Tatiane Cristina Rodrigues

**Anomalias genéticas e epigenéticas no tumor
embrionário hepatoblastoma**

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

São Paulo

2014

Orientadora:

Dra. Carla Rosenberg

Co-orientadora:

Dra. Ana Cristina Victorino Krepischi

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica

RODRIGUES, TATIANE CRISTINA.

Anomalias genéticas e epigenéticas no tumor embrionário Hepatoblastoma.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Hepatoblastoma 2. Tumor embrionário 3. Alteração em número de cópias
4. Mutação pontual somática 5. Metilação de citosinas

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tatiane Cristina Rodrigues

Anomalias genéticas e epigenéticas no tumor embrionário hepatoblastoma

Tese apresentada ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências, na área de concentração Biologia/Genética.

Orientadora: Dra. Carla Rosenberg

Co-orientadora: Dra. Ana C. V. Krepischi

Data de aprovação: ____ / ____ /2015.

Banca Examinadora

Dr.
Instituição:

Dr.
Instituição:

Dr.
Instituição:

Dr.
Instituição:

Dra. Carla Rosenberg
(presidente)

Este trabalho foi realizado com os auxílios financeiros da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) concedidos à aluna (Bolsa CAPES-DS e Bolsa FAPESP nível Doutorado Direto - Processo 2011/24007-9), à orientadora (Projeto temático – Processo 2009/00898-1, Projetos CEPID 1998/14254-2 e 2013/08028-1), e ao departamento (programa CAPES-PROEX).

Dedico este trabalho:

À minha família, de sangue e de escolha;

Aos pequenos probandos, motivação deste estudo.

Agradecimentos

Este trabalho é fruto da colaboração preciosa de inúmeras pessoas. Minha sincera gratidão, em especial, aos abaixo citados.

Aos pequenos pacientes guerreiros e seus responsáveis, minha enorme gratidão por permitir tamanha invasão às suas vidas pela pesquisa e por me lembrar dos verdadeiros motivos para este trabalho ser desenvolvido.

À Dra. Carla Rosenberg, pela oportunidade de ingressar em seu grupo, pelo convite para a continuidade dos estudos, pelos ensinamentos, orientação e exemplos. Pela confiança em meu trabalho e incentivo na extração de meu melhor, agradeço de coração.

À Dra. Ana C. V. Krepischi, pelos ensinamentos, pela orientação, pelo rigor, pelo acompanhamento sempre próximo, pela disponibilidade. Pelas conversas francas, pela paciência e pelos exemplos, meu muito obrigada.

À Dra. Dirce Carraro, pelas valiosas sugestões, pelo acompanhamento e por permitir que eu desenvolvesse parte dos procedimentos experimentais em seu laboratório.

Ao Departamento de Oncologia Pediátrica do A. C. Camargo Cancer Center (ACCCC), especialmente à Dra. Cecilia M. Costa Lima, pelo acompanhamento com toda atenção e doçura aos pacientes e familiares, além das discussões científicas valiosas.

À equipe do Biobanco do A. C. Camargo Cancer Center, à MSc. Eloisa Olivieri. Ao Departamento de Patologia Molecular do ACCCC, à Dra. Isabela Werneck.

À equipe do GRAACC, Dra. Silvia Toledo, pela colaboração e sugestões, e à Dra. Monica Cypriano pelo auxílio com a recuperação dos dados clínicos.

À Dra. Helena Brentani, pelo apoio com as análises de metilação. Ao mestrando Henrique Vieira, pelo auxílio na bioinformática e pela paciência.

Ao Dr. Jorge Estéfano de Souza, pelo auxílio nas análises de sequenciamento.

Ao Dr. Paulo Otto, pelo auxílio nas análises estatísticas, ensinamentos e exemplo.

Aos professores Ângela Morgante, Oswaldo Keith e Lygia da Veiga, pelas valiosas sugestões e motivação durante o desenvolvimento deste projeto.

À Ligia Vieira, pela amizade, pela paciência, por compartilhar comigo sua vasta experiência e pelas saídas estratégicas que aliviaram nossas tardes.

Aos colegas do Laboratório de Investigação Genética Humana (USP). À Dra. Amanda Gonçalves pelas sempre valiosas discussões, além da preciosa amizade, e todas as oportunidades, sou extremamente grata. À Dra. Erika Freitas, e Paula Queiroz, pela amizade, risadas e paciência. Ao Alexsandro Santos, pelos papos, amizade, piadas, e a extremamente cuidadosa revisão deste texto, agradeço muito.

Aos colegas do Laboratório de Microarrays (CIPE), agradeço pelas discussões e risadas, especialmente à Erica Araújo pela colaboração e ensinamentos e à Talita Aguiar pela revisão deste texto. Ao MSc. Felipe Fidalgo, pela parceria extremamente valiosa, em todos os sentidos. Pelos auxílios científicos e pela amizade, pelo exemplo e companheirismo, muita gratidão.

Aos membros do laboratório de Genômica e Biologia Molecular do ACCCC pelo auxílio experimental e ensinamentos. Especialmente às Dras. Mariana Maschietto, Elisa Ferreira e Giovana Torrezan.

Ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva (IB-USP) pelo apoio e infraestrutura. Às funcionárias Deisy, Helenice e Camila, e aos funcionários José Luiz e Alexandre, dentre toda a equipe formidável. Ao Centro de Estudos do Genoma Humano, pela estrutura e apoio.

Por fim, porém nada menos importante, aos meus familiares, pelo apoio, paciência, conselhos e amor incondicional. Aos meus pais e minha avó que me inspiram mais do que imaginam, obrigada sempre. Ao meu companheiro de rotina, Rod, por dividir o peso de qualquer fardo e potencializar o motivo para todas as comemorações, muitíssimo obrigada. Aos meus filhotes, pelos incentivos diários e por me mostrarem como a felicidade está bem mais próxima do que costumamos imaginar. Ao meu irmão e aos meus amigos, que auxiliaram em todos os requisitos para que esta etapa fosse cumprida com o máximo de leveza possível.

"You must have chaos within you to give birth to a dancing star."

Friedrich Nietzsche

*"Mother Nature is a serial killer. No one's better. More creative.
Like all serial killers, she can't help but the urge to want to get caught.
But what good are all those brilliant crimes if no one takes the credit?*

So she leaves crumbs.

*Now the hard part, while you spent decades in school, is seeing the crumbs for the clues they are.
Sometimes the thing you thought was the most brutal aspect of the virus, turns out to be the chink in its
armor. And she loves disguising her weaknesses as strengths."*

World War Z

Sumário

Resumo.....	- 2 -
Abstract.....	- 3 -
Capítulo I. Introdução	- 5 -
I. 1. Caracterização de tumores embrionários	- 5 -
I. 2. Hepatoblastoma: aspectos epidemiológicos, clínicos e etiológicos	- 9 -
I.3. Aspectos moleculares de tumores	- 15 -
I.3.1. Alterações no número de cópias de sequências de DNA	- 18 -
Alterações citogenéticas em Hepatoblastomas	- 24 -
I.3.2. Mutações somáticas em regiões codificadoras	- 28 -
Mutações somáticas em hepatoblastomas	- 31 -
I.3.3 Alterações no padrão de metilação de citosinas	- 32 -
Metilação de DNA em hepatoblastomas	- 39 -
Capítulo II. Objetivos	- 42 -
II.1. Objetivos específicos	- 42 -
Capítulo III. Casuística e Métodos	- 45 -
III. 1. Aspectos éticos	- 45 -
III. 2. Casuística	- 45 -
III. 3. Extrações de DNA e RNA	- 47 -
III. 4. Alterações no número de cópias de sequências de DNA	- 48 -
Array-CGH	- 48 -
PCR quantitativo em tempo real	- 51 -

III. 5. Mutações somáticas em regiões codificadoras	- 55 -
III. 6. Alterações no padrão de metilação de citosinas	- 64 -
Conversão de DNA por tratamento por bissulfito	- 64 -
Microarranjo de metilação de DNA	- 64 -
Pirosequenciamento das regiões LINE-1e genes candidatos	- 66 -
Análise de expressão gênica de candidatos	- 68 -
Capítulo IV. Alterações no número de cópias de sequências de DNA	- 71 -
Capítulo V. Mutações somáticas em regiões codificadoras do genoma	- 92 -
Capítulo VI. Alterações no padrão de metilação de citosinas	- 103 -
Capítulo VII. Limitações e perspectivas do estudo	- 129 -
Capítulo VIII. Conclusões	- 132 -
Alterações em número de cópias de sequências de DNA	- 132 -
Mutações somáticas em regiões codificadoras do genoma	- 132 -
Alterações no padrão de metilação de citosinas	- 133 -
Apêndice	- 136 -
Item I. "Termo de Informação e Consentimento para Guarda de Material Biológico para Pesquisas"	- 136 -
Item II. Lista de genes selecionados para enriquecimento de cobertura nas lâminas de array-CGH customizadas	- 137 -
Biografia	- 155 -

Resumo / Abstract

Resumo

RODRIGUES, T. C. **Anomalias genéticas e epigenéticas no tumor embrionário hepatoblastoma**. 2014. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Os tumores malignos hepáticos são raros nas crianças, sendo o tumor embrionário hepatoblastoma a neoplasia hepática mais comum em crianças abaixo dos 5 anos e, ainda assim, responsável por apenas 1% dos tumores incidentes nessa faixa etária. Devido, entre outros fatores, à sua baixa incidência, o hepatoblastoma é um tumor ainda pouco caracterizado a nível molecular. O presente trabalho contemplou três frentes de análises moleculares em hepatoblastomas: análise de alterações em número de cópias (através da técnica *array-CGH*), investigação de mutações somáticas em regiões codificadoras (sequenciamento de exoma por *next-generation*) e delineamento de perfil global de metilação de DNA (*beadarrays*). Encontramos um baixo número de alterações em número de cópias, na maioria ganhos de grande extensão cromossômica, evidenciando uma baixa instabilidade cromossômica em comparação ao encontrado em outros tumores sólidos de adultos. Uma região em 2q24 previamente associada a um pior prognóstico em hepatoblastomas foi encontrada como ganho de alta amplitude (amplicon). A análise de expressão gênica na área destacou 5 dos 48 genes como super-expressos em nossas amostras de hepatoblastomas (*DAPL1*, *ERMN*, *GALNT5*, *SCN1A* e *SCN3A*). Foi observada também uma baixa ocorrência de mutações somáticas não-sinônimas, quando comparada à magnitude de variações encontradas em outros tumores sólidos de adultos. Descrevemos uma nova mutação não-sinônima danosa no exon 3 do gene *CTNNB1* (beta-catenina), marcador molecular de destaque em hepatoblastomas, que provavelmente desenvolve um papel importante na tumorigênese deste tipo de neoplasia. Dentre a lista de alterações somáticas encontradas, cabe destacar o enriquecimento da via Wnt, via da beta-catenina, já bem estudada em hepatoblastomas e que apresenta correlação tanto com desenvolvimento embrionário como com o processo de carcinogênese. Destacamos uma lista de mutações somáticas não-sinônimas presentes com boa cobertura em nossos experimentos, e ausentes ou presentes em baixa frequência (< 1%) na população. O presente estudo é o pioneiro na análise de alterações globais no padrão de metilação de citosinas em hepatoblastomas, e revelou um padrão incomum de hipometilação global nos tumores, não associado à metilação de regiões repetitivas LINE-1; especificamente, hepatoblastomas apresentam um nível intermediário entre o encontrado para os fígados maduros e aquele encontrado para os fígados fetais. Tal achado dá suporte ao modelo no qual a tumorigênese do hepatoblastoma recapitularia fases do desenvolvimento fetal do fígado. Foram destacados 11 genes que apresentaram padrão de metilação de DNA diferencial em seus promotores. Em suma, nossos achados revelam que o tumor embrionário hepatoblastoma apresenta relativa estabilidade genética, com uma frequência menor de alterações (alterações em número de cópias e mutações somáticas em regiões codificadoras) que tumores sólidos de adultos. Simultaneamente, foi detectado um padrão marcante de hipometilação global de DNA associado ao tumor, evidenciando a importância de aspectos epigenéticos em sua tumorigênese.

Palavras-chave: 1. Hepatoblastoma; 2. Tumor embrionário; 3. Alteração em número de cópias; 4. Mutação pontual somática; 5. Metilação de citosinas.

Abstract

Hepatic malignant tumors are rare in children, the embryonal tumor hepatoblastoma is the most common liver cancer in children under 5 years old but, in spite of that, accounts for only 1% of incident tumors in this age group. Due to its low incidence, among other factors, hepatoblastoma is a tumor poorly characterized at molecular level. This study included three approaches of molecular analyzes in hepatoblastomas: examination of copy number alterations (through array-CGH technique), investigation of somatic mutations in coding regions (next-generation exome sequencing) and determination of the global DNA methylation profile (bead arrays). We found a low frequency of copy number alterations, mostly consisting of large extent chromosomal gains, reflecting lower chromosomal instability than other solid adult tumors. A region at 2q24, previously associated with worse prognosis in hepatoblastomas, was found amplified in high amplitude (amplicon). Gene expression analysis of the 48 genes comprised in the amplicon segment highlighted five genes as overexpressed (*DAPL1*, *ERMN*, *GALNT5*, *SCN1A* and *SCN3A*). We also observed a low frequency of non-synonymous somatic mutations in our hepatoblastomas samples compared to the amount of variation found in other adult solid tumors. We described a predicted harmful non-synonymous mutation in exon 3 of *CTNNB1* gene (beta-catenin), the best characterized molecular marker in hepatoblastomas. The list of somatic alterations points to a remarkable enrichment of genes from the Wnt pathway, which is well-studied in hepatoblastomas and is associated both with embryonic development and with the process of carcinogenesis. We highlighted a list of non-synonymous somatic mutations that presented high coverage in our experiments, and were absent or present at low frequency (<1%) in the general population. This study is the first to analyze global changes in cytosine methylation in hepatoblastomas, and revealed an unusual pattern of global hypomethylation in these tumors, not associated with LINE-1 repetitive regions; specifically, hepatoblastomas exhibited an intermediate level of methylation, in between the patterns of mature and fetal livers. This finding supports the model in which the oncogenesis of hepatoblastoma recapitulates stages of fetal liver development. We highlighted 11 genes that showed differential pattern of DNA methylation in their promoters compared to differentiated liver. In summary, our findings show that the embryonal tumor hepatoblastoma are relatively genetically stable with lower frequency of alterations (changes in copy number and somatic mutations in coding regions) than most solid adult tumors. Simultaneously, a clear pattern of global hypomethylation of non-repetitive DNA was associated with the tumor, indicating the importance of epigenetic aspects in its tumorigenesis.

