8 (0)
4q21.22q25 (83108902_109515205)	Perda	26.406	HB36T, HB39T, HB40T, HB46T, HB70T	154 (RAP1GDS1, TET2)
20p13p11.1 (5007_26365868)	Ganho	26.361	HB15T, HB30T, HB33T, HB39T, HB70T	262 (0)

Legenda: *COSMIC – genes relacionados a câncer listados no *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer Genes*: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

Figura 11: Detalhamento da região de amplificação mapeada em 2q24.2q24.3, detectada em dois tumores.

Com exceção da região delimitada em 1p36.31, as demais regiões foram amplamente discutidas nos tópicos anteriores, apesar de nenhum gene candidato ter sido consistentemente identificado em trabalhos anteriores.

A perda de material cromossômico envolvendo a parte distal do braço curto do cromossomo 1 se destacou das demais alterações, visto que deleções nessa região são frequentemente observadas em diversos tipos tumorais (HENRICH; SCHWAB; WESTERMANN, 2012), incluindo neuroblastoma (HO et al., 2018) e HB, como demonstrado na revisão bibliográfica realizada. Cinco genes mapeados em 1p36 são sugeridos como candidatos a supressores tumorais: *CHD5*, *CAMTA1*, *KIF1B*, *CASZ1* e *MIR34A* (HENRICH; SCHWAB; WESTERMANN, 2012); dentre eles, apenas *CHD5* está incluído na MCR 1p36.31 deste grupo de HBs.

Os genes contidos nas MCRs foram analisados com relação a seu potencial de contribuição para a biologia tumoral de HB com o auxílio da ferramenta *VarElect*, utilizando as palavras-chave “câncer” ou “hepatoblastoma”. Os genes com *score* > 6 foram selecionados para a próxima etapa, na qual pesquisa bibliográfica detalhada foi realizada, com base especialmente em publicações recentes. Tais genes, assim como breves descrições de potenciais relações destes com tumorigênese em tecido hepático, são apresentados a seguir (**Tabela 5**).

Tabela 5: Genes mapeados nas MCRs que são candidatos potenciais a estarem relacionados ao desenvolvimento e/ou progressão de HB.

MCR	CNA	Gene	Descrição
1p36.31	Perda	<i>CHD5</i>	Supressor tumoral em diversos tipos de câncer, incluindo HCC*, mas principalmente em neuroblastoma (XIAO et al., 2018)
1q31.3q42.3	Ganho	<i>BLACAT1</i>	lncRNA**, promove desenvolvimento tumoral pela modulação da via Wnt/ β -catenina (WANG et al., 2018)
		<i>KDM5B</i>	Enzima modificadora de histona com superexpressão em vários tipos de câncer, incluindo HCC, correlacionada com expressão negativa de genes supressores de tumor (XHABIJA; KIDDER, 2018)
		<i>PARP1</i>	Ativação da via Wnt/ β -catenina; já relacionado ao desenvolvimento de tumor agressivo em HB (VALANEJAD et al., 2018)
		<i>LINC00210</i>	lncRNA, promove ativação da via Wnt/ β -catenina; aumento no número de cópias correlacionado com superexpressão gênica e auto-renovação de células iniciadoras de tumor em fígado (FU et al., 2018)
		<i>MDM4</i>	Regulador negativo de p53 (HÜLLEIN et al., 2019); amplificação gênica relatada em HB (ARAI et al., 2010)
		<i>CHI3L1</i>	Promove ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina (GENG et al., 2018)
		<i>PCAT6</i>	lncRNA relacionado a tumorigênese pela modulação da via Wnt/ β -catenina (LV et al., 2019)
		<i>PROX1</i>	Aumenta transcrição de β -catenina e promove sua translocação nuclear, ativando a via Wnt (LIU et al., 2015)
		<i>UBE2T</i>	A superexpressão ativa a via AKT/ GSK3b/ β -catenina (HU et al., 2016), relacionada à regulação negativa de p53 em HCC (LIU et al., 2017)
2q24.2q24.3	Ganho/ Amplificação	<i>DPP4</i>	Superexpressão encontrada em diversos tumores, papel pró-oncogênico em HCC (ENZ et al., 2019)

		<i>FAP</i>	Expressão durante a embriogênese e em fibroblastos associados a câncer (TYULKINA et al., 2016)
4q21.22q25	Perda	<i>HPSE</i>	Relacionado a migração transendotelial em HCC (CHEN et al., 2017)
		<i>LEF1</i>	Mediador a jusante da via de sinalização Wnt/ β -catenina; essencial na manutenção de células-tronco e na organogênese, com papel na transição epitelial-mesenquimal (SANTIAGO et al., 2017)
		<i>NFKB1</i>	Relacionado a homeostase hepática, atua como supressor tumoral em HCC (CONCETTI; WILSON, 2018)
		<i>PTPN13</i>	Supressor tumoral em HCC (ZHAN et al., 2016)
20p13p11.1	Ganho	<i>JAG1</i>	Níveis elevados de α -fetoproteína associados ao aumento no número de cópias em <i>JAG1</i> em câncer de fígado (KAWAGUCHI et al., 2016)

Legenda: *HCC - Carcinoma hepatocelular; **lncRNA - RNA longo não codificador (*Long non-coding RNA*).

Três dos genes indicados na tabela são RNAs longos não-codificadores (lncRNA), categoria de genes que apresentam importante função regulatória em vários processos biológicos, como proliferação e diferenciação celular, atuando em geral na modificação estrutural da cromatina (SCHMITZ; GROTE; HERRMANN, 2016) e modulando a expressão gênica. É crescente o número de estudos relatando alteração de expressão de lncRNAs em associação a processos patológicos, especialmente câncer, sugerindo que poderiam ser usados como biomarcadores promissores para estratificação de risco, assim como para direcionar terapias (SCHMITZ; GROTE; HERRMANN, 2016).

Apenas dois genes foram diretamente relacionados a HB, ambos localizados na MCR 1q31.3q42.3: *MDM4*, já citado anteriormente, amplificado e possivelmente relacionado a cromossomos dmin em um único caso descrito de HB (ARAI et al., 2010); *PARP1*, associado a uma forma agressiva de HB em trabalho publicado recentemente (VALANEJAD et al., 2018). Os resultados do estudo de Valanejad e colaboradores mostraram que proteínas supressoras tumorais estariam altamente presentes em HBs agressivos, porém em isoformas oncogênicas, sendo que o aumento dessas isoformas seria mediado pela ativação de *PARP1*, gene envolvido

no reparo de quebras de DNA dupla fita, assim como na ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina. Desta forma, *PARP1* seria um gene promissor para estudos futuros em HB, visando verificar se de fato o aumento do número de cópias resulta em sua ativação pelo aumento de expressão. Na coorte estudada, 11 tumores apresentaram a MCR de ganho 1q31.3q42.3; ao analisar a estratificação de risco desses pacientes, notou-se que seis eram de alto risco e quatro de risco intermediário; é importante notar que quatro dos onze pacientes com ganho de 1q31.3q42.3 foram a óbito. Tendo em vista o número elevado de pacientes de risco alto/intermediário nesse subgrupo de tumores, ganho de 1q31.3q42.3 pode estar de fato associado a tumores mais agressivos.

A presença de CNA pode levar a alterações nos níveis de expressão gênica (LU et al., 2011; HASSAN et al., 2014), em genes sensíveis à dosagem. Dessa forma, o aumento do número de cópias genômicas estaria em tumores associado a maior expressão para no mínimo parte dos genes mapeados nas CNAs, enquanto que perdas genômicas resultariam em diminuição da expressão de parte dos genes afetados. De maneira geral, em nossa análise, ao menos os genes selecionados descritos acima exibiram padrão compatível com essa hipótese, considerando o tipo de CNA no qual estavam mapeados e suas funções biológicas descritas na literatura. Nas MCRs de perda genômica, identificamos genes relatados como supressores tumorais, ao passo que nas MCRs de ganho foram identificados genes promotores da tumorigênese. Portanto, os genes selecionados seriam candidatos a futuras análises para correlacionar as CNAs com dados de expressão gênica e perfil epigenético, bem como associação com dados clínicos.

4.3 Detecção de CNAs utilizando dados de NGS

Das 25 amostras de HB testadas pelo método de aCGH, 19 foram sequenciadas em diferentes tipos de plataformas NGS (ver **Figura 12** com resumo; detalhes específicos de cada kit de captura utilizado em cada amostra podem ser consultados na **Tabela 2** na seção de Material e Métodos). A amostra HB33T foi sequenciada em duas plataformas diferentes, Exoma e *OneSeq*.

Figura 12: Esquema resumido das plataformas de sequenciamento utilizadas para detecção de CNA com seus respectivos números amostrais.

4.3.1 Dados discrepantes aCGH *versus* NGS (WES e *OneSeq*) avaliados por SNP-array

Das 78 CNAs detectadas por aCGH nos tumores que também tinham dados de NGS, apenas doze não foram detectadas pelo sequenciamento de exoma completo ou painel *OneSeq*; quatro outras CNAs foram detectadas somente nos dados derivados de sequenciamento. Assim, totalizando 16 CNAs discrepantes entre aCGH e NGS (**Tabela 6**), houve concordância de ~80% entre as duas técnicas. A presença de 14 dessas CNAs discrepantes foi avaliada por SNP-array para validar os achados.

Tabela 6: Detalhes de todas as CNAs discrepantes entre as técnicas de aCGH (180K) e NGS e validação por SNP-array (850K).

ID (Plataforma)	Citobanda coordenadas genômicas (início_fim)	CNA	Tamanho (Kb)	Detecção aCGH	Detecção NGS	SNP- array
HB15T (OneSeq)	1p36.31 (5611219_6198875)	Perda	588	Sim	Não	Sim
	2q36.2 (225204232_225636643)	Perda	432	Sim	Não	Sim
	2q37.3 (238249771_238373529)	Perda	124	Sim	Não	Sim
HB17T (Exoma_V3)	8q24.22 (133851711_133961111)	Ganho	109	Não	Sim	Sim
	19p13.3q13.43 (1_59128983)	Ganho	59.129	Sim	Não	Não
HB18T (Exoma_V3)	Xp22.33q28 (1_155,270,560)	Ganho	155.270	Sim	Não	N. D
HB30T (OneSeq)	4p16.3q35.2 (1_191154276)	Perda	191.154	Não	Sim	Sim
	13q11q34 (18822508_115169878)	Perda	96.347	Não	Sim	Sim
	18p11.32q23 (1_78077248)	Perda	78.077	Não	Sim	Sim
HB31T (OneSeq)	1p36.13 (19813183_20114421)	Ganho	301	Sim	Não	Sim
HB46T (Exoma_V6)	1p22.3 (87286211_87556416)	Perda	270	Sim	Não	Sim
	2q14.3 (129058983_129378423)	Perda	319	Sim	Não	Sim
	9p21.1 (28539067_28920899)	Perda	382	Sim	Não	Sim
	18q12.2q12.3 (34508873_37506100)	Perda	2.997	Sim	Não	Sim
	18q12.3 (38881073_39281160)	Perda	400	Sim	Não	Sim
HB66T (OneSeq)	13q32.1 (95409990_95604953)	Perda	195	Sim	Não	N. D

Legenda: N. D – Não Disponível

Ao analisar os dados, verificou-se que a falha na detecção por NGS de 10 das CNAs (**Tabela 7**) poderia ser explicada pela cobertura insuficiente dessas regiões. A ausência completa ou número insuficiente de *reads* nessas regiões pôde ser avaliada no programa de análise utilizado (*Nexus Copy Number*). Relatórios de qualidade dos dados NGS foram gerados no *software SureCall (Agilent Technologies)* para verificar a cobertura do sequenciamento nessas regiões, considerando a profundidade e extensão de sequenciamento de cada gene presente; foram considerados apenas

dados de cobertura referentes aos genes reportados nos relatórios do programa (genes representados). Para o cálculo da porcentagem média de cobertura vertical <20x das regiões analisadas foi utilizado a média aritmética da cobertura de cada exon dos genes representados. O resumo dos resultados dessa análise pode ser consultado na **Tabela 7**. A **Figura 13** apresenta um exemplo de uma região na qual estão mapeadas três CNAs detectadas por aCGH e SNP-array, mas apenas uma delas foi detectada pela técnica de NGS, em decorrência de baixa cobertura.