Capítulo I.

Introdução

Capítulo I. Introdução

I. 1. Caracterização de tumores embrionários

O perfil de mortalidade e morbidade da população mundial vem se modificando ao longo das últimas décadas em decorrência de avanços na saúde básica. Como resultado do aumento de longevidade, o câncer tem se tornado um dos fatores mais relevantes para a saúde (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2009), responsável por até 25% do número total de óbitos no mundo em 2013 (SIEGEL; NAISHADHAM; e JEMAL, 2013). No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, válida também para 2015, aponta para a ocorrência de cerca de 576 mil casos novos de câncer (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA, 2014). A projeção é que com o crescimento populacional e aumento da expectativa de vida seja alcançada a marca de 12 milhões de vítimas fatais decorrentes de câncer no ano de 2030 no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

A população do Brasil é jovem; as informações do último censo mostram que cerca de 30% da população brasileira encontra-se abaixo dos 19 anos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA, 2014). Nesse cenário, o câncer pediátrico vem se destacando como uma das mais importantes causas de óbito na infância, sobretudo devido às atuais políticas de prevenção de outras doenças infantis (DE CAMARGO et al., 2010). No Brasil, em 2011, ocorreram 2.812 óbitos em consequência de câncer em crianças e adolescentes (de 1 a 19 anos), ocupando a segunda posição (7%) de óbitos na faixa etária, atrás somente de óbitos por causas externas (acidentes e violência). De acordo com os "Registros de Câncer de Base Populacional Brasileiros", as neoplasias pediátricas representam apenas 2% a 3% de todas as neoplasias e, portanto, é uma doença rara (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2008). Estima-se que, ao longo do ano de 2014 no Brasil, ocorrerão aproximadamente 11.800 casos de câncer em crianças e adolescentes até os 19 anos. O tipo de câncer

pediátrico mais comum na maioria das populações é a leucemia (entre 25 e 35% dos tumores pediátricos) (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2008).

Apesar de o câncer em crianças e jovens apresentar algumas das características tumorais clássicas, as neoplasias pediátricas exibem peculiaridades quanto aos locais primários de acometimento, características histológicas e anatomopatológicas e possíveis fatores de risco, devendo ser estudadas separadamente daquelas que acometem os adultos (DEHNER, 1998). O câncer pediátrico geralmente apresenta um padrão de manifestação multifatorial, assim como os demais tipos tumorais, porém a caracterização da janela de exposição ambiental nesses casos torna-se mais problemática, tendo em vista a maior possibilidade de envolver fatores relacionados ao período gestacional, além do período de vida autônoma (ANDERSON et al., 2000a;INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2009). Contudo, poucos estudos associaram a exposição ambiental ao câncer na infância, sendo mais estudadas as exposições durante a vida intrauterina (ANDERSON, 2006;BUNIN, 2004;LI et al., 2012;STILLER, 2004). Assim, os tumores pediátricos possivelmente refletem majoritariamente os riscos inerentes ao processo normal de desenvolvimento e homeostase, com o envolvimento predominante de fatores genéticos e epigenéticos (MARIS e DENNY, 2002).

De fato, há um grupo de neoplasias denominadas de tumores embrionários, cujo modelo de origem pressupõe a ocorrência de falhas em algum ponto do processo normal de diferenciação ao longo do desenvolvimento fetal ou pós-natal (MARIS e DENNY, 2002;MASCHIETTO et al., 2008). As etapas envolvidas na tumorigênese de neoplasias embrionárias ainda são pouco conhecidas. O processo, presumivelmente, tem início em órgãos e estruturas que são acometidos por alterações moleculares durante os processos de divisão e diferenciação celular em larga escala, comuns ao crescimento e desenvolvimento. Essas falhas, caso sejam irreversíveis, podem resultar em letalidade, malformações congênitas ou doenças (MARIS e DENNY, 2002). A partir de uma dessas falhas, pode ocorrer um processo que se assemelha à tumorigênese de neoplasias adultas, no qual alterações moleculares conferem vantagens competitivas, como aumento na

capacidade de proliferação ou de sobrevivência celular, que permitem um acúmulo de mutações adicionais e, eventualmente, originam um tumor (STRATTON; CAMPBELL; e FUTREAL, 2009a). Considerando que alterações germinativas ou constitutivas em genes de predisposição ao câncer podem antecipar o acometimento tumoral (SILVA et al., 2013), tem sido estimado que entre 25 e 30% dos tumores pediátricos estejam associados a causas genéticas constitutivas herdadas ou a síndromes de predisposição tumoral (SCHIFFMAN et al., 2013).

A hipótese de que alguns tumores podem ser oriundos da reativação de programas do desenvolvimento embrionário surgiu ainda no século XIX. Rudolf Virchow reconheceu elementos do desenvolvimento embrionário em "teratomas", que ele descreveu como tumores contendo elementos diferenciados originários das três camadas germinativas. Virchow também sugeriu que os tumores, de modo geral, eram originários de células similares às embrionárias (DAVID, 1988). Lobstein e Cohnheim foram os primeiros a sugerir semelhanças entre o processo de embriogênese humana e a biologia das células tumorais, propondo que a tumorigênese, de modo geral, recapitula aspectos do desenvolvimento (KHO et al., 2004). Consoante com essa hipótese, durante a morfogênese, as células proliferam e se diferenciam, a fim de produzir tecidos com alto grau de organização. Alta proliferação e plasticidade são também requeridas durante a carcinogênese, processo que resulta na formação de populações relativamente organizadas de células anormais que, em conjunto, compreendem a massa tumoral (ZVELEBIL et al., 2013). Assim, o modelo de origem dos tumores embrionários sugere que sua oncogênese se inicia em células ainda indiferenciadas, requerendo portanto um número menor de eventos ou ao menos eventos diferentes daqueles necessários para a tumorigênese de neoplasias em adultos, exibindo uma espécie de "atalho" do processo tumoral (MARIS e DENNY, 2002; PAHLMAN et al., 2004a).

Recentemente, alguns trabalhos têm focado em estudos moleculares de tumores embrionários na tentativa de evidenciar eventos moleculares comuns aos processos de desenvolvimento e tumorigênese. Trabalhos em meduloblastomas evidenciaram

mecanismos comuns ao desenvolvimento desse tumor e à diferenciação da medula (KHO et al., 2004;SCHULLER et al., 2006). Da mesma maneira, em estudos com tumores de Wilms (tumores embrionários renais) foram identificadas assinaturas gênicas que associam o surgimento de tumor a falhas na nefrogênese, revelando a presença de mecanismos moleculares comuns aos dois processos (LI; KESSLER; e WILLIAMS, 2005;MASCHIETTO et al., 2008).

Histologicamente, os tumores embrionários possuem graus e capacidades de diferenciação heterólogos, e do ponto de vista anatomopatológico se assemelham a fases do desenvolvimento do tecido de origem (DEHNER, 1998;INSTITUTO NACIONAL DO CâNCER, 2008). As classificações utilizadas para os tumores pediátricos são ligeiramente diferentes daquelas utilizadas para os tumores adultos, sendo a morfologia a principal e, por vezes, a única característica considerada (GROSFELD, 1999).

Os tumores embrionários tendem a apresentar menores períodos de latência, ou seja, menor tempo decorrido entre uma presumível exposição a fatores de risco e o surgimento da doença. A idade média de acometimento por estes tipos tumorais varia de 1,5 a 3 anos de idade (MARIS e DENNY, 2002). Os tumores embrionários exibem maior potencial invasivo que outros tipos tumorais; no entanto, em sua maioria, são tumores de bom prognóstico e responsivos a tratamentos (DEHNER, 1998;INSTITUTO NACIONAL DO CâNCER, 2008). As taxas de sobrevida têm aumentado a partir da década de 60, época em que os tumores embrionários foram alvo de estudos pioneiros nos quais respostas à quimioterapia foram reconhecidas (ISRAEL, 1991). Melhorias significativas no tratamento de tumores pediátricos estão relacionadas com o desenvolvimento de grandes estudos cooperativos multidisciplinares, como "*Children's Cancer Group*", "*Pediatric Oncology Group*", "*Intergroup Rhabdomyosarcoma Study*", "*National Wilms' Tumor Study*" e "*Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique*", entre diversos outros. Este tipo de abordagem tem permitido o estudo de casuísticas maiores e melhor caracterizadas, assim como o desenvolvimento de protocolos de tratamento por critérios de estadiamento, averiguação e

controle de efeitos adversos em terapias e padronização de métodos laboratoriais otimizados para medidas de marcadores tumorais, por exemplo (GROSFELD, 1999).

Entre os tumores sólidos embrionários, os mais frequentes são retinoblastomas e tumores de sistema nervoso, como meduloblastomas e neuroblastomas (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA, 2014).

I. 2. Hepatoblastoma: aspectos epidemiológicos, clínicos e etiológicos

Anomalias congênitas da morfologia hepática são raras, e incluem agenesia total ou parcial de fígado, aplasia, hipoplasia ou desenvolvimento excessivo de lobos hepáticos, atresia biliar e displasia (estruturas anormais, tumores e cistos) (HENRYK DANCYGIER, 2010;LEMAIGRE, 2009). Os tumores malignos hepáticos são raros nas crianças, sendo o tumor embrionário hepatoblastoma a neoplasia hepática mais comum em crianças abaixo dos 5 anos e, ainda assim, responsável por apenas 1% dos tumores incidentes nessa faixa etária (HERZOG; ANDRASSY; e EFTEKHARI, 2000;ISAACS, Jr., 2007a). O primeiro caso de hepatoblastoma relatado na literatura data pouco mais de 100 anos (SCHNATER et al., 2003). A taxa de ocorrência deste tipo de tumor varia entre 0,5 e 1,5 casos a cada milhão de crianças, sendo claramente mais frequente antes dos cinco anos de idade (cerca de 85% dos casos), com ligeira predominância no sexo masculino (DE CAMARGO et al., 2010;DE et al., 2011;INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2008). Existem relatos extremamente raros de hepatoblastomas em adultos (CIENFUEGOS et al., 2013;NAKAMURA et al., 2010a).

O diagnóstico inicial de hepatoblastoma ainda é problemático devido à sua baixa incidência e sintomas inespecíficos. Os sinais clínicos mais comuns são: aumento de massa na região do fígado, anemia, dor abdominal, perda de peso, edema e braquicardia (HERZOG; ANDRASSY; e EFTEKHARI, 2000;MAKIN e DAVENPORT, 2010). O diagnóstico

pode ser realizado por biópsia, avaliação da função hepática, e avaliação por exames de imagem, tais como ultrassonografia e tomografia computadorizada (DAVENPORT; BLANCO; e SANDLER, 2012a; PERILONGO; SHAFFORD; e PLASCHKES, 2000a; RASALKAR et al., 2010).

O único marcador molecular bem caracterizado de hepatoblastoma é a alfa-feto proteína (ISAACS, Jr., 2007a; PURCELL et al., 2012), predominantemente sintetizada nos hepatócitos após a oitava semana de gestação. Ao nascimento, a concentração plasmática é alta (40.000 kUI/L em crianças nascidas a termo e 131.000 kUI/L em prematuros), porém, esta taxa diminui progressivamente até alcançar seus níveis normais entre 8 e 24 meses de idade. Assim, a concentração de alfa-feto proteína revela possível correlação entre hepatoblastoma e desenvolvimento hepático. Alto nível plasmático de alfa-feto proteína é indicador de hepatoblastoma e, quando esse aumento ocorre em níveis menores, pode sugerir quadros de hepatite, colestase, e ataxia telangiectasia (WOJTULEWICZ e COAKLEY, 2013). Apesar de na maioria dos casos de hepatoblastoma a concentração plasmática de alfa-feto proteína se apresentar bem elevada, em até 10% dos casos a dosagem da proteína é baixa. A ocorrência de hepatoblastoma em pacientes com dosagens plasmáticas de alfa-feto proteína baixas (<100 ng/mL) é um indicador clínico de pior prognóstico, ainda não entendido etiologicamente, que resulta em classificação do tumor como sendo de alto risco (DE et al., 2008).

Em relação ao tratamento, a cirurgia é o fator preponderante, com indicação de ressecção completa do tumor, embora existam grupos de hepatoblastomas irresssecáveis em função do tamanho e grau de envolvimento do fígado (MEYERS et al., 2014). Na década de 80 foram implementados pela *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique – Epithelial Liver Tumor Study Group* (SIOPEL) regimes de tratamento quimioterápico neo-adjuvante para tumores hepáticos, derivados de estudos prospectivos randômicos que preconizam a utilização de cisplatina, frequentemente em associação com doxorubicina, dois potentes ligantes de DNA com efeitos citotóxicos (CZAUDERNA, 2012; MEYERS et al., 2014; ZSIROS et al., 2010). A quimioterapia pré-operatória auxilia tanto na redução de massa tumoral

quanto na diminuição de hemorragia durante o procedimento cirúrgico. Este tipo de intervenção ocasionou um aumento de 33% (1981-1985) para 65% (1991-1995) na sobrevida de cinco anos, tornando-se então mundialmente adotado na clínica até o presente (2014). Nos casos que apresentam boa resposta à quimioterapia, com redução de massa tumoral e de níveis de alfa-feto proteína, segue-se o protocolo de ressecção completa do tumor por cirurgia (MEYERS et al., 2014). A ressecção parcial do tumor é desaconselhada, tendo em vista que pacientes com tumores residuais apresentam rápida progressão da doença e não respondem bem à quimioterapia (PERILONGO; SHAFFORD; e PLASCHKES, 2000b).

A SIOPEL desenvolveu paralelamente uma estratificação de risco para hepatoblastomas chamada PRETEXT (*Pretreatment extent of disease*), que classifica os tumores em quatro grupos de risco, do muito baixo (grupo I) ao muito alto (grupo IV), de acordo com resultados de exames de imagem. Assim, o fígado é virtualmente dividido em quatro setores, onde, dependendo da quantidade de setores acometidos pelo tumor, da proximidade entre eles, do envolvimento do sistema porta hepático, e do acometimento de linfonodos ou metástases, há um diferente protocolo de tratamento a ser seguido. A **Figura 1.1** ilustra as extensões esperadas para tumores classificados em cada um dos quatro grupos de risco.

Atualmente, a taxa de sobrevida geral (pacientes que apresentaram hepatoblastomas em algum momento da vida) é de 70%, e a taxa de 3 anos livre de evento alcança 75%. Recidivas ocorrem em menos de 12% dos pacientes tratados com quimioterapia (MEYERS et al., 2014). Metástases de hepatoblastomas são comumente encontradas em linfonodos regionais, pulmões e abdômen e, menos frequentemente, em estruturas ósseas, incluindo medula e sistema nervoso central (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2008). Entre pacientes que apresentam metástase, a taxa de sobrevida cai para apenas 25% (AGARWALA, 2012).

Figura I.1. Classificação PRETEXT – SIOPEL dos hepatoblastomas em quatro grupos de risco, de I (muito baixo) ao IV (muito alto), de acordo com a extensão e localização da massa tumoral.

Adaptado de (MEYERS; CZAUDERNA; e OTTE, 2012).

Quanto à avaliação histopatológica, os hepatoblastomas são macroscopicamente bem circunscritos, e podem ser solitários ou múltiplos. Microscopicamente, apresentam morfologia bastante heterogênea, com células mais indiferenciadas e células epiteliais imaturas que mimetizam diferentes fases do desenvolvimento do fígado (ROWLAND, 2002; SCHNATER et al., 2003). Devido à sua heterogeneidade histológica, os hepatoblastomas são classificados em epiteliais (~56% dos casos) e mistos (epitelial e mesenquimal, que correspondem a ~44% dos casos) (SCHNATER et al., 2003). Os hepatoblastomas do tipo epitelial são divididos em três subtipos: fetal, embrionário e de pequenas células indiferenciadas. O subtipo embrionário é pouco diferenciado e caracterizado por aspecto histológico tubular ou glandular distribuído em forma de rosetas.

Células de hepatoblastoma do tipo fetal são bem diferenciadas, recapitulando hepatócitos normais, com raras mitoses e organização em dois ou três cordões celulares, porém sem a composição de uma arquitetura lobular normal. Por fim, o subtipo de pequenas células indiferenciadas, também denominado como tumor anaplásico, caracteriza-se pelo diminuto tamanho das células, com núcleos intensamente corados e citoplasmas escassos (ROWLAND, 2002;SCHNATER et al., 2003).

O estudo anatomopatológico em hepatoblastomas tem revelado um padrão de recapitulação compatível com aspectos da ontogênese hepática (ZIMMERMANN, 2005). Paralelamente ao que acontece no tipo epitelial de hepatoblastoma, o desenvolvimento hepático normal pode ser dividido em três fases: a especificação de células precursoras de hepatoblastos na endoderme, a conversão de hepatoblastos em hepatócitos e células biliares, e a interação dessas células com células derivadas da mesoderme a fim de completar a diferenciação (CANNITO et al., 2010;LEMAIGRE e ZARET, 2004;SHIRAKI et al., 2008). Um estudo recente demonstrou ainda que as células de hepatoblastoma têm o potencial de se diferenciar em células germinativas, gametas e trofoblasto *in vitro*, similar ao que é observado em células tronco embrionárias. Esta capacidade incita e facilita a aquisição de características importantes para a malignidade, incluindo imortalidade replicativa, independência de ancoragem e tecidual, potencial de invasão, evasão ao sistema imune, hipometilação, sobrevivência e poder metastático (LIU et al., 2013).

A importância dos subtipos histológicos como fator prognóstico deste tipo tumoral ainda está em investigação. Há relatos de que tumores mais diferenciados, com predomínio de componente epitelial fetal, costumam ser menos agressivos e de melhor prognóstico, apesar de não serem quimiossensíveis, enquanto tumores com fenótipo histológico de pequenas células indiferenciadas apresentam prognóstico desfavorável (ROWLAND, 2002). Devido a esses achados, alguns protocolos internacionais têm incorporado os subtipos histológicos para estabelecimento de prognóstico clínico (ROWLAND, 2002;ZSIROS et al., 2010).

Ainda é pequeno o número de estudos epidemiológicos em hepatoblastomas, em parte devido à raridade tumoral. O maior estudo demonstrou associação significativa principalmente entre a ocorrência de hepatoblastoma e baixo peso ao nascimento (principalmente abaixo de 1,5 kg) (HECK et al., 2013). Índices mais baixos de associação, porém ainda significativos, foram obtidos com relação a nascimento pré-termo, tamanho pequeno para a idade gestacional, gravidez múltipla e fumo materno (HECK et al., 2013; JOHNSON et al., 2013). É interessante notar, contudo, que as últimas associações tem reconhecida relação com a característica de baixo peso ao nascimento, podendo então caracterizar apenas um viés de averiguação desses estudos. Assim sendo, até o momento há poucas evidências de influências ambientais na etiologia do hepatoblastoma.

Embora o hepatoblastoma seja um tumor predominantemente de ocorrência esporádica, já foram descritas associações com diversas síndromes genéticas. A síndrome de Beckwith-Wiedemann, por exemplo, é uma síndrome de crescimento anormal, caracterizada por macroglossia, macrosomia, onfalocele, hepatomegalia, nefromegalia e hemi-hipertrofia. Além dessas complicações, essa síndrome apresenta elevadas taxas de risco para neoplasias na primeira década de vida, com destaque para tumor de Wilms e hepatoblastoma. Também há forte associação de hepatoblastomas com a Polipose Adenomatosa Familiar, síndrome de predisposição tumoral autossômica dominante, ocasionada por mutações germinativas no gene *APC*. Uma variante desta síndrome, a síndrome de Gardner, também apresenta associação com hepatoblastoma. Adicionalmente, já foram relatados casos de hepatoblastomas em portadores das síndromes de Li-Fraumeni, Simpson-Golabi-Behmel, Sotos, trissomia do cromossomo 18 e neurofibromatose (EMRE; UMMAN; e RODRIGUEZ-DAVALOS, 2012a; SCHIFFMAN et al., 2013; ZIMMERMANN e PERILONGO, 2011).

I.3. Aspectos moleculares de tumores

O câncer é uma doença causada por inúmeras alterações em diferentes níveis de complexidade. A correlação entre fatores genéticos e câncer foi primeiramente proposta, há mais de um século, pelo zoologista alemão Theodor Boveri. Em estudos com ouriços do mar envolvendo fertilização por dois espermatozóides ao invés de um, Boveri descreveu o efeito detrimental de aneuploidias em organismos em desenvolvimento. Pouco tempo depois, suas observações levaram-no a propor que constituições cromossômicas anormais poderiam promover o câncer. Boveri também sugeriu a existência de cromossomos capazes de incitar a divisão celular e de outros capazes de reprimi-la, além de levantar a hipótese de que agentes externos e patógenos poderiam estar envolvidos na oncogênese (HOLLAND e CLEVELAND, 2009).

Data da década de 1920 uma das primeiras teorias sobre alterações genéticas tumorais. A proposta de Bauer e Strong, entre outros, era que as células mutadas tumorais aparentemente mantinham-se latentes durante um longo período até que suas novas capacidades se tornassem evidentes e o fenômeno pudesse ser diagnosticado como câncer (NORDLING, 1953). Durante a primeira metade do século XX, a visão de que mutações genéticas podiam causar câncer foi sendo firmada. Ainda havia, porém, hipóteses sobre as relações causais entre agentes virais e câncer, visto que o modelo genético não era capaz de explicar fatores como a distribuição de incidência tumoral (MARTE, 2006). Uma série de estudos entre os anos 50 e 60 utilizaram modelos matemáticos na tentativa de explicar os dados epidemiológicos. Carl Nordling, em 1953, foi o primeiro a estimar que a ocorrência de aproximadamente sete mutações genéticas explicaria a distribuição etária da incidência tumoral. Segundo ele, os casos que escapassem da distribuição etária geral seriam resultado de exposições a agentes mutagênicos ou estimulantes de proliferação celular. O trabalho de Nordling propôs como justificativa para a ocorrência de tumores pediátricos a alta taxa de divisões característica do período fetal; neste trabalho o autor também sugeriu a importância da influência ambiental na tumorigênese, notando as diferentes taxas de incidência de câncer entre as populações de diferentes regiões dos Estados Unidos

(NORDLING, 1953). Peter Armitage e Richard Doll alcançaram conclusões similares às de Nordling em 1954, mas revisaram o modelo em 1957, concluindo que os dados epidemiológicos eram consistentes com a necessidade de dois passos ou etapas (*two-step theory*) para o desenvolvimento da maioria das formas de câncer, dos quais um ou ambos poderiam ser somáticos. Trabalhos como os de James Neel e Philip Burch focaram em tumores pediátricos, concluindo que seu desenvolvimento nas primeiras fases de vida era relacionado com uma redução de complexidade, quando comparados a outros tipos de neoplasias (MARTE, 2006).

Cerca de 70 anos depois dos estudos de Boveri, um estudo epidemiológico de Alfred G. Knudson (em 1971) em retinoblastoma, tumor embrionário de retina, propôs uma hipótese sobre a origem desses tumores conhecida como a hipótese de “dois *hits*”. No estudo de Knudson foram levantadas evidências de que o câncer poderia surgir em consequência de poucos estágios, como apenas dois, e que cada um desses dois passos teria uma possibilidade de ocorrer compatível com os valores aceitáveis para as taxas de mutação de material genético. Estudando casos de retinoblastoma familiar, as análises estatísticas sugeriam que os casos hereditários provavelmente eram originários de apenas um evento somático de mutação, sendo que a primeira alteração poderia ser germinativa e estar presente ao nascimento (MARTE, 2006). Atualmente, o modelo mais aceito para explicar a oncogênese, a teoria de progressão por múltiplos passos, postula que o câncer surge e progride a partir da ocorrência de alterações genéticas e epigenéticas estocásticas que são sujeitas a fortes pressões seletivas (HUANG e INGBER, 2006). Em um dos estudos modernos sobre a genética do câncer, recentemente atualizado, Hanahan e Weinberg sugeriram princípios para o entendimento das complexidades das doenças neoplásicas. Em seus trabalhos, afirmaram que a origem do câncer se baseia em um acúmulo de alterações que permite que as células livres-se de uma rede que controla a homeostase entre a proliferação e a morte celulares (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000; HANAHAHAN e WEINBERG, 2011). Essas alterações se resumiriam à aquisição de um grupo de capacidades funcionais que alterariam a fisiologia celular, como resistência a apoptose, indução de angiogênese e

sustentação de sinal proliferativo, entre outros. Cada uma dessas capacidades pode ser adquirida por vários mecanismos moleculares, envolvendo ativação e inativação de diferentes genes e vias gênicas, não seguindo necessariamente uma ordem cronológica (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000; HANAHAHAN e WEINBERG, 2011). Adicionalmente, a oncogênese usualmente apresenta como característica intrínseca, ainda que em graus heterogêneos, instabilidade genética, que resulta na amplificação do número de alterações somáticas (STRATTON; CAMPBELL; e FUTREAL, 2009a).

O processo de expansão clonal, isto é, o desenvolvimento de uma linhagem celular a partir de uma única célula tumoral que contém vantagens seletivas, faz com que os tumores contenham intrinsicamente a história genética de seu desenvolvimento, o que pode dificultar o entendimento biológico (PINKEL e ALBERTSON, 2005). Algumas anomalias somáticas tumorais podem estar causalmente relacionadas ao início da proliferação neoplásica ou à sua progressão (sendo estas as chamadas mutações principais ou *driver mutations*), ou ainda terem sido adquiridas como consequência secundária do processo tumoral, apesar de poderem, eventualmente, também propiciar vantagens seletivas transitórias (denominadas *passenger mutations*) (COPELAND e JENKINS, 2009; GREENMAN et al., 2007; HABER e SETTLEMAN, 2007). Algumas alterações importantes para os estágios precoces de desenvolvimento tumoral podem se tornar não evidentes em decorrência de eventos subsequentes que sejam funcionalmente mais relevantes; outras alterações podem ser mutações neutras ou detrimenais ao tumor, mas terem sido geradas em um momento onde outras capacidades tumorigênicas suprimiam seu efeito (PINKEL e ALBERTSON, 2005). De fato, este conjunto de características propicia a ocorrência de uma enorme heterogeneidade genotípica e fenotípica dos tumores, que raramente se estabiliza por completo (DING et al., 2010). Assim, cada subtipo de neoplasia apresenta ao mesmo tempo um padrão restrito de anomalias que é comum ao grupo ("assinatura tumoral") e um grande conjunto de características que são variáveis entre todos os tumores do mesmo tipo (COPELAND e JENKINS, 2009; HABER e SETTLEMAN, 2007). Por fim, é importante considerar que as alterações encontradas nas células tumorais são resultado de uma soma entre as alterações

já presentes na célula ancestral (genoma constitutivo), e as alterações adquiridas somaticamente ao longo da oncogênese (STRATTON; CAMPBELL; e FUTREAL, 2009a).

As alterações somáticas no genoma de uma célula neoplásica podem incluir inúmeras classes de anomalias, como: substituições de bases nucleotídicas de DNA, inserções ou deleções de segmentos de DNA, rearranjos cromossômicos, alterações de número de cópias de segmentos de DNA, alterações no padrão de metilação de DNA, modificação de histonas, entre muitos outros. Estas anormalidades podem atuar individualmente ou em combinações para alterar funções ou níveis de expressão de componentes celulares (STRATTON; CAMPBELL; e FUTREAL, 2009a). No presente trabalho, abordamos três tipos de anomalias somáticas tumorais em hepatoblastoma, melhor detalhadas a seguir: alterações em número de cópias de segmentos de DNA, mutações de base única na sequência codificadora de DNA e alterações na metilação de citosinas.