Tabela 7: Detalhamento das 10 CNAs focais (< 3Mb) não detectadas pelo NGS devido à falta de cobertura dessas regiões (ausência de sondas na biblioteca ou baixa cobertura vertical do sequenciamento).

ID (Plataforma)	Citobanda (Coordenadas genômicas: início_fim)	Tamanho (Kb)	Nº total de genes (nº genes OMIM)	Nº genes representados	Média de cobertura vertical <20x (%)
HB15T (OneSeq)	1p36.31 (5611219_6198875)	588	5 (1)	2	36,26
	2q36.2 (225204232_225636643)	432	3 (1)	3	37,64
	2q37.3 (238249771_238373529)	124	1 (1)	1	51,05
HB31T (OneSeq)	1p36.13 (19813183_20114421)	301	7 (0)	1	2,73
HB46T (Exoma_V6)	1p22.3 (87286211_87556416)	270	2 (0)	2	46,16
	2q14.3 (129058983_129378423)	319	1 (1)	1	58,90
	9p21.1 (28539067_28920899)	382	3 (0)	1	2,52
	18q12.2q12.3 (34508873_37506100)	2.997	10 (0)	5	36,47
	18q12.3 (38881073_39281160)	400	1 (0)	0	-
HB66T (OneSeq)	13q32.1 (95409990_95604953)	195	1 (0)	0	-

Figura 13: Comparação entre a detecção de CNAs por aCGH, NGS e SNP-array, evidenciando a ausência de sondas e falha na detecção de duas CNAs (HB46T - 18q12.2q12.3 e 18q12.3) pelo NGS. O painel superior mostra as CNAs nas três diferentes imagens (em rosa); o eixo Y apresenta valores de número de cópias em $\log_2$ e no eixo X estão ordenadas as sondas de acordo com suas coordenadas genômicas. O quadro inferior na imagem de NGS e SNP-array apresenta dados referentes ao BAF (em roxo).

HB46T - aCGH 180K

HB46T - NGS (Agilent V6)

HB46T - SNP-array 850 K

Nota-se que vários genes envolvidos nessas alterações não foram adequadamente representados no sequenciamento e que a maioria das regiões apresentou porcentagem de cobertura média inferior a 20x, o que explica a falha na detecção dessas CNAs. Assim, a cobertura insuficiente nas regiões das dez CNAs mencionadas foi fator decisivo para a ausência de detecção dessas alterações pelo NGS, não havendo de fato discrepância entre os achados.

Como já discutido anteriormente, os experimentos de NGS que envolvem enriquecimento e captura de certas regiões do genoma, como exomas e painéis, resultam na exclusão da maior parte do genoma (~98%); a falta de uniformidade de cobertura horizontal dificulta a detecção do espectro total de CNAs (ZHAO et al., 2013; WANG et al., 2015). Além disso, existe a questão relativa à desigualdade da cobertura vertical das regiões alvo; mesmo que uma amostra tenha uma alta profundidade média de cobertura (>75x), a captura e sequenciamento das regiões são heterogêneos e parte desse dado estará representado pobremente (~10x), o que também pode resultar na falha de detecção de CNAs. Diversos fatores podem afetar a cobertura de uma região, como: tamanho do éxon, sequências repetitivas e conteúdo GC, sendo esse último um dos principais fatores que contribuem para baixa cobertura em dados WES (WANG et al., 2017).

Entre as onze CNAs focais discrepantes encontradas, apenas uma afetando segmento de 109 Kb foi detectada exclusivamente por NGS (HB17T - 8q24.22). Nesse único caso, a plataforma de aCGH continha poucas sondas mapeadas na região, enquanto o NGS e o SNP-array apresentaram uma cobertura suficiente para detecção da CNA (**Figura 14**).

Figura 14: Comparação entre a detecção de CNAs por aCGH, NGS e SNP-array, mostrando a falta de sondas na região pela técnica de aCGH, levando à falha na detecção da CNA (HB17T - 8q24.22). O painel superior mostra a CNA nas três diferentes imagens (em azul); o eixo Y apresenta valores de número de cópias em $\log_2$ e no eixo X estão ordenadas as sondas de acordo com suas coordenadas genômicas. O quadro inferior na imagem de NGS e SNP-array apresenta dados referentes ao BAF (em roxo).

HB17T - aCGH 180 K

HB17T - NGS (244k Agilent V3)

HB17T - SNP-array 850 K

As cinco CNAs discrepantes restantes envolvem cromossomos inteiros (**Tabela 8**), sendo detectadas exclusivamente nos dados de aCGH ou nos de NGS. Das três amostras (HB17T, HB18T e HB 30T) que apresentaram esse tipo de discordância, duas puderam ser testadas pelo método de SNP-array (HB17T e HB30T) em busca de validação para esses achados; apenas o ganho do cromossomo 19, detectado por aCGH em HB17T, não foi detectado (**Apêndice 3**).

Tabela 8: CNAs discrepantes afetando cromossomos inteiros. A estimativa do número de cópias foi baseada na conversão do valor de $\log_2$, levando em conta os valores teóricos: $\log_2=0$ corresponde a 2 cópias; $\log_2=0,58$, 3 cópias; $\log_2=-1$, 1 cópia).

ID	Cromossomo	CNA	Nº de cópias estimado
HB17T	19	Ganho	2,2
HB18T	X	Ganho	2,4
HB30T	4	Perda	1,7
	13	Perda	1,8
	18	Perda	1,7

Uma hipótese para explicar esse tipo de discrepância foi pautada na heterogeneidade genética tumoral, originando mosaicismo. As amostras tumorais são uma mistura de células neoplásicas e células normais e essa proporção pode variar consideravelmente, principalmente se a extração de DNA do tecido tumoral for feita em diferentes momentos, a partir de diferentes amostras. Assim, se a proporção de células tumorais com determinada alteração for muito baixa na amostra tumoral utilizada no experimento, as CNAs poderão não ser detectadas (RASMUSSEN et al., 2011).

Adicionalmente, a amostra HB30T apresentou para a maioria das CNAs um padrão de frequência do alelo B (*b allele frequency* - BAF) discordante do que se espera quando há uma alteração de número de cópias em um genoma diploide, tanto nos dados de NGS quanto no SNP-array (**Figura 15**).

Figura 15: Comparação do perfil genômico de CNAs por aCGH, NGS e SNP-array da amostra HB30T. Cromossomos representados por cores distintas, posicionados do cromossomo 1-22, X (cromossomo Y não avaliado), sondas plotadas de acordo com o mapeamento genômico, do braço curto ao braço longo.

Legenda: Setas vermelhas: deleções; azuis: duplicações; pretas: CNAs não detectadas; Quadrados roxos: Padrão esperado do BAF na presença de CNA.

HB30T - aCGH 180 K

HB30T - NGS (Agilent OneSeq)

HB30T - SNP-array 850 K

O padrão incomum do BAF correspondente a várias CNAs detectadas neste único tumor suscitou dúvidas quanto à ploidia. Como exemplo, citamos um estudo relatando poliploidia em melanoma (YAVUZYIGITOGU et al., 2016), que reportou achados semelhantes aos nossos em relação ao BAF incomum; neste estudo, além do SNP-array, análise de cariótipo também foi realizada. Na **Figura 16** é possível visualizar a comparação entre cariótipo e SNP-array de uma das amostras tumorais desse estudo, notando-se que há um problema de normalização nos dados de SNP-array; no geral, cromossomos que apresentaram três cópias no cariótipo (por exemplo, cromossomos 2 e 5) não apresentaram alteração de *log ratio* no SNP-array, embora tenham apresentado padrão alterado no BAF, enquanto que cromossomos com quatro cópias no cariótipo (por exemplo, cromossomos 4 e 6) apresentaram uma aumento do *log ratio*, porém sem alteração no BAF, exatamente como o padrão detectado na amostra HB30T.

Figura 16: Comparação entre cariótipo e SNP-array de uma amostra de melanoma, evidenciando problemas de normalização nos dados de SNP-array em amostras pseudopoliploides.

Fonte: Figura retirada de YAVUZYIGITOGU et al., 2016

Dessa forma, supomos que o problema na normalização de dados em amostras pseudopoliploides poderia explicar o padrão atípico do BAF no tumor HB30. O laudo anatomopatológico desse tumor corrobora tal hipótese, uma vez que foi classificado como HB com características de carcinoma hepatocelular (*HB/HCC features*). Esse tipo histológico incomum, também relatado como *transitional liver tumors of childhood* ou *transitional liver cell tumor* (TLCT), foi primeiramente descrito por Prokurat et al. (2002) e sua proposta para esse termo é pautada na hipótese que a célula originária desse tipo tumoral estaria em um estágio de diferenciação posterior ao da célula de origem de hepatoblastomas. Um processo importante e característico na diferenciação de hepatoblastos para hepatócitos é a ocorrência de poliploidia, durante o desenvolvimento pós-natal (GENTRIC; CELTON-MORIZUR; DESDOUETS, 2012).

4.3.2. Análise de CNAs utilizando dados do painel *TruSight One*

Em relação aos dados referentes ao painel *TruSight One*, todas as oito CNAs detectadas por aCGH nesses três tumores também foram detectadas pelo NGS. Porém, é relevante ressaltar que grande parte dessas alterações envolveram cromossomos ou braços cromossômicos inteiros, sendo que a menor CNA identificada tinha aproximadamente 1,5 Mb.