1.3.1. Alterações no número de cópias de sequências de DNA

A primeira observação de cromossomos se deu em células vegetais em 1842 por Carl Wilherm. A citogenética começou a ser desenvolvida em 1879, com os trabalhos de Arnold, e 1882, com Fleming, os primeiros a observarem estruturas mitóticas (TRASK, 2002). O termo cromossomo (do grego "corpo marcado") foi cunhado apenas em 1888 por Waldeyer (SMEETS, 2004). Na mesma época, há mais de um século atrás e muitos anos antes inclusive da descoberta da estrutura do DNA, Boveri já havia proposto que uma constituição cromossômica anormal poderia promover o câncer (HOLLAND e CLEVELAND, 2009). De fato, a hipótese de Boveri teve influência de observações de David von Hansemann, que descreveu em detalhes figuras mitóticas aberrantes visualizadas em 13 amostras de carcinomas. No estudo de Hansemann havia mitoses multipolares e anáfases com distribuições assimétricas de cromossomos, postuladas por ele como responsáveis pela ocorrência de variações na quantidade de material genético nas células tumorais, um

fenômeno chamado por ele como "*Prinziplosigkeit als Prinzip der Krebszellen*" – falta de princípio como um princípio das células tumorais (KNUDSON, 2000).

Somente na década de 1950, com o advento de técnicas para cultura celular, utilização de solução hipotônica e colchicina, houve os primeiros avanços congruentes na citogenética humana, como o estabelecimento do número de cromossomos em células normais. Estes primeiros cariótipos permitiram a descoberta de algumas doenças resultantes de mudanças no número de cromossomos ou em sua estrutura. Em 1959, a trissomia do cromossomo 21 foi identificada como a causa da síndrome de Down, assim como aneuploidias dos cromossomos sexuais foram descritas nas síndromes de Turner e Klinefelter (SMEETS, 2004). Em 1960, Nowel e Hungerford publicaram a famosa descoberta do cromossomo Philadelphia (Ph) em leucemia mielóide crônica, posteriormente demonstrado por Janet Rowley, como originário de uma translocação entre os cromossomos 9 e 22. Este foi o primeiro achado de uma anormalidade cromossômica associada a um tipo tumoral específico (KNUDSON, 2000). Em retinoblastomas, achados citogenéticos que envolviam sempre eventos de perda de diversos tamanhos incluindo a região 13q14 indicaram a região de localização do gene supressor tumoral *RB1* (COWELL e HOGG, 1992). Em tumores embrionários renais (tumor de Wilms), achados citogenéticos e moleculares permitiram o mapeamento do supressor tumoral *WT1* em 11p13 (CALL et al., 1990).

Somente no fim da década de 1960 se tornou possível a identificação microscópica de segmentos cromossômicos menores (vários megabases), através do desenvolvimento da técnica de coloração cromossômica descrita por Torbjorn Caspersson, na qual cromossomos em metáfase (exibindo elevado grau de condensação) exibiam um padrão altamente reprodutível de bandas claras e escuras ao longo de seu comprimento (TRASK, 2002). Análises cromossômicas de tecidos tumorais realizadas através de cariótipos permitiram concluir que os padrões de aberrações estruturais podem ser úteis como assinaturas tumorais, classificadores de prognóstico e preditores de resposta a tratamentos, entre outros (PINKEL e ALBERTSON, 2005).

Atualmente é bem caracterizada a presença de aneuploidias como um aspecto genético comum a tumores sólidos, ainda que seu papel como causa ou consequência da transformação maligna provavelmente deva ser debatido caso a caso (WEAVER e CLEVELAND, 2006). De qualquer forma, as aneuploidias podem ser reflexo tanto de um erro de segregação cromossômica transiente em algum ponto do desenvolvimento tumoral, sendo então propagada e herdada pelos clones celulares, quanto ser resultado de um processo de instabilidade cromossômica, caracterizado por um aumento na taxa de ganhos e perdas de cromossomos durante a divisão celular (HOLLAND e CLEVELAND, 2009).

Parte das dificuldades no estudo de anormalidades cromossômicas em câncer reside na sua complexidade e diversidade entre os tumores. De fato, em conjunto com as alterações numéricas de cromossomos inteiros, células neoplásicas muitas vezes possuem uma variedade de alterações estruturais cromossômicas, como deleções, amplificações, translocações e inversões (HOLLAND e CLEVELAND, 2009), inclusive abaixo da resolução da citogenética clássica. Essas variantes estruturais podem surgir a partir de reparos inadequados de quebras de dupla-fita de DNA (*Double-strand breaks - DSBs*), resultado de processos endógenos como estresse oxidativo, erros durante a replicação, processos recombinantes, ou por agentes exógenos como radiação e agentes químicos. Os principais mecanismos de reparo de quebras de dupla-fita, recombinação homóloga (*Homologous recombination - HS*) e ligação de terminações não-homólogas (*Non-homologous end joining - NHEJ*) podem ocasionar erros que resultam em perdas, ganhos e rearranjos de regiões envolvendo desde poucos nucleotídeos até braços cromossômicos inteiros (CURRALL et al., 2013). Os elementos genéticos móveis, como retrotransposons, também podem dar origem a variações de número de cópias gênicas de trechos sem íntrons inseridas randomicamente no genoma (CONRAD et al., 2010; SCHRIDER et al., 2013).

O estudo citogenético clássico foi uma abordagem com limitações para a maioria dos tipos tumorais, em especial tumores sólidos, tanto devido à dificuldade de cultivo das células tumorais para obtenção de metáfases quanto devido ao padrão complexo exibido pelas alterações estruturais dos cariótipos tumorais. Um grande avanço para a citogenética

decorreu do advento da hibridação comparativa de genomas (CGH) pelo grupo de pesquisadores Ollie e Anna Kallioniemi, Dan Pinkel e Joe Gray, que permitiu a utilização do DNA tumoral para investigar ganhos e perdas cromossômicos globalmente, sem que houvesse necessidade de cultivo ou preparação de metáfases dos mesmos (KALLIONIEMI et al., 1992). A técnica de CGH revela regiões cromossômicas de ganhos e perdas em amostras teste (por exemplo, material derivado de um tumor) relativamente ao material de amostras controle normais. No entanto, além de não permitir determinar a ploidia do DNA teste, outra limitação da técnica é que os dados não revelam a estrutura dos rearranjos, ou seja, não permitem a identificação de inversões ou translocações, apenas identificando ganho ou perda de material. Brevemente, as amostras de DNA da amostra teste e da amostra controle são diferencialmente marcados com fluorocromos e co-hibridizados em cromossomos normais em metáfase. A resolução desta metodologia permaneceu limitada à estrutura cromossômica microscópica (4 - 10 Mb) até as modificações introduzidas em 1998 por Pinkel e colaboradores com a substituição dos cromossomos metafásicos como alvo de hibridação por arranjos de sondas de largos segmentos de DNA obtidas por intermédio de clones em BACs (*bacterial artificial chromosome*) (hibridação comparativa de genomas baseada em arranjos - *array-CGH*) (PINKEL et al., 1998). A **Figura 1.2**, a seguir, ilustra a metodologia da técnica de CGH, tanto utilizando hibridização contra cromossomos em metáfases, quanto hibridização contra sondas originadas por BACs.

Figura 1.2. Técnica de CGH – Hibridização comparativa de genomas. Após fragmentação de amostras de DNA teste e referência, marcação diferencial por fluorocromos e posterior co-hibridização dos DNAs contra cromossomos em metáfase ou contra sondas preparadas com trechos de DNA genômico, é possível se estimar em cada região o número relativo de cópias de uma amostra teste em comparação a uma amostra controle.

Modificado de (SANLAVILLE et al., 2005; TRASK, 2002)

O impacto desse tipo de variação no genoma humano se tornou ainda mais evidente com o aumento de resolução da técnica de *array*-CGH, introduzindo sondas de oligonucleotídeos, muito mais simples para obtenção (síntese) e menores. Isso permitiu investigar desequilíbrios genômicos submicroscópicos usando dezenas de milhares de sequências-alvo simultaneamente, alcançando resoluções cerca de duas ordens de magnitude maiores que a citogenética clássica, o que aumentou extraordinariamente a

capacidade de investigação citogenética (PINKEL e ALBERTSON, 2005). Adicionalmente, o desenvolvimento da técnica permitiu estudos de indivíduos da população geral, que revelaram que inúmeros segmentos do genoma humano variam em número de cópias (*copy number variation* – CNV) (IAFRATE et al., 2004; SEBAT et al., 2004). Estima-se que entre 5 a 20% do genoma humano sejam CNVs de tamanhos variáveis (1 Kb a 2 Mb), que podem incluir genes e elementos regulatórios (CONRAD et al., 2010; MACDONALD et al., 2014). Embora o papel desempenhado pelas CNVs não esteja totalmente esclarecido, existem evidências que grande parte dessas alterações contribui para a variabilidade normal da espécie, incluindo predisposição a doenças (CONRAD et al., 2010; ESTIVILL e ARMENGOL, 2007; REDON et al., 2006).

Em parte devido à disponibilidade de espécimes tumorais, geralmente excisadas como parte do tratamento, assim como devido ao interesse médico relacionado, muitos estudos citogenéticos utilizando microarranjos focaram em tumores humanos. Nesse caso, a análise global do genoma de diversos tipos tumorais utilizando *array*-CGH evidencia alterações somáticas no número de cópias de segmentos de DNA microscópicos e submicroscópicos em adição às CNVs constitutivas frequentemente observadas na população (SANLAVILLE et al., 2005). Devido às diferenças em tamanho e origem, os ganhos e perdas de segmentos genômicos detectados em neoplasias são atualmente denominados *Somatic Copy Number Alterations* (SCNA) ou alterações somáticas em número de cópias, em contraste ao termo *Copy Number Variation* (CNV) que representa variações germinativas e comuns na população. Grande parte das SCNAs é comum a diversos tipos tumorais (ZACK et al., 2013). Segundo um estudo de 2010, em média, cada amostra de tumor apresenta 28 eventos de ganho e 18 de perda, englobando cerca de 35% do genoma, valores muito superiores aos encontrados em amostras normais. As alterações mais comuns envolviam braços cromossômicos (25% do genoma afetado) ou rearranjos focais (10%), com pouca sobreposição entre os segmentos genômicos afetados pelos dois tipos de evento (2%) (BEROUKHIM et al., 2010). Portanto, em câncer, as alterações em

número de cópias afetam uma fração maior do genoma que qualquer outro tipo de alteração genética somática (ZACK et al., 2013).

Atualmente descrições de SCNAs em câncer, estão compiladas em bancos de dados, como o *TCGA PanCancer* (<http://www.nature.com/tcga/>), *Mitelman - National Cancer Institute* (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>), *Progenetix Cancer Genome Data* (<http://www.progenetix.org/cgi-bin/pgHome.cgi>), *UCSC Cancer Genomics Browser* (<https://genome-cancer.ucsc.edu/>), *Tumorscape* (<http://www.broadinstitute.org/tumorscape/pages/portalHome.jsf>), *CanGen* (<http://www.cangem.org/>), *Oncomine* (<https://www.oncomine.org/>), entre outros.

As alterações genômicas de número de cópias podem mediar alterações fenotípicas por meio de impacto na expressão gênica (ZACK et al., 2013). SCNAs recorrentes frequentemente indicam genes ou regiões cromossômicas com papel importante na iniciação ou na progressão tumoral, e padrões de aberrações estruturais podem ser úteis como assinaturas tumorais (POLLACK, 2007; ZACK et al., 2013). Em suma, a utilização da técnica de microarranjos em tumores nos permite obter o perfil genômico de alterações no número de cópias, possibilitando, entre outros, a identificação de marcadores tumorais de progressão, predição de prognóstico e classificação de subtipo tumoral, além de um melhor entendimento biológico dos fatores envolvidos na tumorigênese.

Alterações citogenéticas em Hepatoblastomas

Em oposição aos achados citogenéticos frequentemente identificados em tumores sólidos, tem se demonstrado que os hepatoblastomas apresentam cariótipos relativamente simples, com predominância de alterações cromossômicas numéricas (STEJSKALOVA et al., 2009a; YEH et al., 2000a). É possível notar a ocorrência majoritária de ganhos, que afetam segmentos grandes, como cromossomos ou braços cromossômicos inteiros (ZIMMERMANN e PERILONGO, 2011). Ainda não está estabelecido se este padrão de aneuploidias faz parte da etiologia do hepatoblastoma ou se alterações em genes

específicos importantes para sua tumorigênese causam segregação cromossômica ineficiente (TOMLINSON e KAPPLER, 2012a). Os estudos de SCNAs em hepatoblastoma são limitados, porém já foram descritas algumas alterações cromossômicas recorrentes como ganhos nas regiões 1q, 2q, 8q e 20 e perda em 4q (STEJSKALOVA et al., 2009a; TOMLINSON et al., 2005; ZIMMERMANN e PERILONGO, 2011). A **Figura 1.3**, a seguir, compila os eventos de ganhos e perdas previamente identificados em hepatoblastomas de acordo com o cromossomo envolvido.

Figura 1.3. Distribuição das principais alterações encontradas em hepatoblastoma na literatura envolvendo perdas (barras abaixo do eixo zero) e ganhos (barras acima do eixo zero), classificadas por cromossomo (eixo X). A amplitude no eixo Y reflete o número de eventos descritos na literatura. É possível notar a prevalência de ganhos, e uma distribuição não casual com maior ocorrência de eventos em certos cromossomos, como ganhos nos cromossomos 2, 8 e 20 e perdas em 4, 9, 18 e 21.

Fonte: (TOMLINSON e KAPPLER, 2012a)

A **Tabela 1.1**, a seguir, compõe uma revisão de literatura acerca de estudos citogenéticos em hepatoblastomas e é parte de artigo recentemente aceito para publicação (RODRIGUES, T.C. et al., In press 2014 - Capítulo 4). A tabela inclui informações de número

amostral, plataforma utilizada, regiões envolvidas em ganhos, ampliações em grande número de cópias (amplicons) e perdas.

Tabela 1.1. Revisão da literatura de estudos citogenéticos no tumor embrionário hepatoblastoma.