Apesar da detecção de CNAs nessa plataforma ser bastante comparável aos dados de aCGH, houve detecção no painel em uma das amostras (HB38T) de ganho nos cromossomos 6 e 7. Retrospectivamente, no experimento de aCGH dessa amostra, também foi possível observar pequeno aumento no $\log_2$ desses cromossomos, porém não atingindo o limiar mínimo para ganho que utilizamos de $\log_2 \geq 0,1$; o $\log_2$ dessas alterações nos dados de NGS atingiu valores acima do mínimo e, portanto, foram consideradas. A **Figura 17** mostra a comparação entre os dois ensaios.

Figura 17: Comparação da detecção de CNAs nos cromossomos 6 e 7 na amostra HB38T, evidenciando os valores $\log_2$ referentes de cada alteração. No eixo Y estão representados os valores de número de cópias em $\log_2$; no eixo X está indicado o cromossomo afetado de cada alteração.

Além disso, é importante comentar uma limitação em relação ao BAF no sequenciamento feito no painel *TruSight One*, em virtude do menor número de sondas. O padrão plotado no gráfico do BAF muitas vezes não é distinto o suficiente para corroborar a detecção de CNAs feita pelo número de cópias ($\log_2$). Na **Figura 18** é possível observar uma comparação entre os três tipos de sequenciamento utilizados (exoma, painel *OneSeq* e painel *TruSight One*), evidenciando claramente a diferença do padrão BAF entre as diferentes plataformas, sendo o *OneSeq* a apresentar maior robustez.

Em resumo, excluindo as CNAs da amostra HB30T e de cromossomos inteiros detectadas em mosaico muito baixo, que podem estar abaixo do limite de resolução da técnica, os dados derivados de NGS não detectaram apenas dez das 78 CNAs identificadas pelo aCGH, o que significa uma concordância final de aproximadamente 87%, uma correlação alta e coerente com o encontrado na literatura para amostras tumorais (VALDÉS-MAS et al., 2012). Se excluirmos também as CNAs que não foram detectadas por falta de cobertura em uma das plataformas, não há discordância.

Figura 18: Perfil genômico de três amostras tumorais exemplificando e comparando as três plataformas de sequenciamento utilizadas.

HB46T - Exoma

HB66T - OneSeq

HB40T - TruSight One

4.3.3 Detecção de regiões em homozigose em dados de NGS

Como já mencionado, além da informação referente a CNAs, os dados de NGS permitem a genotipagem, como nos SNP-arrays, assim como a construção dos gráficos referentes ao BAF. Assim, é possível identificar, por exemplo, perdas de heterozigose neutras em relação ao número de cópias (*copy-neutral losses of heterozygosity* – cnLOH).

Regiões de cnLOH maiores de 10 Mb foram identificadas apenas na amostra HB15T, encaminhada para SNP-array, cuja análise confirmou as chamadas. Entretanto, como a análise identificou diversos blocos de cnLOH, suspeitou-se que poderiam ser germinativas e não resultado do processo de tumorigênese. Ao analisarmos os dados de sequenciamento de material germinativo desse paciente (HB15N), pudermos confirmar que todos os blocos de cnLOH identificados tinham origem germinativa, sendo na verdade regiões de homozigose (**Figura 19**).

Em outra amostra (HB33T), foi detectado um desequilíbrio alélico que não é cnLOH completa, mas sim uma alteração em mosaico, já que as sondas do BAF não estão completamente separadas apenas em 0 e 1, como normalmente aconteceria nesse tipo de alteração (**Figura 20**). Nesse caso, a hipótese seria que uma subpopulação de células tumorais carregue a cnLOH, enquanto outra população não a apresentaria, originando o padrão de BAF detectado.

Figura 19: Identificação de regiões de homozigose germinativas pela técnica de NGS, validadas por SNP-array (HB15T). O painel superior das imagens mostra as CNAs; no eixo Y estão plotados valores de número de cópias em $\log_2$ e no eixo X estão representadas as sondas de acordo com as coordenadas genômicas. O painel inferior apresenta dados referentes ao BAF, onde é possível visualizar a região em homozigose (em amarelo).

HB15T - NGS (Agilent OneSeq)

HB15T - SNP-array 850 K

HB15N - NGS (Agilent OneSeq)

Figura 20: Desequilíbrios alélicos identificados no hepatoblastoma congênito HB33. Detalhe de alterações identificadas no cromossomo 7, onde se visualiza à esquerda um segmento de aumento de número de cópias em mosaico e, à direita, a presença de desequilíbrio alélico em região adjacente, sem mudança de número de cópias. O quadro superior mostra as CNAs; eixo Y apresenta valores de número de cópias em $\log_2$ e no eixo X estão apresentadas as coordenadas genômicas. O quadro inferior apresenta dados referentes ao BAF.

HB33T - NGS (Agilent OneSeq)

HB33T - SNP-array 850 K

4.3.4 Detecção de CNAs em mosaico pelo NGS

Mosaicismo pode ser definido como a coexistência de populações celulares geneticamente diversas entre si em um organismo originado de um único zigoto. Consequência natural de erros de replicação e reparo durante a divisão celular, o mosaicismo pode compreender alterações genéticas de diferentes tipos e tamanhos, incluindo SNVs, CNAs e rearranjos cromossômicos, sendo um dos vários mecanismos que levam à heterogeneidade celular (FERNÁNDEZ; TORRES; REAL, 2015). Majoritariamente existem dois tipos de mosaicismo: o gonadal ou germinativo, que afeta tecidos produtores de gametas; e o somático, afetando os demais tecidos, sendo os tumores um exemplo extremo desse fenômeno (FERNÁNDEZ; TORRES; REAL, 2015).

Particularmente no câncer, o mosaicismo desempenha um papel central na composição tumoral e instabilidade genômica, já discutida previamente, sendo fonte importante de diversidade genética por gerar populações celulares heterogêneas. Além disso, a heterogeneidade inter e intratumoral tem implicações significativas na tomada de decisões clínicas e na identificação de biomarcadores para distinguir subgrupos tumorais (BURRELL et al., 2013). As técnicas de NGS permitem a identificação de alterações em mosaico, incluindo as de grau baixo. Estudos utilizando dados de NGS para detecção de CNVs tem demonstrado eficácia na detecção de alterações mosaico (GAJECKA, 2015; KING et al., 2017).

Em nossa casuística, utilizamos o valor do *probe median* em $\log_2$, fornecido pelo software, convertido em número de cópias, para calcular a porcentagem de mosaicismo, levando em consideração os seguintes valores teóricos: $\log_2 = 0$ correspondendo a 2 cópias; $\log_2 = 0,58$, 3 cópias; $\log_2 = -1$, 1 cópia. Dessa forma, dentro dos critérios de análise estabelecidos, o maior valor de número de cópias encontrado para deleções foi 1,9 cópias ($\log_2 = -0,1$), correspondendo a 10% de mosaicismo na amostra, ao passo que o menor número para duplicações foi de 2,2 cópias ($\log_2 = 0,12$), o que equivaleria a ~20% de mosaicismo; estas alterações podem ser visualizadas na **Figura 21**. Vale ressaltar que tais CNAs foram confirmadas por aCGH e/ou SNP-array, comprovando sua existência, portanto é seguro afirmar que as plataformas de NGS utilizadas possuem sensibilidade suficiente para detectar CNAs em mosaico baixo, nos níveis indicados acima.

Figura 21: Detalhes das CNAs detectadas em mosaico em frequência baixa pela técnica de NGS (*Illumina TruSight One*), indicando o valor de $\log_2$ respectivamente de cada alteração. No eixo Y estão representados os valores de número de cópias em $\log_2$; no eixo X está indicado o cromossomo.

*CONSIDERAÇÕES
FINAIS E CONCLUSÕES*

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O HB é um tumor pediátrico raro; contudo, aproximadamente 500 tumores foram caracterizados por citogenética e/ou citogenômica em diferentes estudos, produzindo dados relevantes quanto à frequência de alterações cromossômicas nesse tumor. Alterações cromossômicas numéricas, em especial ganhos de cromossomos inteiros, são os eventos prevalentes em HB, porém não está claro se a tumorigênese em HB estaria relacionada a genes sensíveis à mudança de dose presentes nessas aneuploidias ou se essas alterações de cromossomos inteiros refletiriam erros mitóticos inerentes à proliferação das células tumorais ou à própria tumorigênese em tecido hepático. As duas hipóteses podem estar parcialmente corretas e serem complementares, atuando em sinergia para a gênese dos HBs.

Dentre as CNAs mais frequentemente relatadas na literatura, pode se destacar principalmente ganho do cromossomo 2 ou 2q, alteração encontrada também em outros tumores pediátricos e, mais especificamente, amplificações recorrentes na região 2q24, identificada em diversos trabalhos, incluindo na coorte estudada nesta dissertação. Esses achados sugerem que genes localizados na região amplificada 2q24 poderiam estar com expressão aumentada, conferindo uma vantagem proliferativa ao tumor, dessa forma, esses genes seriam candidatos a estarem relacionados à tumorigênese e/ou progressão tumoral de HB.

Além das alterações identificadas no cromossomo 2, o ganho de 1q também se destaca por ser bastante prevalente em HB. Ademais, essa alteração geralmente é derivada de uma translocação recorrente entre os cromossomos 1 e 4, resultando no ganho de 1q e perda de 4/4q, alteração também frequentemente observada nos relatos da literatura. Foram relatadas diversas translocações envolvendo o cromossomo 1 e outros diversos cromossomos, resultando no ganho de 1q e perda de material do outro cromossomo envolvido na alteração, o que revela que o ganho de 1q pode estar de alguma forma associado à biologia tumoral do HB.

Contudo, mesmo com diversos indícios sobre a relevância dessas alterações, suas contribuições para a gênese e/ou progressão em HB ainda são incertas. Porém, as alterações encontradas em HB não podem ser consideradas aleatórias, apesar da grande heterogeneidade de alterações descritas em diferentes amostras tumorais.

Dezoito das 25 amostras tumorais estudadas apresentaram CNAs, sendo as mais prevalentes os ganhos de 1q, 2/2q e 20/20p, e as perdas mais recorrentes foram em 1p/1pter e 4/4q, achados que corroboram resultados da literatura. Em nosso estudo, a análise do perfil genômico dos HBs possibilitou a divisão das amostras tumorais em três categorias; 1) sete amostras sem CNAs detectáveis, 2) treze com poucas CNAs e 3) cinco tumores considerados como tumores complexos, por exibirem genomas mais rearranjados, com muitas CNAs (mais de seis alterações > 3Mb). Interessantemente, três dentre os cinco pacientes que apresentaram tumores complexos foram a óbito e, dentre os pacientes sobreviventes, um é o caso de HB congênito e o segundo apresenta características sindrômicas; isso pode indicar tanto que tumores com genomas mais complexos tendem a ser mais agressivos, quanto que o *background* genético seria um fator predisponente para a tumorigênese em relação aos casos sindrômicos. Atrelado a essa última hipótese, os dois pacientes que apresentaram tumores complexos com alterações reminiscentes de cromotripse também apresentavam características sindrômicas, incluindo atraso global no desenvolvimento. Recentemente, um trabalho de revisão (JOHNSON et al., 2017) elencou diversos estudos que sugerem a existência de forte associação entre defeitos congênitos e tumores pediátricos. Dessa forma, compreender as relações entre o desenvolvimento pediátrico anormal e o risco de desenvolvimento de câncer é vital.

Aneuploidias de cromossomos e/ou braços cromossômicos inteiros são bastante prevalentes e provavelmente desempenham um papel importante na direção da tumorigênese do HB. Entretanto, CNAs focais em regiões específicas do genoma podem ser apontadas como potencialmente relevantes e diversos genes nessas regiões podem ser sensíveis à variação no número de cópias. Dessa forma, dentro das CNAs mais prevalentes, foi possível delimitar seis MCRs, nas quais estão mapeados 17 genes que foram considerados como potencialmente relacionados a tumorigênese e/ou progressão em HB, ressaltados pela análise qualitativa e funcional (*in silico*) e candidatos para estudos futuros de expressão gênica. Curiosamente, apenas dois dos genes foram relacionados diretamente a HB, ambos localizados na MCR 1q31.3q42.3 (*MDM4* e *PARP1*). No subgrupo de onze tumores com ganho de 1q31.3q42.3 em nossa coorte, todos, com exceção de um deles, eram derivados de pacientes de grupos de risco alto e intermediário. Sendo assim, o ganho de 1q31.3q42.3 pode estar relacionado a tumores mais agressivos, possivelmente por

aumento de expressão de genes como *MDM4* e *PARP1*. Além disso, foi possível delimitar um segmento de 5 Mb de uma MCR em 2q24.2q24.3, região amplificada em nossa coorte, também descrita como amplificada em diversos outros trabalhos, que sugerem que essa região deve conter genes relacionados com progressão tumoral, sendo assim promissora para identificação de possíveis oncogenes.

Notavelmente, nossos resultados destacaram que nem todos os hepatoblastomas carregam genomas tão semelhantes, revelando grande heterogeneidade intertumoral, desde tumores não apresentando nenhuma CNA até tumores com alta complexidade de alterações cromossômicas, com CNAs possivelmente derivadas de eventos remanescentes de cromotripse. Esses achados carregam o potencial de fornecer uma estrutura para futuras estratificações de risco em HB, utilizando como base o perfil citogenômico dos tumores para correlacionar com dados clínicos.

O estudo comparativo entre aCGH e NGS para detecção de CNAs obteve resultados muito positivos e alta concordância entre os achados, cerca de 87%. A validação por SNP-array de alta cobertura foi essencial para compreender as discrepâncias encontradas, assim como para validar a detecção de cnLOH e mosaicismos pelo NGS. De maneira geral, as três plataformas utilizadas (exoma, *OneSeq* e *TruSight One*) foram bem-sucedidas, inclusive detectando alterações em mosaico baixo, com resolução aproximada de 10% para perdas e 20% para ganhos. Além disso, foi possível identificar regiões de cnLOHs, presentes em dois tumores da coorte estudada na resolução estipulada, sendo uma dessas alterações em mosaico. Cabe ressaltar algumas limitações do NGS para detecção de CNAs utilizando o painel *TruSight One*, que foi impactada pelo número muito menor de sondas, que prejudica o uso do padrão BAF como suporte aos dados de número de cópias, assim como nas plataformas de exoma a cobertura horizontal irregular, inerente à captura realizada nesse tipo de ensaio.

Salientamos, entretanto, que o fator majoritário na determinação da eficácia e sensibilidade de detecção de CNAs nas plataformas de NGS testadas é a profundidade do sequenciamento; regiões com baixa profundidade de cobertura impedem detecção segura de CNAs. Dados de exoma com cobertura vertical média > 80x permitem a detecção de CNAs de maneira robusta.

Dessa forma, mesmo com as limitações mencionadas, o NGS mostra potencial para substituir os microarranjos genômicos como primeira linha de investigação genômica, tanto de genomas tumorais como germinativos, possibilitando a obtenção de informações de número de cópias e mutações em um único ensaio, economizando tempo, amostra e dinheiro. Em um cenário ideal, a melhor técnica de NGS a ser empregada com o objetivo de detecção de mutações e CNAs seria o sequenciamento de genoma completo (*whole-genome sequencing* – WGS), porém a dificuldade de processamento dos dados e o alto custo desse sequenciamento ainda tornam essa alternativa pouco viável.

6. CONCLUSÕES

- ✓ O HB é um tipo de tumor cujo genoma contém poucas CNAs, porém tais alterações não são aleatórias, visto que ganhos em 1q, 2/2q, 8/8q e 20 e perdas em 1p, 4q e 18 são consistentemente detectados, além de diferentes translocações envolvendo 1q. Porém, a contribuição dessas alterações para a gênese do HB ainda não é clara, podendo ser parcialmente relacionada à mudança de dose em genes-chave para o desenvolvimento do fígado.
- ✓ O delineamento do perfil genômico de nossa coorte de 25 HBs pela técnica de aCGH (Agilent 180K) revelou CNAs mais prevalentes: ganhos em 1q, 2/2q e 20/20p, e perdas em 1p/1pter e 4/4q. Entretanto, diferenças foram observadas entre os tumores, sendo possível caracterizar a coorte em três grupos: sem alterações detectáveis, com poucas CNAs e tumores com genomas considerados complexos, inclusive dois deles com padrão semelhante a cromotripse.
- ✓ Seis MCRs foram delimitadas, sendo um passo importante para a identificação de genes candidatos relacionados a gênese e progressão em HB. Foram selecionados 17 genes mapeados em tais regiões, candidatos a futuros estudos de expressão gênica.

- ✓ A alta concordância encontrada no estudo comparativo entre aCGH e NGS (~87%) mostra que os dados de sequenciamento podem substituir os microarranjos como primeira linha de testes genômicos, sendo possível também detectar CNAs em mosaico em baixa frequência e regiões em homozigose ou cnLOH. Todavia, existem limitações inerentes às plataformas de NGS com captura.

- ✓ A validação por SNP-array de alta resolução (Illumina 850K) foi essencial para compreender as discrepâncias encontradas no estudo comparativo (aCGH x NGS), assim como para validar CNAs detectadas exclusivamente em uma das plataformas, cnLOHs e mosaicismo.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, T. F. M. **Estudo genômico e funcional de pacientes afetados por hepatoblastomas para identificação de mutações potencialmente patogênicas**. 2019. Tese (Doutorado em Oncologia) – Fundação Antônio Prudente, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo.

AHMAD, N. et al. Hepatoblastoma in a mosaic trisomy 18 child with hemihypertrophy. **BMJ Case Reports**, p. bcr2015211380, 21 jan. 2016.

AL-HUSSAIN, T.; ALI, A.; AKHTAR, M. Wilms Tumor: An Update. **Advances In Anatomic Pathology**, v. 21, n. 3, p. 166–173, maio 2014.

ALI, W. et al. Cytogenetic findings in two new cases of hepatoblastoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 133, n. 2, p. 179–182, mar. 2002.

ALI HASSAN, N. Z. et al. Integrated Analysis of Copy Number Variation and Genome-Wide Expression Profiling in Colorectal Cancer Tissues. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e92553, 2 abr. 2014.

ALKAN, C.; et al. Personalized copy number and segmental duplication maps using next-generation sequencing. **Nat Genet**, 2009. 41, 1061–1067

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition**. Atlanta: American Cancer Society; 2015.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2018**. Atlanta: American Cancer Society; 2018.

ANDOR, N.; MALEY, C. C.; JI, H. P. Genomic Instability in Cancer: Teetering on the Limit of Tolerance. **Cancer Research**, v. 77, n. 9, p. 2179–2185, 1 maio 2017.

ANNERÉN, G.; NORDLINDER, H.; HEDBORG, F. Chromosome aberrations in an alpha-fetoprotein-producing hepatoblastoma. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 4, n. 1, p. 99–100, jan. 1992.

ARAI, Y. et al. Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and *MDM4* amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. **Genes**,

Chromosomes and Cancer, p. NA-NA, 2010.

BALOGH, E. et al. Fluorescence In Situ Hybridization Reveals Trisomy 2q by Insertion into 9p in Hepatoblastoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 102, n. 2, p. 148–150, abr. 1998.

BARDI, G. et al. i(8q) as the primary structural chromosome abnormality in a hepatoblastoma. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 51, n. 2, p. 281–283, 1991.

BARDI, G. et al. Trisomy 2 as the sole chromosomal abnormality in a hepatoblastoma. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 4, n. 1, p. 78–80, jan. 1992.

BELL, Danielle; et al. Novel Advances in Understanding of Molecular Pathogenesis of Hepatoblastoma: A Wnt/ β -Catenin Perspective. **Gene Expression**, v. 17, n. 2, p.141-154, 10 fev. 2017. Cognizant, LLC. <http://dx.doi.org/10.3727/105221616x693639>.

BHATIA, S. et al. Collaborative Research in Childhood Cancer Survivorship: The Current Landscape. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 27, p. 3055–3064, 20 set. 2015.

BOVE, K. E. et al. Hepatoblastoma in a Child with Trisomy 18: Cytogenetics, Liver Anomalies, and Literature Review. **Pediatric Pathology & Laboratory Medicine**, v. 16, n. 2, p. 253–262, jan. 1996.

BROSENS, R. P. M.; et al. Deletion of chromosome 4q predicts outcome in Stage II colon cancer patients. **Cellular Oncology**, v. 34, n. 3, p.215-223, jun. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13402-011-0042-8>.

BROUSTAS, Constantinos G.; LIEBERMAN, Howard B. DNA Damage Response Genes and the Development of Cancer Metastasis. **Radiation Research**, v. 181, n. 2, p.111-130, fev. 2014. Radiation Research Society. <http://dx.doi.org/10.1667/rr13515.1>

BURRELL, R. A. et al. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 338–345, set. 2013.

CAMPBELL, P.J.; STEPHENS, P.J.; PLEASANCE, E.D.; O'MEARA, S.; LI, H.; SANTARIUS, T.; STEBBINGS, L.A.; LEROY, C.; EDKINS, S.; HARDY, C.; et al.

Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing. **Nat Genet**, 2008. 40, 722–729

CHEN, X. et al. Heparanase Contributes To Trans-Endothelial Migration of Hepatocellular Carcinoma Cells. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 16, p. 3309–3317, 2017.

CHO, Eun Kyung. Array-based Comparative Genomic Hybridization and Its Application to Cancer Genomes and Human Genetics. **Journal Of Lung Cancer**, v. 10, n. 2, p.77-0, 2011. Korean Association for the Study of Lung Cancer (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.6058/jlc.2011.10.2.77>

CONCETTI, J.; WILSON, C. L. NFkB1 and Cancer: Friend or Foe? **Cells**, v. 7, n. 9, p. 133, 7 set. 2018.

COSTA, Ana Rosa da Silveira et al. Single-nucleotide polymorphism-array improves detection rate of genomic alterations in core-binding factor leukemia. **Medical Oncology**, v. 30, n. 2, 1 maio 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12032-013-0579-7>.