Número de tumores estudados	Técnica / Plataforma	Ganhos	Amplicons	Perdas	Referência bibliográfica
1	Cariótipo	2	-	-	(BARDI et al., 1992)
1	Cariótipo	2p25-q31, 8, 12, 17, 20	-	18	(SWARTS; WISECARVER; e BRIDGE, 1996a)
4	Cariótipo	1, 2, 5, 6, 7, 8, 13, 19, 20, 21	-	8	(SCHNEIDER et al., 1997)
1	Cariótipo	1, 2, 4, 7, 8, 8q10, 14, 14q24, 16, 19, 20, 21, 22	-	1q12, 3q12, 13, 15, 17, 19	(PARADA et al., 1997)
9	Cariótipo	1, 2, 6, 7, 8, 12q, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22	-	4, 12, 15	(SAINATI et al., 1998)
1	Cariótipo, FISH	2q21-qter, 4q35, 20	-	9	(BALOGH et al., 1998)
16	CGH	1p, 2p, 2q, 3p21, 4q, 5q13, 7p, 8q, 10, 17, 20,	-	10p, 15q26, Xq26-qter	(STEENMAN et al., 1999)
1	Cariótipo	2, 3, 20, Y	-	-	(YEH et al., 2000b)
7	Cariótipo, FISH	1q12, 1q21, 2, 5, 7, 8, 10, 12, 16, 20	-	2q11-q23, 3, 7q11.2, 9q22, 12, 14, 18	(PARADA et al., 2000)
18	CGH	1q24-q25, 2q23-q24, 4, 9q32-qter, 17q22,-qter, 19, 20q	-	2p13-pter, 2q22, 3q23-q25, 4q21-qter, 8p, 9q22-pter, 11q14-qter, 13q21-q22, 14, 15q, 18q	(GRAY et al., 2000b)
2	Cariótipo	2, 3, 4, 5q31, 6, 7, 8, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, X	-	-	(MA et al., 2000)
34	CGH	1q, 2p, 2q, 7q, 8p, 8q, 12p, 12q, 17, 20, 22q	2q24, 8q11.2-q13, 8q11.2-q21.3, 10q24-q26	1p, 4p, 4q, 10, 16q, 18q	(WEBER et al., 2000)

Número de tumores estudados	Técnica / Plataforma	Ganhos	Amplicons	Perdas	Referência bibliográfica
10	CGH	1q, 2, 2q14-q21, 2q24, 3, 6, 8q22-qter, 9q, 12, 16p, 17, 17pter-q21, 17q21-qter, 20	2q22-34	1, 4, 8p21-22, 11,18	(HU et al., 2000)
1	Cariótipo	-	-	3q11.2-q13.2	(SANDOVAL et al., 2002)
2	Cariótipo	2q23-q36, 20	-	1q32	(ALI et al., 2002)
10	FISH	2, 8, 20	-	-	(SURACE et al., 2002)
35	CGH	1p32-pter, 2q, 3p, 4q, 5q, 6q, 8q, 20q, X	-	1p, 1q32-qter, 4q, 10, 11p, 14q, 17p11-pter	(TERRACCIA NO et al., 2003)
2	Cariótipo	1, 2, 4q35, 5, 6, 7, 8, 12, 18, 19, 20, 22	-	1p22, 12p12	(NAGATA et al., 2005)
111	Cariótipo	2, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 22	-	4, 18, 21	(TOMLINSON et al., 2005)
17	SNP-array	1q, 2(2q), 8, 17q, 20	7q34, 11q22.2, 14q11.2	4q, 11q	(SUZUKI et al., 2008)
9	Cariótipo, FISH e 1 Mb Array-CGH	1, 1q10, 1q44, 2, 2q37, 5, 6q27, 7, 8, 8q10, 10q23-q26, 17, 20, 22	-	-	(STEJSKALO VA et al., 2009b)
15	Marcadores de microssatélites	-	-	1q44, 4q21-22, 13q14, 17p13, e 17q11.2	(TERADA et al., 2009)
56	SNP-array	1q, 2q (2q24.2-24.3), 6p, 8q, 17q, 20	1q32.1	1p, 4q (4q32.3, 4q34.3-q35.2), 16q	(ARAI et al., 2010)

A frequência aumentada de perdas envolvendo o cromossomo 18 é de certa forma paradoxal, visto que uma das síndromes relacionadas ao acometimento por hepatoblastoma é justamente a trissomia do cromossomo 18 (TOMLINSON e KAPPLER, 2012a). Quanto à caracterização de marcadores tumorais, alguns trabalhos têm relacionado a ocorrência de ganhos nos cromossomos 20 (SWARTS; WISECARVER; e BRIDGE, 1996b) e 2, em

especial da região 2q24 (KUMON et al., 2001a), e perdas em 4q (ARAI et al., 2010) com pior prognóstico em hepatoblastoma. Porém, dados de investigações citogenéticas em alta resolução de hepatoblastomas ainda são escassos, e mais estudos são necessários.

1.3.2. Mutações somáticas em regiões codificadoras

A investigação de alterações genéticas ao nível de bases nucleotídicas só foi possível a partir da técnica de sequenciamento, inicialmente desenvolvida por Frederick Sanger em 1975 (SANGER e COULSON, 1975), e aperfeiçoada por Maxam e Walter Gilbert (MAXAM e GILBERT, 1992), e novamente por Sanger em 1977 (SANGER; NICKLEN; e COULSON, 1977). No sequenciamento pelo método de Sanger, a síntese de DNA se inicia por meio de um oligonucleotídeo, prosseguindo com a incorporação de nucleotídeos ao longo da sequência molde pela enzima DNA polimerase, até que haja síntese de uma nova fita. Estão presentes nessa técnica dois tipos de nucleotídeos: os deoxinucleotídeos (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), e os dideoxinucleotídeos (ddATP, ddGTP, ddCTP e ddTTP), esses últimos nucleotídeos modificados marcados, que não possuem o grupo hidroxila no carbono 3', sendo, então, nucleotídeos terminadores de cadeia. Assim, a incorporação de um dideoxinucleotídeo interrompe a síntese da nova fita, e a ordem das bases na sequência é determinada pelo tamanho dos fragmentos obtidos através das reações de polimerização com os diferentes nucleotídeos terminadores de cadeia (SANGER; NICKLEN; e COULSON, 1977).

As tecnologias de sequenciamento de DNA avançaram muito nas últimas décadas, como o advento de sequenciadores interligados a capilares, a associação de dideoxinucleotídeos a marcadores de fluorescência e a reversão de dideoxi em deoxinucleotídeos. A construção de bibliotecas foi também aprimorada com a substituição da amplificação por clonagem por reações de PCR (SHENDURE e JI, 2008). Tais transformações aumentaram a precisão do sequenciamento além de diminuir tempo e custo necessários para geração de dados de sequenciamento. Nos últimos anos, houve a incorporação das novas tecnologias de amplificação e marcação com a utilização de

adaptadores em aparatos automatizados, gerando um sequenciamento massivo paralelo denominado *next-generation sequencing* (sequenciamento de nova geração). Tornou-se acessível então obter simultaneamente múltiplas sequências de grandes segmentos de DNA ou genomas humanos inteiros (MARDIS, 2011; SHENDURE e JI, 2008).

A investigação global em larga escala de mutações do genoma humano é atualmente possível por meio da utilização das plataformas de sequenciamento de nova geração. Muitos estudos de sequenciamento de genoma completo em tumores utilizando os sequenciadores de nova geração foram e estão sendo realizados (KOBOLDT et al., 2013). Tem sido demonstrado que a geração atual de plataformas de sequenciamento massivo paralelo possui capacidade para identificar uma enorme variedade de alterações genéticas adquiridas somaticamente em tumores (PATEL et al., 2013). Mais do que isso, essas abordagens têm potencial de identificar a diversidade genética subclonal intrínseca à população de células tumorais, permitindo um maior entendimento da dinâmica envolvida na tumorigênese (STRATTON; CAMPBELL; e FUTREAL, 2009b). Para diminuir custo e aumentar a cobertura do sequenciamento e, conseqüentemente, a representatividade clonal, foi desenvolvida a metodologia de sequenciamento de regiões codificadoras, comumente chamada de sequenciamento de exoma. O sequenciamento de exoma possibilita alta cobertura de sequências codificadoras, através de sua captura na construção de bibliotecas, sem os altos custos e a complexidade de interpretação associados ao sequenciamento do genoma total, e vem sendo amplamente utilizado na pesquisa e na prática clínica (LIU; WANG; e CHEN, 2013; SHYR e LIU, 2013). Um estudo recente chegou a demonstrar, utilizando sequenciamento de exoma, a existência de células tumorais circulantes que apresentavam resistência à terapia, exemplificando o poder deste tipo de metodologia experimental (MURTAZA et al., 2013).

Em revisão recente (VOGELSTEIN et al., 2013a), foi descrito que cada tumor sólido apresenta mutações somáticas não-sinônimas (que causam modificação no produto proteico a ser gerado) afetando entre 33 e 66 genes diferentes. A grande maioria das mutações não-sinônimas encontradas (aproximadamente 95% do total de alterações) consiste em

substituições de uma única base nucleotídica. Entre as substituições de base, 90,7% resultam em mudanças de perda de sentido (*missense* – nas quais há substituição de aminoácido), 7,6% resultam em mutações sem sentido (*nonsense* – onde é abolido ou gerado um códon sinalizador de parada) e 1,7% consistem em alterações nos sítios de *splicing* ou nas regiões não-traduzidas imediatamente adjacentes aos códons sinalizadores de começo e fim de transcrição (*start* e *stop* códons). Assim, mesmo afetando em número de bases uma menor porcentagem do genoma que as alterações em número de cópias (ZACK et al., 2013), as mutações pontuais, sem sombra de dúvida, constituem uma vasta fonte de variação tumoral, com consequências muitas vezes danosas à homeostase celular.

As mutações somáticas tumorais são usualmente classificadas em *drivers* e *passengers*. As mutações que conferem uma vantagem seletiva de crescimento à célula neoplásica são denominadas *drivers*, enquanto as mutações que, apesar de não estabelecerem vantagens ou desvantagens adaptativas, surgem em decorrência do aumento da taxa de divisão celular e, conseqüentemente, do aumento dos erros de replicação inerentes, são denominadas *passengers* (HABER e SETTLEMAN, 2007). É importante frisar que mutações *passengers* podem conferir funções tumorais importantes, como diminuição de respostas a tratamentos, e que os papéis de mutações *drivers* e *passengers* podem ser intercambiáveis durante a progressão tumoral (VOGELSTEIN et al., 2013a). De todo modo, os estudos de sequenciamento global demonstraram a existência de um menor número de mutações *drivers* que o inicialmente esperado, classificadas principalmente de acordo com a frequência em que os genes aparecem alterados e as consequências preditas das mutações. É estimado que, ao longo da progressão, cada tumor apresente entre 5 e 15 mutações *drivers*, e que cada *driver* confira apenas uma pequena vantagem seletiva celular (BOZIC et al., 2010).

De fato, poucos genes estão alterados em vários tipos tumorais, enquanto uma proporção muito maior de genes encontra-se raramente mutado em diferentes amostras tumorais (WOOD et al., 2007). Apesar de grande heterogeneidade genética dentro de um mesmo grupo tumoral, estudos recentes identificaram assinaturas mutacionais específicas,

relacionadas tanto à classe tumoral como à idade de acometimento e exposição a agentes mutagênicos, como luz ultravioleta ou fumo (ALEXANDROV et al., 2013). A fim de facilitar as estimativas de frequência e ocorrência de mutações somáticas tumorais, os dados são compilados em bancos de dados como o COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>), ICGC (<http://dcc.icgc.org/>) e TCGA (<http://cancergenome.nih.gov/>).

O número médio de mutações não-sinônimas varia amplamente entre os diferentes tipos tumorais. Tamanha variação pode refletir, entre outros, a ação de agentes mutagênicos, como na diferença observada entre tumores de pulmão de fumantes e não-fumantes (GOVINDAN et al., 2012). Também foram encontradas grandes diferenças entre tumores do tipo colorretal com ou sem defeitos em genes de reparo (GRYFE e GALLINGER, 2001). Por outro lado, tumores pediátricos apresentaram um número médio de mutações não-sinônimas muito inferior aos demais tumores sólidos adultos, com cerca de 9,6 mutações por tumor (VOGELSTEIN et al., 2013a). A explicação sugerida para o menor número de mutações reside tanto no fato de que esses tumores se originam precocemente e se desenvolvem em curto período de tempo a partir de células precursoras que sofreram relativamente poucas divisões celulares (TOMASETTI; VOGELSTEIN; e PARMIGIANI, 2013), quanto na proposição de que os tumores pediátricos provavelmente requerem um número menor de mutações, provavelmente mais penetrantes, que os tumores sólidos adultos (VOGELSTEIN et al., 2013a).

Mutações somáticas em hepatoblastomas

Mutações pontuais em hepatoblastomas já foram descritas em estudos de genes específicos. As mutações mais comumente encontradas são ativadoras de *CTNNB1*, o gene da beta-catenina, (CURIA et al., 2008; KOCH et al., 1999; UDATSU et al., 2001a). O gene *CTNNB1* tem papel central na via de sinalização Wnt, que está envolvida no desenvolvimento hepático embrionário e pós-natal. A beta-catenina participa do

ancoramento do citoesqueleto e apresenta localização nuclear nos tecidos tumorais (PARK et al., 2001). O gene da beta-catenina também é conhecido por interagir com o gene *APC*, que já foi relatado como somaticamente mutado em hepatoblastomas; de fato, pacientes com mutação germinativa em *APC*, afetados por Polipose Adenomatosa Familiar, também apresentam predisposição ao desenvolvimento de hepatoblastomas (GUPTA et al., 2013; TOMLINSON e KAPPLER, 2012a).

Os genes *AXIN1* e *AXIN2*, componentes *downstream* na via Wnt, cuja função seria participar da degradação da beta-catenina, também foram relatados como mutados em casos de hepatoblastomas, tanto com variantes adquiridas como germinativas (KOCH et al., 2004; MIAO et al., 2003; TANIGUCHI et al., 2002). Adicionalmente, foi descrita mutação pontual no gene *PIK3CA*, cuja via de sinalização de fatores de crescimento como *IGF2*, apresenta expressão alterada neste tipo tumoral (HARTMANN et al., 2009). Poucos tumores apresentaram mutações no gene *TP53*, que originam tumores anaplásicos (CURIA et al., 2008). Por fim, mutações germinativas inativadoras foram descritas no gene supressor tumoral *WTX* (FUJITA et al., 2014).

Até o presente momento, existem na literatura apenas poucos estudos envolvendo sequenciamento global de hepatoblastoma. Dois desses estudos foram realizados em pacientes síndrômicos, sequenciando tanto o tecido tumoral quanto o tecido germinativo (Fujita et al., 2014; Kosaki et al., 2014). Um trabalho descreveu as variantes exclusivamente somáticas em uma coorte de seis hepatoblastomas (Jia et al., 2014), e o estudo mais recente relata 47 casos {Eichenmuller, 2014 344 /id}. Em comum a todos os estudos há o relato de um número muito baixo de variantes reportadas por tumor, além do fato de que apenas mutações no gene da beta-catenina são frequentes.

1.3.3 Alterações no padrão de metilação de citosinas

Conrad Waddington, cunhou o termo "epigenética", derivado do termo grego "*epigenesis*", para se referir aos mecanismos causais pelos quais os genes acarretam

efeitos fenotípicos durante o desenvolvimento, através de relações dos genes entre si e com ambiente (HAIG, 2004). O termo foi sofrendo alterações conceituais com o passar dos anos. O geneticista americano David Nanney, em 1958, adaptou o conceito de epigenética para um sistema complementar de regulação da expressão gênica que não se baseava ou alterava a sequência de bases do ácido nucleico (NANNEY, 1958).

Atualmente, o termo epigenética refere-se a um conjunto de fatores capaz de controlar, reprimir ou estimular a expressão gênica (SHARMA; KELLY; e JONES, 2010). A regulação epigenética modula o acesso da maquinaria celular às informações genéticas, o que modifica a expressão gênica em um nível independente da sequência de nucleotídeos do DNA (SHARMA; KELLY; e JONES, 2010; TURNER e MORRIS, 2010; WOLFFE e MATZKE, 1999).

Em organismos eucariotos, o material genético é altamente compactado em forma de cromatina, uma estrutura formada por DNA e proteínas organizados em unidades repetitivas denominadas nucleossomos. Cada nucleossomo é constituído por oito histonas nas quais está envolto um trecho de DNA de aproximadamente 147 pares de bases (LUGER; DECHASSA; e TREMETHICK, 2012; SEGAL e WIDOM, 2009). Qualquer trecho da sequência de DNA pode, em teoria, estar organizado em forma de nucleossomo. Porém, a concentração homeostática de histonas garante associação com apenas uma proporção que varia entre 75 e 90% do DNA, criando uma competição entre as diferentes regiões de material genético para a formação de nucleossomos (SEGAL e WIDOM, 2009). O posicionamento e a distribuição dos nucleossomos não ocorrem de forma aleatória, sendo altamente relacionados com a acessibilidade da cromatina, visto que trechos de DNA não associados a nucleossomos são mais acessíveis à maquinaria celular que os trechos enovelados em histonas (LUGER; DECHASSA; e TREMETHICK, 2012; SEGAL et al., 2006). Assim, as posições genômicas dos nucleossomos influenciam fortemente a habilidade de ligação de proteínas a importantes sítios-alvo do DNA, como fatores de transcrição, iniciação de transcrição ou mesmo remodelamento de cromatina, fazendo com que os nucleossomos exibam funções tanto de repressores como de ativadores da expressão gênica (SEGAL e

WIDOM, 2009). Há uma estreita correlação entre o posicionamento de nucleossomos e marcas epigenéticas que ultimamente vem sendo mais profundamente investigada, e aponta para um processo bidirecional, onde um mecanismo determina o recrutamento do outro e compõem conjuntamente estímulos ou repressões à expressão (CHODAVARAPU et al., 2010;PORTELA et al., 2013).

As marcas epigenéticas consistem em eventos herdáveis através de transmissão pela divisão celular, e estáveis apesar de reversíveis (WOLFFE e MATZKE, 1999). Tais características tornam os mecanismos epigenéticos essenciais para diferenciação e manutenção celulares, apresentando padrões específicos para os diferentes tipos de tecido e etapas de desenvolvimento (FEINBERG; OHLSSON; e HENIKOFF, 2006). Além disso, as alterações epigenéticas parecem estar sujeitas a mecanismos de seleção natural Darwiniana similares aos demais eventos genéticos, tendo em vista que há uma variação epigenética intrínseca às populações celulares, que as mudanças epigenéticas são estáveis e herdáveis entre as gerações celulares e que há geração de efeitos fenotípicos a partir dos quais a seleção pode atuar (STRATTON; CAMPBELL; e FUTREAL, 2009b).

As modificações epigenéticas clássicas podem ser basicamente divididas em três tipos: mecanismos com envolvimento de RNA não-codificantes, modificações pós-traducionais em histonas e metilação de citosinas do DNA.

A metilação de DNA é um dos principais mecanismos de controle epigenético e consiste na adição de radicais metil ao carbono 5 da citosina através de modificação covalente que ocorre pela ação de enzimas DNA-metiltransferases (DNMTs) (BRANCO; FICZ; e REIK, 2012;JONES e BAYLIN, 2002). Em humanos, assim como nos demais mamíferos, a metilação é introduzida pelas DNMT3A e DNMT3B, enquanto a DNMT1 se encarrega da manutenção da metilação do DNA, devido a sua afinidade por DNA hemimetilado (OKANO et al., 1999). A metilação ocorre em dinucleotídeos 5'CG3' (CpG), que geralmente estão agrupados nas chamadas ilhas CpG, distribuídas desigualmente pelo genoma, porém frequentemente associadas com a região 5' não traduzida de genes (ROBERTSON, 2005). Quando tais ilhas CpG estão localizadas em promotores gênicos,

situação que ocorre em aproximadamente 70% dos genes (HAN et al., 2008), a metilação é usualmente uma marca de repressão ou silenciamento da expressão gênica através do bloqueio direto ou indireto da ligação a fatores reguladores de transcrição (BRANCO; FICZ; e REIK, 2012).

Apesar dos padrões de metilação em células somáticas diferenciadas serem geralmente estáveis e herdáveis, durante o desenvolvimento de mamíferos há ocorrência de ao menos dois períodos nos quais há uma reprogramação global nos padrões de metilação pela remoção destas marcas epigenéticas, seguida por novas ondas de metilação (SMITH e MEISSNER, 2013). Essa reprogramação parece ter um papel crucial no estabelecimento de diferentes potenciais de transformação e desenvolvimento de células mais diferenciadas, e estabelecimento de padrões de expressão específicos nos diferentes tecidos (REIK; DEAN; e WALTER, 2001).

Padrões de metilação aberrantes do DNA já foram associados a diversas patologias, principalmente câncer (ROBERTSON, 2005). Foram descritos padrões diferentes de metilação entre células normais e tumorais, frequentemente apresentando padrão tumor-específico (PONDER, 2001; ROBERTSON, 2005; WU e ZHANG, 2010). Alterações no padrão de metilação de promotores gênicos específicos já foram descritas em associação a fases precoces de tumorigênese, servindo como um mecanismo de iniciação à oncogênese (FEINBERG; OHLSSON; e HENIKOFF, 2006; WIDSCHWENDTER et al., 2007).

A maioria das ilhas CpGs que estão localizadas nas regiões promotoras de genes encontram-se geralmente desmetiladas em células normais. Em tumores, entretanto, a hipermetilação de regiões promotoras é a modificação epigenética mais comum, frequentemente associada com silenciamento transcricional de genes, geralmente supressores tumorais (ESTELLER et al., 2001). Portanto, o silenciamento epigenético pode atuar como um dos dois *hits* necessários para inativar supressores tumorais de acordo com o modelo de Kudson (JONES e BAYLIN, 2002).

A metilação de citosinas pode ainda influenciar a tumorigênese através de outros mecanismos. A 5-metilcitosina sofre alta taxa de desaminação espontânea causando

transições de citosinas metiladas para timinas. Cerca de 50% das mutações de ponto inativadoras que ocorrem no gene *TP53* atingem citosinas metiladas (RIDEOUT, III et al., 1990). A presença do grupo metil em dinucleotídeos CpG na região codificadora deste gene aumenta a taxa de mutações induzidas por radiação ultravioleta durante o desenvolvimento de tumores de pele (JONES e BAYLIN, 2002).

Células tumorais exibem um padrão de hipometilação global em comparação a células normais, característica há bastante tempo já relacionada a progressão tumoral (FEINBERG et al., 1988; FEINBERG e VOGELSTEIN, 1983; GAMA-SOSA et al., 1983). Eventos anômalos de hipometilação associados a promotores gênicos permitem a ativação e superexpressão imprópria de genes, incluindo oncogenes (FEINBERG e TYCKO, 2004). Além disso, hipometilação está intrinsicamente associada a instabilidade genética, levando à formação de rearranjos cromossômicos e alterações em número de cópias de DNA (CADIEUX et al., 2006; CHEN et al., 1998). Ilustrando esse fenômeno, observamos instabilidade centromérica em indivíduos portadores de mutações germinativas de *DNMT3B*, e aumento de deleções em células tronco murinas deficientes em DNA metiltransferase-1 (JONES e BAYLIN, 2002). A hipometilação é mais evidente em elementos repetitivos do tipo satélite da região pericentromérica. Em tumores de Wilms, as quebras em blocos heterocromáticos hipometilados resultam em altas taxas de translocações entre os cromossomos 1 e 16 (FEINBERG e TYCKO, 2004). Outra conexão entre a hipometilação e instabilidade cromossômica ocorre na ativação dos elementos retrotransposons *LINE-1* (*Long interspersed nuclear element-1*) em tumores, como o colorretal e o carcinoma hepatocelular, resultando em rearranjos cromossômicos e pior prognóstico (KITKUMTHORN e MUTIRANGURA, 2011; SHIGAKI et al., 2013; SUTER; MARTIN; e WARD, 2004; TAKAI et al., 2000).

Em suma, padrões aberrantes de metilação de DNA são característicos de tecidos tumorais, podendo ser resumidos em dois cenários principais:

- (A) Em células normais, as ilhas CpG em promotores gênicos não estão em sua maioria metiladas, permitindo a transcrição gênica. Além disso, há metilação no corpo do

gene, o que impede a utilização de sítios de início de transcrição (SIT) incorretos. Células tumorais apresentam padrão oposto de metilação, com aumento de ilhas hipermetiladas , levando à inativação de genes, e hipometilação no corpo do gene, tendo como consequência a transcrição gênica a partir de SIT incorretos;

(B) Em células normais, ocorre metilação de sequências repetitivas. Mais uma vez, este padrão é em parte perdido em células tumorais, com hipometilação gerando instabilidade genômica, ativação de elementos transponíveis e transcrição ilegítima a partir de SIT incorretos (RODRIGUEZ-PAREDES e ESTELLER, 2011).

Esses padrões aberrantes de metilação de DNA em células tumorais em relação às suas contrapartes normais encontram-se ilustrados na **Figura I.4**.

Figura 1.4. Comparação entre padrões de metilação de DNA encontrados em células normais e em células tumorais, e caracterização de suas consequências para a transcrição genômica. Em regiões codificadoras, há uma perda de metilação nas ilhas CpG em tumores, e ganho de metilação no corpo do gene, causando inativação gênica e gerando ativação de sítios de início de transcrição incorretos. Já em sequências repetitivas, há uma hipometilação em tumores, aumentando a ocorrência de ativação de sítios de início de transcrição incorretos, e aumentando a instabilidade genômica, assim como a ocorrência de transposição. Os círculos em vermelho representam as marcas de metilação de DNA.

Adaptado de (RODRIGUEZ-PAREDES e ESTELLER, 2011).

A análise dos padrões de metilação de DNA permite a identificação de conjuntos de marcadores para diagnóstico molecular, prognóstico e resposta a terapia (RODRIGUEZ-PAREDES e ESTELLER, 2011). Na grande maioria dos estudos, o status de metilação foi investigado apenas para alvos específicos, em especial promotores gênicos de genes selecionados (FOUSE; NAGARAJAN; e COSTELLO, 2010). Atualmente, o padrão de metilação de DNA pode ser avaliado de maneira abrangente, utilizando tecnologias de alta resolução, como microarranjos e sequenciamento de nova geração. Apesar dos avanços, o conhecimento de quantas e quais CpGs participam da regulação genômica, ainda é limitado. Um estudo recente demonstrou que apenas uma pequena fração de CpGs apresenta alterações em seus padrões de metilação em diferentes estados patológicos (ZILLER et al., 2013).

Nos últimos anos, um microarranjo capaz de interrogar o grau de metilação de mais de 450 mil sítios CpGs com foco em regiões de ilhas CpGs e regiões codificadoras tornou-se disponível e tem produzido resultados sólidos (ROESSLER et al., 2012; SANDOVAL et al., 2011). Há pouca representação de regiões repetitivas nesse microarranjo, porém, este viés pode ser facilmente complementado com a investigação do status de metilação de sequências repetitivas como LINE1 através da técnica de pirosequenciamento, que fornece uma medida confiável da porcentagem de citosina metilada em cada sítio investigado (SHAMES; MINNA; e GAZDAR, 2007).

Metilação de DNA em hepatoblastomas

Em hepatoblastoma, estudos de metilação de promotores de genes selecionados revelou hipermetilação de *MT1G*, gene que regula negativamente o crescimento (SAKAMOTO et al., 2010), *RASSF1A*, que desempenha papel de supressor tumoral (HONDA et al., 2008b), além dos promotores de *SOCS1*, *CASP8*, *SFRP1*, *APC*, *HHIP* e *IGFBP3* (NAGAI et al., 2003; REGEL et al., 2012; TOMLINSON e KAPPLER, 2012a). Uma

alta frequência de inativação do gene *H19*, possível supressor tumoral, já foi relatada por eventos diversos, entre eles a hipermetilação de seu promotor (HONDA et al., 2008a).

Um estudo recente (RUMBAJAN et al., 2013) avaliou em hepatoblastomas o grau de metilação de 33 regiões diferencialmente metiladas que sofrem *imprinting*, encontrando uma hipometilação em algumas dessas regiões tanto nos tecidos tumorais quanto nos tecidos adjacentes normais quando comparados a fígados saudáveis, sugerindo que este padrão preceda o desenvolvimento neoplásico, podendo ser até constitutivo. Já o fenômeno de hipermetilação foi verificado para as regiões *INPP5Fv2-DMR*, *RB1-DMR* e *GNASXL-DMR*, e consistiu em um evento exclusivamente tumoral. O mesmo estudo analisou o grau de metilação das regiões repetitivas LINE-1, usualmente hipometiladas em tumores, não encontrando grandes diferenças entre hepatoblastoma, tecido normal adjacente ou fígado normal, exceto por um pequeno desvio de hipometilação na primeira CpG da sequência investigada. Os autores sugeriram, então, que a ausência de hipometilação de LINE-1 poderia refletir um mecanismo distinto no desenvolvimento de tumores embrionários.

Em suma, estudos mais abrangentes de metilação em hepatoblastomas ainda são necessários. Novos dados podem delinear uma possível relação entre a tumorigênese dos hepatoblastomas e estágios do desenvolvimento hepático.