CZAUADERNA, Piotr; et al. Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy. **Current Opinion In Pediatrics**, v. 26, n. 1, p.19-28, fev. 2014. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/mop.0000000000000046>.

CZAUADERNA, Piotr; et al. The Children's Hepatic tumors International Collaboration (CHIC): Novel global rare tumor database yields new prognostic factors in hepatoblastoma and becomes a research model. **European Journal Of Cancer**, v. 52, p.92-101, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2015.09.023>.

DAWSON, Somer et al. Risk of cancer among children with birth defects: A novel approach. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 103, n. 4, p.284-291, 24 mar. 2015. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bdra.23364>.

DEAN, Sarah J.; FARMER, Meagan. Pediatric cancer genetics. **Current Opinion In Pediatrics**, v. 29, n. 6, p.629-633, dez. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/mop.0000000000000543>.

DEVI, L. Purnima, et al. Hepatoblastoma—a Rare Liver Tumor with Review of Literature. **Journal Of Gastrointestinal Cancer**, v. 45, n. 1, p.261-264, 15 out. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12029-014-9659-y>.

DOI, I. Establishment of a cell line and its clonal sublines from a patient with hepatoblastoma. **Gann**, 67: p. 1-10, 1976.

DONG, R.; ZHENG, S.; DONG, K. TERT promoter mutation during development of hepatoblastoma to hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. 2, p. 497, fev. 2015.

DOUGLAS, E.C.; GREEN, A.A; HAYES, F.A; ETCUBANAS, E.; HOROWITZ, M.; WILLIAMS, J.A. Chromosome 1 abnormalities: A common feature of pediatric solid tumors. **J Natl Cancer Inst**, v. 75, p. 51-54, 1985.

DRESSLER, L. G. et al. Dna content measurement can be obtained using archival material for dna flow cytometry a comparison with cytogenetic analysis in 56 pediatric solid tumors. **Cancer**, v. 72, n. 6, p. 2033–2041, 15 set. 1993.

DÜRRBAUM, M.; STORCHOVÁ, Z. Effects of aneuploidy on gene expression: implications for cancer. **FEBS Journal**, v. 283, n. 5, p. 791–802, mar. 2016.

ENZ, N. et al. CD26/DPP4 - a potential biomarker and target for cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, fev. 2019.

ETEBARI, Maryam; NAVARI, Mohsen; PICCALUGA, Pier. SNPs Array Karyotyping in Non-Hodgkin Lymphoma. **Microarrays**, v. 4, n. 4, p.551-569, 12 nov. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microarrays4040551>

FERNÁNDEZ, L. C.; TORRES, M.; REAL, F. X. Somatic mosaicism: on the road to cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 1, p. 43–55, jan. 2016.

FIDALGO, Felipe et al. Lymphovascular invasion and histologic grade are associated with specific genomic profiles in invasive carcinomas of the breast. **Tumor Biology**, v. 36, n. 3, p.1835-1848, 13 nov. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-014-2786-z>.

FITZMAURICE, Christina; et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015. **Jama Oncology**, v. 3, n. 4, p.524-548, 1 abr. 2017. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.5688>.

FLETCHER, J. A. et al. Consistent cytogenetic aberrations in hepatoblastoma: A common pathway of genetic alterations in embryonal liver and skeletal muscle malignancies? **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 3, n. 1, p. 37–43, jan. 1991.

FOUAD, Yousef Ahmed; AANEI, Carmen. Revisiting the hallmarks of cancer. **Am J Cancer Res**, v. 7, n. 5, p.1016-1036, maio 2017.

FROMER, M.; PURCELL, S. M. Using XHMM Software to Detect Copy Number Variation in Whole-Exome Sequencing Data: Using XHMM Software to Detect Copy Number Variation in Whole-Exome Sequencing Data. In: HAINES, J. L. et al. (Eds.). . **Current Protocols in Human Genetics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. p. 7.23.1-7.23.21.

FU, X. et al. Linc00210 drives Wnt/ β -catenin signaling activation and liver tumor progression through CTNNBIP1-dependent manner. **Molecular Cancer**, v. 17, n. 1, dez. 2018.

GAJECKA, Marzena. Unrevealed mosaicism in the next-generation sequencing era. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 291, n. 2, p. 513–530, 2016.

GATTA, Gemma et al. Embryonal cancers in Europe. **European Journal Of Cancer**, v. 48, n. 10, p.1425-1433, jul. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2011.12.027>.

GENG, B. et al. Chitinase 3-like 1-CD44 interaction promotes metastasis and epithelial-to-mesenchymal transition through β -catenin/Erk/Akt signaling in gastric cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 1, dez. 2018.

GENTRIC, G.; CELTON-MORIZUR, S.; DESDOUETS, C. Polyploidy and liver proliferation. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 36, n. 1, p. 29–34, fev. 2012.

GOEDEKE, Jan; et al. AFP Negative Cystic Liver Lesion in a Child Should Let One Think of Hepatoblastoma. **Journal Of Pediatric Hematology/oncology**, v. 33, n. 6, p.245-247, ago. 2011. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/mph.0b013e3181f466ec>.

GRAY, S. G. et al. Comparative genomic hybridization reveals population-based genetic alterations in hepatoblastomas. **British Journal of Cancer**, v. 83, n. 8, p. 1020–1025, out. 2000.

GRÖBNER, S. N. et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. **Nature**, v. 555, n. 7696, p. 321–327, 28 fev. 2018.

GUNAWAN, B. et al. Undifferentiated small cell hepatoblastoma with a chromosomal translocation t(22;22)(q11;q13). **Histopathology**, v. 40, n. 5, p. 485–487, maio 2002.

HAN, Ze-guang. Mutational landscape of hepatoblastoma goes beyond the Wnt- β -catenin pathway. **Hepatology**, v. 60, n. 5, p.1476-1478, 29 set. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.27347>.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p.646-674, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HANSEN, K. et al. Undifferentiated Small Cell Hepatoblastoma with a Unique Chromosomal Translocation: A Case Report. **Pediatric Pathology**, v. 12, n. 3, p. 457–462, jan. 1992.

HEHIR-KWA, J. Y.; PFUNDT, R.; VELTMAN, J. A. Exome sequencing and whole genome sequencing for the detection of copy number variation. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 15, n. 8, p. 1023–1032, 3 ago. 2015.

HIYAMA, Eiso. Pediatric hepatoblastoma: diagnosis and treatment. **Translational Pediatrics**, Hiroshima, 3; (4), p.293-299, out. 2014.

HU, J. et al. Comparative genomic hybridization analysis of hepatoblastomas. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 27, n. 2, p. 196–201, fev. 2000.

HU, W. et al. UBE2T promotes nasopharyngeal carcinoma cell proliferation, invasion,

and metastasis by activating the AKT/GSK3/ β -catenin pathway. **Oncotarget**, v. 7, n. 12, 22 mar. 2016.

HÜLLEIN, J. et al. MDM4 is targeted by 1q gain and drives disease in Burkitt lymphoma. **Cancer Research**, 18 abr. 2019.

INOUE, A. et al. Therapeutic experience with hepatoblastoma associated with trisomy 18. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 65, n. 8, p. e27093, ago. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Incidência, mortalidade e morbidade hospitalar por câncer em crianças, adolescentes e adultos jovens no Brasil: informações dos registros de câncer e do sistema de mortalidade**. Rio de Janeiro: INCA, 2016

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2017.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **International Childhood Cancer Day: Much remains to be done to fight childhood cancer**. Lyon, France, fev. 2016.

IRWIN, M. S.; PARK, J. R. Neuroblastoma. **Pediatric Clinics of North America**, v. 62, n. 1, p. 225–256, fev. 2015.

JOHNSON, K. J. et al. Pediatric cancer risk in association with birth defects: A systematic review. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0181246, 27 jul. 2017.

JIA, Deshui; et al. Exome sequencing of hepatoblastoma reveals novel mutations and cancer genes in the Wnt pathway and ubiquitin ligase complex. **Hepatology**, v. 60, n. 5, p.1686-1696, 19 set. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.27243>.

JIANG, Li-xin; et al. Tumor suppress genes screening analysis on 4q in sporadic colorectal carcinoma. **World Journal Of Gastroenterology**, v. 14, n. 36, 2008. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.14.5606>.

KATO, MOTOHIRO; et al. Hepatoblastoma in a Patient with Sotos Syndrome. **The Journal Of Pediatrics**, v. 155, n. 6, p.937-939, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.06.039>

KATOH, M. Multi-layered prevention and treatment of chronic inflammation, organ fibrosis and cancer associated with canonical WNT/ β -catenin signaling activation (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, 17 maio 2018.

KAWAGUCHI, K. et al. Jagged1 DNA Copy Number Variation Is Associated with Poor Outcome in Liver Cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 186, n. 8, p. 2055–2067, ago. 2016.

KIECHLE-SCHWARZ, M.; SCHERER, G.; KOVACS, G. Cytogenetic and molecular studies on six sporadic hepatoblastomas. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 41, n. 2, p. 286, set. 1989.

KIM, H.-Y. et al. Gene-based comparative analysis of tools for estimating copy number alterations using whole-exome sequencing data. **Oncotarget**, v. 8, n. 16, 18 abr. 2017a.

KIM, S. Y. et al. Genomic profiles of a hepatoblastoma from a patient with Beckwith-Wiedemann syndrome with uniparental disomy on chromosome 11p15 and germline mutation of APC and PALB2. **Oncotarget**, v. 8, n. 54, 3 nov. 2017b.

KING, Daniel A.; SIFRIM, Alejandro; FITZGERALD, Tomas W.; et al. Detection of structural mosaicism from targeted and whole-genome sequencing data. **Genome Research**, v. 27, n. 10, p. 1704–1714, 2017.

KOBOLDT, D. C. et al. VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. **Genome Research**, v. 22, n. 3, p. 568–576, 1 mar. 2012.

KOH, Kyung Nam et al. Prognostic implications of serum alpha-fetoprotein response during treatment of hepatoblastoma. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 57, n. 4, p.554–560, 2 mar. 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/pbc.23069>.

KREPISCHI, Ana Cristina Victorino; PEARSON, Peter Lees; ROSENBERG, Carla. Germline copy number variations and cancer predisposition. **Future Oncology**, v. 8, n. 4, p.441-450, abr. 2012. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/fon.12.34>.

KREPISCHI, A. C. V. et al. Genomic imbalances pinpoint potential oncogenes and tumor suppressors in Wilms tumors. **Molecular Cytogenetics**, v. 9, n. 1, 24 fev. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13039-016-0227-y>

KUMON, K. et al. Frequent Increase of DNA Copy Number in the 2q24 Chromosomal Region and Its Association with a Poor Clinical Outcome in Hepatoblastoma: Cytogenetic and Comparative Genomic Hybridization Analysis. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 92, n. 8, p. 854–862, ago. 2001.

LIU, B., et al. Computational methods for detecting copy number variations in cancer genome using next generation sequencing: principles and challenges. **Oncotarget**. 2013;4 (11):1868–81.