Capítulo II.

Objetivos

Capítulo II. Objetivos

No presente estudo visamos identificar alterações somáticas genéticas e epigenéticas em um grupo de hepatoblastomas e discutir esses resultados no contexto de seu possível papel na organogênese do fígado e tumorigênese de hepatoblastomas.

II.1. Objetivos específicos

Para atingir o objetivo proposto, investigaremos um grupo de hepatoblastomas utilizando três abordagens metodológicas, especificamente: estudo de desequilíbrios cromossômicos (cariótipo molecular), sequenciamento de exoma e análise do padrão de metilação do DNA através de:

- Determinação do perfil de alterações do número de cópias de segmentos de DNA, utilizando a técnica de *array*-CGH em plataforma 180K (plataforma *OGT* desenvolvida com tecnologia *Agilent Technologies*); esse estudo foi complementado pela análise da expressão de genes contidos nas regiões identificadas como recorrentemente afetadas por desequilíbrios genômicos com o uso de PCR quantitativo em tempo real;

- Investigação de mutações de ponto em regiões codificadoras por meio de sequenciamento das regiões codificadoras de hepatoblastomas (captura de exons pelo sistema *Agilent SureSelect* e sequenciamento em plataforma *Illumina Hi-Seq 2000*);

- Análise do padrão de metilação de DNA (sítios CpG) no genoma de hepatoblastomas, utilizando a técnica de microarranjos *BeadArray* (plataforma *Infinium HD 450K Illumina*); esse estudo foi complementado pela análise de nível de metilação

(pirosequenciamento) e de expressão (PCR quantitativo em tempo real) de genes contidos nas regiões identificadas como diferencialmente metiladas nos tumores.

Capítulo III.
Casuística e métodos

Capítulo III. Casuística e Métodos

III. 1. Aspectos éticos

O projeto tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP - Hospital do Câncer A. C. Camargo: Projeto de Pesquisa 768/06 (Análise de expressão gênica através de *microarray* de vários estágios de desenvolvimento do rim e fígado e suas implicações em tumores embrionários). Pais ou outros responsáveis legais dos propósitos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para participação nestes protocolos e receberam aconselhamento pré-teste. O TCLE utilizado está na seção **Apêndice – Item I**.

III. 2. Casuística

Para este estudo retrospectivo, foram solicitadas amostras de tecido congelado dos nove hepatoblastomas depositados no Biobanco - Banco de Tumores do A. C. Camargo Cancer Center (ACCCC). Por meio de colaboração com o grupo da Dra. Silvia Regina Caminada Toledo, coordenadora do Laboratório de Genética do GRAACC (Grupo de Apoio ao Adolescente e à Criança com Câncer), foram obtidas amostras de tecidos congelados de dez hepatoblastomas adicionais, que foram integradas como um grupo independente para validação biológica dos achados decorrentes da análise de metilação de DNA.

Secções de cortes histológicos dos tumores foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E), para análise histológica detalhada para confirmação de diagnóstico e seleção do tecido de interesse, realizada pela patologista Dra. Isabela Werneck (ACCCC). Todas as amostras foram encaminhadas para macrodissecção manual dos tecidos de interesse (tecido tumoral e borda tumoral composta de tecido morfológicamente normal, quando disponível) pelo Biobanco do ACCCC.

Os dados clínicos disponíveis foram recuperados dos prontuários armazenados no Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do HCACC, sob supervisão da Dra. Cecilia Maria Lima da Costa, chefe do Departamento de Oncologia Pediátrica do ACCCC. Os dados clínicos referentes às amostras do GRAACC foram recuperados, com o auxílio das Dras. Silvia Regina Caminada Toledo e Monica dos Santos Cypriano (grupo de Oncopediatra do GRAACC). A **Tabela III.1** exibe dados clínicos e histopatológicos recuperados e obtidos, respectivamente, para nossa coorte.

Tabela III.1. Caracterização clínica e histopatológica da coorte de hepatoblastomas.

Amostra	Idade ao diagnóstico	Sexo	Instituição de origem	Laudo anatomopatológico (classificação histopatológicas dos hepatoblastomas)	Dosagem sérica de alfa-feto proteína ao diagnóstico (ng/ml)	Hepatectomia	Recidiva	Metástase	Sobrevida
HB-1	2,5 anos	F	ACCCC	Embrionário em 100% da amostra	5.668	Total	Não	-	Óbito em 1 ano e 1 mês
HB-2	10 meses	M	ACCCC	Fetal em 30% da amostra com 70% de fígado não neoplásico, separável por macrodissecção (Foi retirada manualmente a borda de fígado não neoplásico)	-	Parcial	Não	-	> 11 anos
HB-3	3 anos	F	ACCCC	Fetal em 30% da amostra com 70% de fígado não neoplásico, separável por macrodissecção (Foi retirada manualmente a borda de fígado não neoplásico)	>400	Parcial	Não	-	> 10 anos
HB-4	9 meses	M	ACCCC	Embrionário em meio a fibrose	>200	Total	Não	-	> 9 anos
HB-5	20 anos	M	ACCCC	Embrionário em meio a fibrose e necrose	-	Parcial	Sim	-	Óbito em 1 ano e 4 meses
HB-6	5,5 anos	M	ACCCC	Misto epitelial-mesenquimal. Fetal em 85% da amostra, embrionário em 10% e pequenas células indiferenciadas em 5%	>1.000	-	Sim	Pulmonar	-
HB-7	2 anos	M	ACCCC	Fetal em 100% da amostra	742,70	Parcial	-	-	> 5 anos
HB-8	3 anos	F	ACCCC	Hepatoblastoma misto em 50% da amostra. 50% de osso	9.328	Total	Não	Pulmonar	> 5 anos
HB-9	3 meses	F	ACCCC	Fetal em 100% da amostra	28.312	Parcial	Não	-	> 2 anos
HB-10	2 anos e 2 meses	M	GRAACC	Fetal em 100% da amostra	-	Parcial	Não	Não	> 10 anos
HB-11	1 ano e 1 mês	F	GRAACC	40% embrionário, 5% fetal, 10% estroma não tumoral, 55% estroma tumoral	1870	Parcial	Não	Não	> 7 anos
HB-12	12 anos	F	GRAACC	90% fetal, 10% estroma não tumoral	643,4	Parcial	Não	Não	> 2 anos
HB-13	7 anos	M	GRAACC	70% fetal, 30% estroma	>300	Parcial	Não	Não	Óbito em 8 meses
HB-14	2 anos	M	GRAACC	Fetal em 100% da amostra	18422,6	Parcial	Não	Não	> 4 anos
HB-15	1 ano e 9 meses	M	GRAACC	30% fetal, 15% embrionário, 55% estroma	201,73	Parcial	Não	Pulmonar (diagnóstico)	> 2,5 anos
HB-16	13 anos	M	GRAACC	50% fetal, 50% estroma	-	Total	Não	Não	-
HB-17	1 ano e 8 meses	M	GRAACC	50% embrionário, 50% estroma	183,47	Parcial	Não	Não	> 6 anos
HB-18	4,5 anos	M	GRAACC	70% embrionário, 30% estroma tumoral	-	Parcial	Não	Não	-
HB-19	5 meses	F	GRAACC	Fetal em 90% da amostra	41000	Parcial	Não	Não	Óbito em 8 meses

F: feminino, M: masculino; ACCC: A. C. Camargo Cancer Center; GRAACC: Grupo de Apoio ao Adolescente e à Criança com Câncer; - : sem informação disponível.

Como referências universais, utilizamos dois *pools* de amostras de DNA genômico total, feminino e masculino (*Promega*). Duas amostras de fígados humanos fetais morfologicamente normais, provenientes de materiais de aborto de primeiro e segundo trimestres de gestação (*Novogenix Labs*), foram utilizadas como fonte de comparação dos padrões moleculares encontrados nos tumores embrionários.

III. 3. Extrações de DNA e RNA

As extrações de DNA e RNA foram realizadas pelo Banco de Macromoléculas do ACCCC. A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo padrão fenol: clorofórmio, que resulta em alíquotas de biomoléculas estáveis a longo prazo a -80°C. As amostras apresentaram alto peso molecular, visualizado por eletroforese em gel de agarose 1%, demonstrando a presença majoritária de moléculas longas, pouco ou nada degradadas. As amostras de DNA foram quantificadas pelos equipamentos *Qubit 2.0 Fluorometer* (*Invitrogen*), que mede a quantidade de DNA dupla fita na amostra através do sistema fluorométrico e *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific*) que, por meio de espectrofotometria, estima a absorbância da amostra, permitindo quantificar o DNA (260 nm) e mensurar a proporção de contaminantes na amostra (proteínas absorvem a luz a 280 nm e compostos orgânicos a 230 nm). Uma amostra com alto grau de pureza de DNA apresenta as absorbâncias 230:260:280 em uma relação aproximada de 1:1,8:1.

As extrações de RNA foram realizadas com o *kit* comercial *RNeasy* (*Qiagen*), segundo recomendações do fabricante. Para a avaliação da quantidade e qualidade de RNA, utilizamos o equipamento *2100 Bioanalyzer* (*Agilent Technologies*), no qual 1 µL (contendo no máximo 80 ng) do eluído de RNA total de cada amostra foi aplicado em um chip próprio para a corrida. O programa gera duas imagens, uma correspondente à corrida de eletroforese em um gel de agarose e a outra referente a um eletroesferograma. Conforme o resultado do eletroesferograma, é atribuído um valor de qualidade (RIN – *RNA integrity number*) que varia de 1 (ruim) a 10 (excelente) (SCHROEDER et al., 2006). A imagem

semelhante ao gel de agarose mostra as bandas ribossômicas 28S e 18S, permitindo também uma avaliação de integridade de forma visual. Somente amostras que apresentaram RIN > 5 foram utilizadas para as análises.

III. 4. Alterações no número de cópias de sequências de DNA

Array-CGH

A identificação de alterações cromossômicas somáticas de ganhos e perdas de segmentos de DNA foi realizada utilizando a técnica de hibridação genômica comparativa em microarranjos de oligonucleotídeos (*array-CGH*). Esta técnica permite a detecção de variações no número de cópias de segmentos de DNA da amostra teste em relação a uma amostra referência. As razões das intensidades de fluorescências normalizadas teste/referência (cianinas Cy3 e Cy5) para cada sonda imobilizada são detectadas após hibridização e refletem as quantidades de DNA existentes para cada segmento específico de DNA em cada amostra.

O *oligoarray* utilizado nos experimentos de *array-CGH* (*design* 036217 - Oxford Gene Technologies - OGT) contém 180.000 sondas com 60 nucleotídeos cada, tendo sido customizado por nós a fim de oferecer cobertura enriquecida em cerca de 800 genes previamente relacionados a câncer e desenvolvimento morfológico do fígado (Lista de genes apresentada na seção **Apêndice - Item II**). Na plataforma 180K, o espaçamento médio entre os oligonucleotídeos é de 17 Kb, mas a distribuição real ao longo do genoma é variável, com maior densidade em regiões codificadoras. Adicionalmente, a resolução efetiva de mapeamento de alterações cromossômicas depende do número mínimo de oligonucleotídeos considerado para identificação das mesmas.

Analizamos quanto ao número de cópias as nove amostras provenientes do ACCCC (HB-1 a HB-9). Os experimentos de *array-CGH* seguiram as instruções do protocolo “CytoSure™ Genomic DNA Labelling Kit protocol” do fabricante das lâminas (OGT).

Utilizamos como DNA referência *pools* de DNA comercial pareados por sexo (*Promega*). Brevemente, foram utilizadas alíquotas de 1µg das amostras teste e controle, em soluções de 18µL. Foram adicionados às soluções de DNA 10µL de *Random Primer* e 10µL de tampão específico (*Reaction buffer*). As amostras de DNA em solução foram fragmentadas por calor e desnaturadas (10 minutos a 99°C), seguido de imersão em gelo por 5 minutos. A marcação com 1µL de Cy3 (amostra teste) ou Cy5 (referência), 10µL de *dCTPs* e 1µL de enzima *Klenow* foi realizada por duas horas a 37°C, seguida por inativação enzimática da *Klenow* a 65°C por 10 minutos. A purificação da marcação foi feita com colunas de resina, seguida de secagem de solução em baixa temperatura e no escuro através do aparelho concentrador *SpeedVac* (*Thermo Savant*), até que o volume total passasse de 45µL a aproximadamente 20µL.

A eficiência da incorporação dos fluorocromos aos fragmentos de DNA foi avaliada após leitura da fluorescência e quantidade de amostra no aparelho *Nanodrop* (*Thermo Scientific*), medindo as absorbâncias nos comprimentos de onda de 260nm, 550nm e 650nm. As medidas de DNA e fluorescência a serem obtidos a cada 1µg de DNA marcado, respectivamente, devem estar na faixa de 6µg e 250pmol para amostras marcadas com Cy3, e 5µg e 200pmol para amostras marcadas com Cy5. Em nossos experimentos obtivemos marcações cerca de duas vezes mais elevadas que o mínimo recomendado. As amostras teste e referência foram então, proporcionalmente à marcação obtida, misturadas em uma única solução de hibridização. A cada solução de hibridização foi adicionado 5µg de *Human Cot-1 DNA* (*Invitrogen*), DNA placentário enriquecido para sequências de DNA repetitivo como as famílias *Alu* e *Kpn*, utilizado para suprimir as sequências repetitivas de DNA das amostras.

Para o procedimento de hibridação, foram adicionados 11µL de *10x Blocking Agent* e 58,2µL de *2x Hi-RPM Hybridization Buffer* (ambos *Agilent Technologies*) à solução de DNA da amostra com *Cot-1 DNA*. Cada amostra permaneceu por 3 minutos a 94°C para desnaturação das sequências de DNA, seguido de incubação a 37°C durante 30 minutos para que ocorresse o *pre-annealing* (supressão de sequências repetitivas pelo *Cot-1 DNA*).

As amostras foram então colocadas imediatamente sobre os microarranjos, e o processo de hibridação prosseguiu por um período mínimo de 40 horas no forno de hibridização, com temperatura de 65°C e movimentação centrípeta a 20 rpm. As lâminas hibridizadas foram lavadas nos tampões *Oligo ACGH Wash Buffer 1* por 10 minutos, e por 1 minuto no tampão *Oligo ACGH Wash Buffer 2* pré-aquecido a 37°C (ambos *Agilent Technologies*), seguido de imersão por 30 segundos em acetonitrila (*Sigma-Aldrich*) e por 10 segundos em *Dry solution* (*Agilent Technologies*).