LIU, Y. et al. PROX1 promotes hepatocellular carcinoma proliferation and sorafenib resistance by enhancing β -catenin expression and nuclear translocation. **Oncogene**, v. 34, n. 44, p. 5524–5535, out. 2015.

LIU, J.; DANG, H.; WANG, X. W. The significance of intertumor and intratumor heterogeneity in liver cancer. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 1, p. e416, 5 jan. 2018.

LONIGRO, Robert J. et al. Detection of Somatic Copy Number Alterations in Cancer Using Targeted Exome Capture Sequencing. **Neoplasia**, v. 13, n. 11, p.1019-21, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1593/neo.111252>.

LU, T.-P. et al. Integrated Analyses of Copy Number Variations and Gene Expression in Lung Adenocarcinoma. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24829, 14 set. 2011.

LUO, MINJIE; CONRAD, MAIRE; LIN, HENRY C. Genetics of pediatric hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma and their clinical application. **Am J Digest Dis**, v. 1, n. 2, p.97-111, dez. 2014.

LV, X.-J. et al. Long noncoding RNA PCAT6 regulates cell growth and metastasis via Wnt/ β -catenin pathway and is a prognosis marker in cervical cancer. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, n. 5, p. 1947–1956, mar. 2019.

MA, S. et al. Cytogenetic Characterization of Childhood Hepatoblastoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 119, n. 1, p. 32–36, maio 2000.

MARIANO, Fernanda Viviane et al. Genomic copy number alterations of primary and secondary metastasizing pleomorphic adenomas. **Histopathology**, v. 67, n. 3, p.410-415, 12 mar. 2015. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/his.12655>.

MARRANO, P.; IRWIN, M. S.; THORNER, P. S. Heterogeneity of MYCN amplification in neuroblastoma at diagnosis, treatment, relapse, and metastasis: MYCN HETEROGENEITY IN NEUROBLASTOMA. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 56, n. 1, p. 28–41, jan. 2017.

MARIS, John M.; DENNY, Christopher T. Focus on embryonal malignancies. **Cancer Cell**.2002;2:447–50.

MARIS, John M. Defining Why Cancer Develops in Children. New England **Journal Of Medicine**, v. 373, n. 24, p.2373-2375, 10 dez. 2015. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS). <http://dx.doi.org/10.1056/nejme1513921>.

MARSHALL, Glenn M.; et al. The prenatal origins of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 4, p.277-289, 6 mar. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3679>.

MARUSYK, A.; POLYAK, K. Tumor heterogeneity: Causes and consequences. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1805, n. 1, p. 105–117, jan. 2010.

MASCARELLO, J. T. et al. Hepatoblastoma characterized by trisomy 20 and double minutes. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 47, n. 2, p. 243–247, jul. 1990.

MATEOS, Marion K.; et al. Down syndrome and leukemia: insights into leukemogenesis and translational targets. **Translational Pediatrics**, v. 4, n. 2, p.76-92, abr. 2015.

MCGRANAHAN, N.; SWANTON, C. Biological and Therapeutic Impact of Intratumor Heterogeneity in Cancer Evolution. **Cancer Cell**, v. 27, n. 1, p. 15–26, jan. 2015.

MEYERS, Rebecka L. et al. Hepatoblastoma state of the art: pre-treatment extent of disease, surgical resection guidelines and the role of liver transplantation. **Current Opinion In Pediatrics**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.29-36, fev. 2014. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/mop.0000000000000042>.

MEYERS, R. L. et al. Risk-stratified staging in paediatric hepatoblastoma: a unified analysis from the Children's Hepatic tumors International Collaboration. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 1, p. 122–131, jan. 2017.

MIYAMOTO, K.; TAKETA, K.; YABE, T.; MIYANO, K.; SATO, J. Chromosome analysis in a human hepatoblastoma cell line producing alpha-fetoprotein. **Acta Med Okayama** v. 34, p. 127-130, 1980.

MOLICA, M.; MASSARO, F.; BRECCIA, M. Diagnostic and prognostic cytogenetics of chronic myeloid leukaemia: an update. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 17, n. 11, p. 1001–1008, 2 nov. 2017.

MOORE, Sam W. Developmental genes and cancer in children. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 52, n. 7, p.755-760, 1 jul. 2009. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/pbc.21831>

MÜLLAUER, Leonhard. Next generation sequencing: clinical applications in solid tumours. **Memo - Magazine Of European Medical Oncology**, v. 10, n. 4, p.244-247, 3 nov. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12254-017-0361-1>.

MUSSA, Alessandro et al. Cancer Risk in Beckwith-Wiedemann Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis Outlining a Novel (Epi)Genotype Specific Histotype Targeted Screening Protocol. **The Journal Of Pediatrics**, v. 176, p.142-149, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.05.038>.

NAGATA, T. et al. Karyotypic analyses of hepatoblastoma. Report of two cases and review of the literature suggesting chromosomal loci responsible for the pathogenesis of this disease. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 114, n. 1, p. 42–50, 1 out. 1999.

NAGATA, T. et al. Cytogenetic abnormalities in hepatoblastoma: report of two new cases and review of the literature suggesting imbalance of chromosomal regions on chromosomes 1, 4, and 12. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 156, n. 1, p. 8–13, jan. 2005.

NEAS, K. et al. Chromosome 7 aberrations in a young girl with myelodysplasia and hepatoblastoma: an unusual association. **Clinical Dysmorphology**, v. 15, n. 1, p. 1–

8, jan. 2006.

NEWMAN, Erika A.; NUCHTERN, Jed G. Recent biologic and genetic advances in neuroblastoma: Implications for diagnostic, risk stratification, and treatment strategies. **Seminars In Pediatric Surgery**, v. 25, n. 5, p.257-264, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2016.09.007>.

NGEOW, J.; ENG, C. Precision medicine in heritable cancer: when somatic tumour testing and germline mutations meet. **npj Genomic Medicine**, v. 1, p. 15006, 13 jan. 2016.

NORD, A.S.; LEE, M.; KING, M.C.; WALSH, T. Accurate and exact CNV identification from targeted high-throughput sequence data. **BMC Genomics**, 2011. 12, 184.

ORTIZ, M. V.; DUNKEL, I. J. Retinoblastoma. **Journal of Child Neurology**, v. 31, n. 2, p. 227–236, fev. 2016.

PÅHLMAN, Sven et al. Notch signaling in neuroblastoma. **Seminars In Cancer Biology**, v. 14, n. 5, p.365-373, out. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2004.04.016>.

PAI, S. G. et al. Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 10, n. 1, dez. 2017.

PARADA, L. A. et al. Cytogenetic Abnormalities and Clonal Evolution in an Adult Hepatoblastoma: **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 21, n. 11, p. 1381–1386, nov. 1997.

PARADA, L. A. et al. Cytogenetics of hepatoblastoma: further characterization of 1q rearrangements by fluorescence in situ hybridization: an international collaborative study. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 34, n. 3, p. 165–170, mar. 2000.

PARK, J. P. et al. Trisomy 2 and 19, and tetrasomy 1q and 14 in hepatoblastoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 115, n. 1, p. 86–87, nov. 1999.

PARSA, N. Environmental Factors Inducing Human Cancers. **Iranian Journal of Public Health**. 41(11):1-9, 2012.

PENG, J.; XIA, B.; YI, C. Single-base resolution analysis of DNA epigenome via high-throughput sequencing. **Science China Life Sciences**, v. 59, n. 3, p. 219–226, mar. 2016.

PEREIRA, E. M. et al. Hepatoblastoma in a Mosaic Trisomy 18 Patient: **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 34, n. 4, p. e145–e148, maio 2012.

PETKOVIĆ, I.; NAKIĆ, M.; ČEPULIĆ, M. Cytogenetic analysis of hepatoblastoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 15, n. 3–4, p. 369–371, fev. 1985.

PLEASANCE, E.D., et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature*, 2010. 463: 191–196.

PROKURAT, A. et al. Transitional liver cell tumors (TLCT) in older children and adolescents: A novel group of aggressive hepatic tumors expressing beta-catenin. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 39, n. 5, p. 510–518, nov. 2002.

RASMUSSEN, M. et al. Allele-specific copy number analysis of tumor samples with aneuploidy and tumor heterogeneity. **Genome Biology**, v. 12, n. 10, p. R108, 2011.

RENNERT, H. et al. Development and validation of a whole-exome sequencing test for simultaneous detection of point mutations, indels and copy-number alterations for precision cancer care. **npj Genomic Medicine**, v. 1, n. 1, nov. 2016.

RODE, A. et al. Chromothripsis in cancer cells: An update: Chromothripsis in Cancer Cells. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 10, p. 2322–2333, 15 maio 2016.

RODRIGUES, Tatiane Cristina et al. Upregulated genes at 2q24 gains as candidate oncogenes in hepatoblastomas. **Future Oncology**, v. 10, n. 15, p.2449-2457, dez. 2014. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/fon.14.149>.

RODRIGUES, T. C. **Anomalias genéticas e epigenéticas no tumor embrionário hepatoblastoma**. 2015. Tese (Doutorado em Biologia/Genética) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RODRIGUEZ, E. et al. Abnormalities of 2q: A common genetic link between rhabdomyosarcoma and hepatoblastoma? **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 3, n. 2, p. 122–127, mar. 1991.

SAINATI, L. et al. Cytogenetic Analysis of Hepatoblastoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 104, n. 1, p. 39–44, jul. 1998.

SAINATI, L. et al. Fluorescence in situ hybridization improves cytogenetic results in the analysis of hepatoblastoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 134, n. 1, p. 18–20, abr. 2002.

SALETTA, Federica; POZZA, Luciano dalla; BYRNE, Jennifer A. Genetic causes of cancer predisposition in children and adolescents. **Translational Pediatrics**, Westmea, p.67-75, abr.2015.

SANDOVAL, C. et al. Fetal-type hepatoblastoma and del (3)(q11.2q13.2). **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 134, n. 2, p. 162–164, abr. 2002.

SANTIAGO, L. et al. Wnt signaling pathway protein LEF1 in cancer, as a biomarker for prognosis and a target for treatment. **American Journal of Cancer Research**, v. 7, n. 6, p. 1389–1406, 2017.

SCHNEIDER, N. R., COOLEY, L. D., FINEGOLD, M. J., DOUGLASS, E. C. and TOMLINSON, G. E. (1997), The first recurring chromosome translocation in hepatoblastoma: Der(4)t(1;4)(q12;q34). **Genes Chromosomes & Cancer**, 19: 291–294. doi:10.1002/(SICI)1098-2264(199708)19:4<291::AID-GCC13>3.0.CO;2-J

SHARMA, Divya; SUBBARAO, Girish; SAXENA, Romil. Hepatoblastoma. **Seminars In Diagnostic Pathology**, v. 34, n. 2, p.192-200, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.semdp.2016.12.015>.

SILVA, Amanda Gonçalves et al. Array-CGH as an adjuvant tool in cytogenetic diagnosis of pediatric MDS and JMML. **Medical Oncology**, v. 30, n. 4, 2 out. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12032-013-0734-1>.

SONG, Jinming; SHAO, Haipeng. SNP Array in Hematopoietic Neoplasms: A Review. **Microarrays**, v. 5, n. 1, p.1-0, 22 dez. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microarrays5010001>.

SOUKUP, S. W.; LAMPKIN, B. L. Trisomy 2 and 20 in two hepatoblastomas. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 3, n. 3, p. 231–234, maio 1991.

SPECTOR, L. G.; BIRCH, J. The epidemiology of hepatoblastoma. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 59, n. 5, p. 776–779, nov. 2012.

SPECTOR, Logan G.; PANKRATZ, Nathan; MARCOTTE, Erin L. Genetic and Nongenetic Risk Factors for Childhood Cancer. **Pediatric Clinics Of North America**, v. 62, n. 1, p.11-25, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcl.2014.09.013>.

STEENMAN, M. et al. Comparative genomic hybridization analysis of hepatoblastomas: additional evidence for a genetic link with Wilms tumor and rhabdomyosarcoma. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 86, n. 2, p. 157–161, 1999.

STEJSKALOVÁ, E. et al. Cytogenetic and array comparative genomic hybridization analysis of a series of hepatoblastomas. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 194, n. 2, p. 82–87, out. 2009.

STELIAROVA-FOUCHER, Eva; et al. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 6, p.719-731, jun. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045\(17\)30186-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(17)30186-9).

STEWART, B. W.; WILD, C. P. **World Cancer Report 2014**. Lyon: International Agency for Research on Cancer/World Health Organization, 2014.

SUMAZIN, Pavel et al. Genomic analysis of hepatoblastoma identifies distinct molecular and prognostic subgroups. **Hepatology**, v. 65, n. 1, p.104-121, 29 nov. 2016. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.28888>.

SURACE, C. et al. Fluorescent in situ hybridization (FISH) reveals frequent and recurrent numerical and structural abnormalities in hepatoblastoma with no informative karyotype. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 39, n. 5, p. 536–539, nov. 2002.

SUZUKI, M. et al. Whole-genome profiling of chromosomal aberrations in hepatoblastoma using high-density single-nucleotide polymorphism genotyping microarrays. **Cancer Science**, v. 99, n. 3, p. 564–570, mar. 2008.

SWARTS, S.; WISECARVER, J.; BRIDGE, J. A. Significance of extra copies of chromosome 20 and the long arm of chromosome 2 in hepatoblastoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 91, n. 1, p. 65–67, out. 1996.

TAN, R. et al. An Evaluation of Copy Number Variation Detection Tools from Whole-Exome Sequencing Data. **Human Mutation**, v. 35, n. 7, p. 899–907, jul. 2014.

TAN, Z. H. et al. Association of trisomy 18 with hepatoblastoma and its implications. **European Journal of Pediatrics**, v. 173, n. 12, p. 1595–1598, dez. 2014.

TANAKA, K. et al. Hepatoblastoma in a 2-Year-Old Girl with Trisomy 18. **European Journal of Pediatric Surgery**, v. 2, n. 05, p. 298–300, out. 1992.

TERADA, Y. et al. Comprehensive allelotyping of hepatoblastoma. **Hepato-Gastroenterology**, v. 56, n. 89, p. 199–204, fev. 2009.

TERAGUCHI, M. et al. Multiple hepatoblastomas associated with trisomy 18 in a 3-year-old girl. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 14, n. 5, p. 463–467, out. 1997.

TERRACCIANO, L. M. et al. Comparative genomic hybridization analysis of hepatoblastoma reveals high frequency of X-chromosome gains and similarities between epithelial and stromal components. **Human Pathology**, v. 34, n. 9, p. 864–871, set. 2003.

TOMLINSON, G. E. et al. Cytogenetic evaluation of a large series of hepatoblastomas: Numerical abnormalities with recurring aberrations involving 1q12-q21. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 44, n. 2, p. 177–184, out. 2005.

TOMLINSON, E. Gail. Cytogenetics of hepatoblastoma. **Frontiers In Bioscience**, v. 4, n. 1, p.1287-1292, jan. 2012. Frontiers in Bioscience. <http://dx.doi.org/10.2741/459>.

TOMLINSON, G. E.; KAPPLER, R. Genetics and epigenetics of hepatoblastoma. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 59, n. 5, p. 785–792, nov. 2012.

TONK, V. S. et al. Trisomy 2, trisomy 20, and del (17p) as sole chromosomal abnormalities in three cases of hepatoblastoma. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 11, n. 3, p. 199–202, nov. 1994.

TORREZAN, Giovana T. et al. Recurrent somatic mutation in DROSHA induces microRNA profile changes in Wilms tumour. **Nature Communications**, v. 5, 9 jun. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5039>.

TOWBIN, A. J. et al. 2017 PRETEXT: radiologic staging system for primary hepatic malignancies of childhood revised for the Paediatric Hepatic International Tumour Trial (PHITT). **Pediatric Radiology**, v. 48, n. 4, p. 536–554, abr. 2018.

TROBAUGH-LOTRARIO, A. D. et al. Small cell undifferentiated variant of hepatoblastoma: Adverse clinical and molecular features similar to rhabdoid tumors. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 52, n. 3, p. 328–334, mar. 2009.

TULLA, M.; et al. Incidence, Trends, and Survival of Children With Embryonal Tumors. **Pediatrics**, v. 136, n. 3, p.623-632, 24 ago. 2015. American Academy of Pediatrics (AAP). <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2015-0224>.

TYULKINA, D. V. et al. Expression of the FAP gene in non-fibroblast human cell lines. Development of cancer-associated fibroblast models. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, v. 470, n. 1, p. 319–321, set. 2016.

VALDÉS-MAS, Rafael et al. Estimation of Copy Number Alterations from Exome Sequencing Data. *Plos One*, v. 7, n. 12, p.51422-23, 19 dez. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051422>.

VALANEJAD, L. et al. PARP1 activation increases expression of modified tumor suppressors and pathways underlying development of aggressive hepatoblastoma. *Communications Biology*, v. 1, n. 1, dez. 2018.

VENKATRAMANI, Rajkumar; et al. Congenital abnormalities and hepatoblastoma: A report from the Children's Oncology Group (COG) and the Utah Population Database (UPDB). **American Journal Of Medical Genetics Part A**, v. 164, n. 9, p.2250-2255, 16 jun. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.36638>

VILLELA, Darine; et al. Efficient detection of chromosome imbalances and single nucleotide variants using targeted sequencing in the clinical setting. **European Journal Of Medical Genetics**, v. 60, n. 12, p.667-674, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.08.020>.

WANG, C.-H. et al. Long non-coding RNA BLACAT1 promotes cell proliferation, migration and invasion in cervical cancer through activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, n. 10, p. 3002–3009, maio 2018.

WANG, X. et al. Copy number alterations detected by whole-exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma. **Human Genomics**, v. 9, n. 1, dez. 2015.

WANG, Q. et al. Novel metrics to measure coverage in whole exome sequencing datasets reveal local and global non-uniformity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 885, dez. 2017.

WEBER, R. G. et al. Characterization of Genomic Alterations in Hepatoblastomas. **The American Journal of Pathology**, v. 157, n. 2, p. 571–578, ago. 2000.

WRAGE, M.; et al. Genomic Profiles Associated with Early Micrometastasis in Lung Cancer: Relevance of 4q deletion. *Clinical Cancer Research*, v. 15, n. 5, p.1566-1574, 17 fev. 2009. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-2188>

XHABIJA, B.; KIDDER, B. L. KDM5B is a master regulator of the H3K4-methylome in stem cells, development and cancer. **Seminars in Cancer Biology**, nov. 2018.

XIA. Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 4q in hepatocellular carcinoma using high-throughput SNP array. **Oncology Reports**, v. 23, n. 2, 28 dez. 2009. Spandidos Publications. http://dx.doi.org/10.3892/or_00000654.

XIAO, Q. et al. A rare CHD5 haplotype and its interactions with environmental factors predicting hepatocellular carcinoma risk. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, dez. 2018.

YAO, Ruen et al. Evaluation of three read-depth based CNV detection tools using whole-exome sequencing data. **Molecular Cytogenetics**, v. 10, n. 1, 23 ago. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13039-017-0333-5>.

YAVUZYIGITOGU, S. et al. Metastatic Disease in Polyploid Uveal Melanoma Patients Is Associated With BAP1 Mutations. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 57, n. 4, p. 2232, 26 abr. 2016.

YEH, Y. A. et al. Trisomy 1q, 2, and 20 in a case of hepatoblastoma: possible significance of 2q35-q37 and 1q12-q21 rearrangements. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 123, n. 2, p. 140–143, dez. 2000.

ZHAN, H. et al. Tumour-suppressive role of PTPN13 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance. **Tumor Biology**, v. 37, n. 7, p. 9691–9698, jul. 2016.

ZHANG, J. et al. Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 24, p. 2336–2346, 10 dez. 2015.

ZHAO, M. et al. Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: features and perspectives. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. S11, set. 2013.

ZHOU, Chenhao et al. Integrated Analysis of Copy Number Variations and Gene Expression Profiling in Hepatocellular carcinoma. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p.0-0, 5 set. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-11029-y>.

ZIOGAS, Demosthenes E.; KYROCHRISTOS, Ioannis D.; ROUKOS, Dimitrios H. Next-generation sequencing: from conventional applications to breakthrough genomic analyses and precision oncology. **Expert Review Of Medical Devices**, v. 15, n. 1, p.1-3, 28 dez. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17434440.2017.1419059>

ZIMMERMANN, Arthur. Hepatoblastoma and the Hepatoblastoma Family of Tumors. **Tumors And Tumor-like Lesions Of The Hepatobiliary Tract**, p.357-393, 20 out. 2016. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-26956-6_19.

APÊNDICE

APÊNDICE

Apêndice 1: Descrição completa das CNAs detectadas por aCGH

Tabela 9: Caracterização das CNAS encontradas em 18/25 tumores estudados (coordenadas genômicas de acordo com GRCh37/hg19).

HB	Cromossomo	Citobanda	CNA	Coordenadas genômicas (início)	Coordenadas genômicas (fim)	Tamanho (pb)	Genes câncer COSMIC (n)
HB15T	1	p36.33 - p36.32	Ganho	1474	2381824	2.380.351	0
	1	p36.31	Perda	5611219	6198875	587.657	0
	2	q11.1 - q36.2	Ganho	95331960	225204231	129.872.272	15
	2	q36.2	Perda	225204232	225636643	432.412	0
	2	q37.3	Perda	238249771	238373529	123.759	0
	6	p25.3 - q27	Ganho	1	171115067	171.115.067	21
	8	p23.3 - q24.3	Ganho	1	146364022	146.364.022	15
	9	p24.3 - q34.3	Ganho	1	141213431	141.213.431	21
	13	q11 - q34	Ganho	18530950	115169878	96.638.929	7
	17	p13.3 - q25.3	Ganho	1	81195210	81.195.210	27
	20	p13 - q13.33	Ganho	1	63025520	63.025.520	6

HB16T	1	q12 - q44	Ganho	142549425	249250621	106.701.197	17
HB17T	19	p13.3 - q13.43	Ganho	1	59128983	59.128.983	25
HB18T	2	q24.1 - q24.3	Amplificação	156730170	167063215	10.333.046	0
	2	q24.3	Perda	167063215	167396764	333.550	0
	X	p22.33 - q28	Ganho	1	155270560	155.270.560	21
HB28T	11	q21	Ganho	93086314	93615839	529.526	0
HB30T	1	p36.33 - p11.1	Perda	1	121602813	121.602.813	26
	1	q12 - q44	Ganho	141003030	249250621	108.247.592	17
	5	p15.33 - q35.3	Ganho	1	180915260	180.915.260	13
	11	p15.5 - q25	Perda	1	135006516	135.006.516	27
	12	p13.33 - q24.33	Ganho	1	133851895	133.851.895	21
	14	q11.1 - q32.33	Perda	18890613	107349540	88.458.928	15
	15	q11.1 - q26.3	Perda	19488482	102531392	83.042.911	9
	20	p13 - p11.1	Ganho	1	26376162	26.376.162	0
	21	p11.2 - q22.3	Ganho	9419669	48129895	38.710.227	5

HB31T	1	p36.13	Ganho	19813183	20114421	301.239	0
HB33T	1	p36.33 - p36.22	Perda	1	9235011	9.235.011	4
	1	q12 - q44	Ganho	140780676	249250621	108.469.946	17
	2	p25.3 - q37.3	Ganho	1	243199373	243.199.373	28
	6	p25.3 - p22.1	Ganho	1	29580778	29.580.778	4
	7	p22.3 - q21.2	Ganho	1	91614115	91.614.115	14
	12	p13.33 - q24.33	Ganho	1	133851895	133.851.895	21
	14	q11.1 - q32.33	Ganho	18907066	107349540	88.442.475	15
	17	q11.2 - q25.3	Ganho	30328070	81195210	50.867.141	19
	19	p13.2 - q13.43	Ganho	13740068	59128983	45.388.916	16
	20	p13 - q13.2	Ganho	1	53214441	53.214.441	4
	X	p22.33 - p22.2	Ganho	1	9671564	9.671.564	2
	X	p22.2	Perda	9671565	10197808	526.244	0
	X	p22.2 - p22.11	Ganho	10197809	23366188	13.168.380	1
HB36T	1	p36.22 - p35.3	Perda	9859720	29415504	19.555.785	4

	1	q31.3 - q44	Ganho	195774886	249250621	53.475.736	5
	2	q23.3 - q37.3	Ganho	152055371	238585911	86.530.541	12
	4	p14	Perda	39500234	40202974	702.741	0
	4	q21.22 - q25	Perda	83145880	113857636	30.711.757	2
HB39T	1	p36.33 - p11.1	Perda	1	122165138	122.165.138	26
	1	q12 - q44	Ganho	141884894	249250621	107.365.728	17
	4	p16.3 - q35.2	Perda	1	191154276	191.154.276	13
	20	p13 - q13.33	Ganho	35547	62989973	62.954.427	6
HB40T	4	p14	Perda	39371398	40821201	1.449.804	0
	4	q12 - q25	Perda	55038242	109498009	54.459.768	5
HB41T	1	q31.1 - q42.3	Ganho	186730642	235436151	48.705.510	4
	2	q24.2 - q32.3	Ganho	161003837	193617145	32.613.309	5
HB43T	1	q21.1 - q44	Ganho	144804311	249250621	104.446.311	17
	2	q23.3 - q37.3	Ganho	154320974	243199373	88.878.400	12
	8	p23.3 - q24.3	Ganho	1	146364022	146.364.022	15

	10	q26.13 - q26.2	Ganho	127100458	127568138	467.681	0
	10	q26.2 - q26.3	Ganho	129129244	130875169	1.745.926	0
HB44T	1	p36.33 - p34.3	Perda	1	36972878	36.972.878	11
	1	q21.3 - q44	Ganho	151031069	249250621	98.219.553	14
	4	p14	Perda	39452275	40193889	741.615	0
HB46T	1	p36.33 - p35.2	Perda	1	31851612	31.851.612	8
	1	p35.1	Perda	32637799	34142970	1.505.172	1
	1	p32.3	Perda	52532444	54497252	1.964.809	0
	1	p22.3	Perda	87286211	87556416	270.206	0
	1	p22.1 - p21.3	Perda	92158843	94925353	2.766.511	0
	1	p13.3 - p13.2	Perda	109275840	112888640	3.612.801	1
	1	p13.2	Perda	113185102	114515418	1.330.317	0
	1	p13.1 - p12	Perda	116594852	118542216	1.947.365	1
	1	p12	Perda	119770706	120524658	753.953	1
	1	q21.1 - q21.2	Perda	146420485	147386176	965.692	1

	2	p16.1 - q12.2	Perda	58025435	106577593	48.552.159	4
	2	q13	Perda	112569306	113365160	795.855	1
	2	q14.3	Perda	127900647	128872739	972.093	1
	2	q14.3	Perda	129058983	129378423	319.441	0
	2	q24.3 - q37.3	Ganho	168468419	243199373	74.730.955	12
	4	p16.3 - q35.2	Perda	1	191154276	191.154.276	13
	9	p24.3 - p21.3	Perda	13926	24606893	24.592.968	4
	9	p21.3 - p21.2	Perda	24969118	27047993	2.078.876	0
	9	p21.1	Perda	28539067	28920899	381.833	0
	9	p21.1 - p13.3	Perda	29902154	33581101	3.678.948	0
	9	p13.2	Perda	36729839	37704326	974.488	1
	11	q14.1 - q25	Perda	83524969	135006516	51.481.548	14
	18	q12.2	Perda	32927087	34403221	1.476.135	0
	18	q12.2 - q12.3	Perda	34508873	37506100	2.997.228	0
	18	q12.3	Perda	38881073	39281160	400.088	0

	18	q12.3 - q22.1	Perda	40836221	64544147	23.707.927	2
	18	q22.2 - q23	Perda	67761977	74457664	6.695.688	0
HB66T	1	q12 - q44	Ganho	141705937	249250621	107.544.685	17
	2	p25.3 - p11.1	Ganho	1	92725762	92.725.762	13
	2	q11.1 - q24.2	Ganho	95409944	161629501	66.219.558	3
	2	q24.2 - q31.1	Amplificação	161701914	170112055	8.410.142	0
	2	q31.1 - q37.3	Ganho	170112056	243199373	73.087.318	12
	3	p26.1	Perda	6127963	6694944	566.982	0
	3	p26.1 - p25.3	Perda	7725055	9624570	1.899.516	1
	3	p25.3 - p25.2	Perda	11439033	12428662	989.630	1
	5	q22.3 - q23.1	Perda	114477996	119721793	5.243.798	0
	13	q32.1	Perda	95409990	95604953	194.964	0
HB70T	1	p36.33 - p11.2	Perda	1	121269398	121.269.398	26
	1	q21.1 - q44	Ganho	142652422	249250621	106.598.200	17
	2	p25.3 - q37.3	Ganho	1	243199373	243.199.373	28

	3	q27.2 - q29	Ganho	185949858	198022430	12.072.573	4
	4	p16.3 - q35.2	Perda	1	191154276	191.154.276	13
	6	p25.3 - p11.1	Ganho	1	59644169	59.644.169	11
	7	p22.3 - p11.2	Ganho	1	57982841	57.982.841	10
	7	q11.21 - q36.3	Ganho	62111650	159138663	97.027.014	12
	8	p23.3 - p11.1	Ganho	1	44247668	44.247.668	5
	8	q13.2 - q24.3	Ganho	69257084	146364022	77.106.939	7
	9	p24.3 - q34.3	Perda	1	141213431	141.213.431	21
	10	q21.3	Perda	67703892	67958123	254.232	0
	11	p15.5 - q23.3	Perda	1	120036248	120.036.248	25
	11	q23.3 - q24.1	Perda	120036249	121677897	1.641.649	1
	11	q24.1 - q25	Perda	121677898	135006516	13.328.619	1
	12	q11 - q24.33	Ganho	38095043	133851895	95.756.853	16
	13	q31.3	Perda	94002373	94494329	491.957	0
	14	q13.3 - q21.1	Perda	37773192	38010052	236.861	0

	16	p13.3 - q24.3	Perda	1	90354753	90.354.753	18
	18	p11.32 - q23	Perda	1	78077248	78.077.248	4
	19	p13.3 - p11	Ganho	1	24545365	24.545.365	13
	19	q11 - q13.43	Ganho	27213339	59128983	31.915.645	12
	20	p13 - q13.33	Ganho	1	63025520	63.025.520	6
	X	q26.2	Perda	132723625	133051305	327.681	1
HB79T	1	q12 - q44	Ganho	141808300	249250621	107.442.322	17

Apêndice 2: Perfil genômico da coorte de hepatoblastomas

Figura 22: Grupo de HBs sem CNAs detectáveis pela técnica de aCGH. Cromossomos representados por cores distintas, posicionados do cromossomo 1-22, X (cromossomo Y não avaliado), sondas plotadas de acordo com o mapeamento genômico, do braço curto ao longo; Eixo Y representa valores de número de cópias em $\log_2$ da razão amostra tumoral/controle.

Figura 23: Grupo de HBs com poucas alterações envolvendo cromossomos ou braços cromossômicos inteiros e/ou CNAs focais. Cromossomos representados por cores distintas, posicionados do cromossomo 1-22, X (cromossomo Y não avaliado), sondas plotadas de acordo com o mapeamento genômico, do braço curto ao longo; Eixo Y representa valores de número de cópias em $\log_2$ da razão amostra tumoral/controle.

HB40T

HB41T

HB43T

HB44T

HB66T

HB79T

Figura 24: Grupo de HBs com genomas complexos, apresentando mais de seis CNAs > 3 Mb. Cromossomos representados por cores distintas, posicionados do cromossomo 1-22, X (cromossomo Y não avaliado), sondas plotadas de acordo com o mapeamento genômico, do braço curto ao longo; Eixo Y representa valores de número de cópias em $\log_2$ da razão amostra tumoral/controle

Apêndice 3: Perfil genômico da amostra HB17T.

Figura 25: Comparação do perfil genômico de CNAs por aCGH, NGS e SNP-array da amostra HB17T, ganho do cromossomo 19 identificado apenas pela técnica de aCGH. Cromossomos representados por cores distintas, posicionados do cromossomo 1-22, X (cromossomo Y não avaliado), sondas plotadas de acordo com o mapeamento genômico, do braço curto ao longo; Eixo Y representa valores de número de cópias em $\log_2$ da razão amostra tumoral/controle.

HB17T - aCGH 180 K

HB17T - NGS (244k Agilent V3)

HB17T - SNP-array 850 K