A obtenção das imagens dos microarranjos foi realizada no equipamento *SureScan High Resolution* (*Agilent Technologies*) sob resolução de 2 µm. As intensidades dos fluorocromos a partir das imagens obtidas com o *scanner Agilent* foram extraídas com o programa *Feature Extraction v10.7.3.1* (*Agilent Technologies*). A análise final foi realizada por intermédio do *software Genomic Workbench 6.9* (*Agilent Technologies*) usando o algoritmo estatístico ADM-2 e limiar de sensibilidade 6,7. Para a avaliação de ganhos ou perdas no número de cópias de segmentos de DNA, foram consideradas como possíveis alterações de número de cópias (*copy number alteration* – CNA) apenas aquelas que abrangiam no mínimo cinco oligonucleotídeos consecutivos com o $\log_2$ da razão teste/referência $\geq 0,3$ ou $\leq -0,3$, respectivamente ganhos e perdas. A resolução efetiva média resultante foi portanto de 100 Kb. Regiões com o $\log_2$ da razão teste/referência acima de 1,2 foram consideradas ganhos de alto número de cópias (*amplicons*) e abaixo de -1,2 foram considerados como perdas em homozigose.

Desconsideramos em nossa análise as variações descritas por três ou mais estudos no banco de dados de variações estruturais presentes em indivíduos controle (*Database of Genomic Variants* - DGV; <http://projects.tcag.ca/variation/>), assim como as chamadas para os cromossomos sexuais. Utilizamos a anotação do genoma humano *GRCh37/hg19* proveniente do *Genome Browser* da *University of California Santa Cruz* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

PCR quantitativo em tempo real

O sistema de PCR quantitativo em tempo real (*Real-time qPCR*) é baseado na detecção e quantificação de uma molécula repórter fluorescente durante a reação de amplificação em cadeia polimerase (*PCR – Polymerase Chain Reaction*). O sinal fluorescente emitido é detectado instantaneamente e aumenta proporcionalmente à quantidade de produto de PCR na reação. Quanto maior o número de fragmentos iniciais do DNA-alvo, mais cedo é observado o sinal e aumento na fluorescência. Quando o valor obtido para o gene testado é estimado a partir do valor obtido do gene referência, é possível avaliar comparativamente se os genes testados exibem maior ou menor número de cópias de DNA ou cDNA em relação às medidas obtidas em uma amostra referência.

As reações de PCR quantitativo em tempo real foram realizadas pelo sistema *SYBR Green* (*Applied Biosystems*) em um aparato *7500 Fast Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*). O sistema *SYBR Green* é baseado na ligação de um corante que emite fluorescência quando se liga ao DNA dupla fita.

Real-time qPCR para validação das alterações de número de cópias

Selecionamos duas regiões identificadas por *array-CGH* como afetadas por ganhos em alto número de cópias (*amplicon*) para serem validadas pela técnica de *Real-time qPCR*: um segmento em 2q24 e uma pequena sequência, envolvendo apenas cinco sondas alteradas, em 5q31.1. Adicionalmente, no amplicon em 5q31.1, avaliamos também o número de cópias da região compreendida entre a última sonda identificada como amplificada pelo *array-CGH* e a primeira da região considerada em número normal de cópias (ponto de quebra do amplicon), região que compreende o gene *MIR-4461* (***Figura III.1***).

Figura III. 1. Segmento alterado em 5q31.1. No ideograma, a barra vermelha representa a localização da amplificação no cromossomo. A imagem intermediária, gerada através do programa *Genome Workbench* (Agilent), mostra a região que contém a amplificação, representada pelas sondas em verde. Abaixo, a imagem originada pelo navegador do banco de dados *UCSC* permite visualização da região máxima da amplificação, que compreende o gene *MIR4461*.

Os pares de iniciadores (*primers*) foram desenhados com o auxílio do *software* *OligoTech* (*Oligos Etc.'s*), que avalia a temperatura de *melting* do amplicon, e a possibilidade de formação de estruturas secundárias e de homodímeros. As regiões testadas e os iniciadores desenhados estão descritos na **Tabela III.2**, a seguir.

Tabela III. 2. Mapeamento das regiões do genoma, incluindo genes e sequências de *primers*, selecionadas para validação por *Real-time qPCR* a partir de resultados obtidos por *array-CGH*

Mapeamento da CNA	Gene selecionado	RefSeq	Mapeamento do Gene	Primer Forward (F) ou reverse (R)	Sequência 5'-3'
chr2:156868953-166963659	DAPL1	NM_001017920	chr2:159651829-159672496	F	CAGACACTGGATGCCCTG
				R	GTCAATCTGCCCAGTGGATCC
chr5:134259148-134262059	PCBD2	NM_032151	chr5:134240810-134298336	F	GGTGATATGGGCGATCGATG
				R	CAGGCACCAAGAAGTGAGC
chr5:134259148-134262059	MIR-4461	NR_039666	chr5:134263729-134263802	F	GTCTAGGCCATACGTGTTG
				R	GAGTGGGTGTTGAGGGTTATG

O *pool* de DNA genômico comercial (*Promega*) foi utilizado como referência de número de cópias nas reações tanto para *array*-CGH quanto para *Real-time qPCR*. Os genes utilizados como referência para *Real-time qPCR* foram *GAPDH* (12p13) e *P2RX7* (12q24), mapeados em regiões do genoma para as quais não foram detectadas alterações no número de cópias nos tumores testados. As reações foram realizadas com 10µL de *SYBR Green*, 0.6µL de cada *primer* (*Foward* e *Reverse*) em concentração de 10µM, 20ng de DNA e 4,8µL de água. Todas as amostras foram corridas em triplicatas e os resultados foram analisados utilizando o método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), o qual assume que a amostra de DNA calibradora tem duas cópias dos genes referência e teste, enquanto a amostra teste apresenta duas cópias do gene controle. Valores no intervalo entre 0,8 - 1,2 indicaram número normal de cópias (2 cópias), enquanto valores < 0.6 indicaram perdas, e > 1.4, ganhos.

Real-time qPCR para avaliação da expressão gênica

Selecionamos 90 genes para análise de expressão em placa, incluindo: (1) seleção de genes afetados por CNA recorrentes em nosso estudo por *array*-CGH e (2) genes previamente descritos como relacionados a hepatoblastoma. Para serem considerados como relacionados a hepatoblastomas, os genes foram escolhidos através de um *ranking* da medida de "*Relevance Score*" proveniente de cálculos executados pelo algoritmo "*Solr*", disponível pelo banco de dados de compilação de informações gênicas *GeneCards* (<http://www.genecards.org>).

Utilizamos o método "*SYBR-green based array RT² qPCR Primer Customized Assay*" (Lote 1129272508 - *Qiagen Technologies*), empregando uma placa customizada para realização de ensaios de *Real-time* PCR tendo como molde o cDNA da amostra de interesse. Cada placa possui 384 poços, permitindo testar até 96 genes em quadruplicata, ou seja, suficiente para os 96 genes selecionados (90 genes de interesse e 6 controles) em 4 amostras. Foi utilizado um total de quatro placas para testar 16 amostras, especificamente

nove hepatoblastomas, cinco amostras de fígado não-tumoral (controle tecidual normal) e duas amostras de fígados fetais.

Primeiramente, o RNA total foi enzimaticamente convertido em cDNA utilizando o kit “*RT² First Strand*” (Qiagen), conforme as recomendações do fabricante. O cDNA obtido foi utilizado como molde em uma reação de PCR convencional a fim de assegurar a qualidade e pureza da conversão, utilizando *primers* intrônicos para o gene *MLH1* (*Primer Forward*: 5'TGGTGTCTCTAGTTCTGG 3' – localizado no intron 12; *Primer Reverse*: 5'CATTGTTGTAGTAGCTCTGC 3' – localizado no intron 13). A reação consistiu em 2,5 µl de Buffer 10x, 0,8 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µl de dNTP (10 mM), 1,25 µl *Primer Forward* e *Reverse* (10 µM), 0,5 µl de cDNA (100 ng/ul), 0,2 µl de Taq Platinum (5 U/µl) e 18,0 µl de H₂O milliq; em um ciclo de 94°C – 4min, 35x (94°C – 45seg, 55°C – 45seg e 72°C – 1min), 72°C – 6min e 4°C – ∞.

A seguir, a reação de PCR quantitativo em tempo real foi realizada utilizando o kit “*RT² SYBR Green ROX qPCR Mastermix*” (Qiagen). A cada 1µl de cDNA foram adicionados 6µl de 2x *RT2 SYBR Green Mastermix* e 3ul de *RNase-free water*. No termociclador *ABI Prism 7500 Detection System*, o seguinte programa foi realizado: 95 °C por 15 minutos; 40 ciclos de: 95 °C por 30 segundos (ativação da *HotStart Taq Polymerase*), 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos (emissão e detecção de sinal fluorescente).

Os dados foram extraídos com a utilização do programa *Sequence Detection Systems* (SDS) versão 2.4.1 (*Applied Biosystems*). A determinação dos genes referência mais estáveis se deu com a utilização do algoritmo '*RefFinder*' (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>), que integra os métodos '*geNorm*' (VANDESOMPELE et al., 2002), '*Normfinder*' (ANDERSEN; JENSEN; e ORNTOLT, 2004), '*BestKeeper*' (PFAFFL et al., 2004) e o método comparativo de $\Delta\Delta C_t$ (SILVER et al., 2006); obtendo os melhores resultados para os genes *hHPRT1* e *ACTB*. A análise dos dados gerados foi realizada através do pacote “*From Ct to Fold Change in Minutes*” (Qiagen) e dos softwares *Excel 2010* (Microsoft) e *Prism 6* (GraphPad), utilizando a quantificação relativa da expressão pelo método “ $\Delta\Delta C_t$ ” e o teste estatístico *t-student*, considerando como grupo

controle as amostras de fígado não-tumoral maduro. Os genes foram considerados como diferencialmente expressos entre os grupos quando os valores de *Fold-change* foram ≥ 4 com *p-value* ≤ 0.05 . Predições de interações proteicas foram analisadas por meio do banco de dados '*I2D Interologus Interactions Database*' (<http://ophid.utoronto.ca>).

III. 5. Mutações somáticas em regiões codificadoras

O sequenciamento de exoma foi realizado por sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS) pela empresa *Oxford Gene Technologies*. A partir de quantificação pelo aparato *Qubit (Invitrogen)*, que quantifica apenas o DNA presente em dupla fita através do sistema de fluorometria, foram selecionados cinco pares de tumor e correspondente borda hepática (5 µg de DNA genômico de HB-2 e FIG-2, HB-3 e FIG-3, HB-4 e FIG-4, HB-8 e FIG-8, e HB-9 e FIG-9); outro par, constituído por amostra tumoral e respectiva amostra de DNA extraído de sangue periférico (HB-5 e SP-5), foi também escolhido por se tratar da única ocorrência em nossa casuística diagnosticado como hepatoblastoma congênito.

A primeira etapa para o sequenciamento de exoma envolveu a construção da biblioteca de fragmentos de interesse, em nosso caso, bibliotecas *paired-end* com enriquecimento de regiões codificadoras. Brevemente, esta etapa envolveu a quebra do DNA em fragmentos de 120 a 200 pares de bases, seguida de reparo das extremidades 5' e 3' e da ligação de adaptadores a cada fragmento. Então, foi realizada uma captura seletiva das regiões codificadoras (éxons) utilizando o sistema *244K Agilent SureSelect Target Enrichment (Agilent Technologies)* seguindo o protocolo "*Agilent's SureSelect Protocol Version 1.2*", recomendado pelo fabricante, que é adaptado para posterior uso das amostras no sequenciamento. O enriquecimento da biblioteca por intermédio de sistema de captura consistiu em hibridizar seletivamente o DNA genômico a sondas de 120-mer biotiniladas que, então, foram recuperadas por intermédio de *beads* magnéticas de streptavidina. Os fragmentos selecionados foram então amplificados e ligados a *indexes* específicos, que

identificam diferencialmente as amostras a serem sequenciadas. As bibliotecas foram quantificadas utilizando o kit “*Agilent’s QPCR NGS Library Quantification*” (G4880A – *Agilent Technologies*). As amostras foram então aliquotadas com uma concentração final de 10nM para, então, seguirem para o sequenciador.

A reação de sequenciamento utilizou o kit *TruSeq v3 chemistry* (*Agilent Technologies*) na plataforma *Illumina HiSeq2000* e seguiu as indicações do fabricante. Um fluxograma das reações experimentais envolvidas no processo até o sequenciamento pode ser visualizado na **Figura III. 2**.

Figura III. 2. Fluxograma representativo das etapas envolvidas desde a construção de biblioteca até a reação de sequenciamento de exoma.

Fonte: OGT NGS Project QC/Analysis report

Os experimentos de sequenciamento de exoma são frequentemente gerados utilizando o método de construção de biblioteca chamado *paired-end*, que consiste na obtenção de sequências de ambas as extremidades de uma molécula (FULLWOOD et al., 2009). Os dados de sequenciamento de experimentos utilizando bibliotecas *paired-end* são obtidos em dois diferentes arquivos: um para as sequências *forward* e outro para as sequências *reverse*, indicadas exatamente na mesma ordem que aparecem no primeiro arquivo. Para a melhor avaliação deste tipo de biblioteca é importante que, durante sua construção, a fragmentação dos segmentos de DNA seja a mais precisa possível, visando estimar a quantidade de bases presente entre as duas sequências obtidas para cada fragmento. A distribuição de tamanho dos fragmentos é, então, um parâmetro a ser considerado para avaliação da qualidade de construção de biblioteca. Além de possuir um pico entre 120 e 200 pares de base, é desejável encontrar curvas de distribuição de tamanho similares para todas as amostras, demonstrando homogeneidade inter-experimental. Esses parâmetros podem ser inspecionados no **Gráfico III. 1**, a seguir.

Gráfico III. 1. Distribuição do tamanho dos insertos da biblioteca para sequenciamento de exoma. No eixo Y estão plotadas as frequências de ocorrência de fragmentos na biblioteca, e no eixo X o tamanho dos insertos. Nos parâmetros ideais, o pico da distribuição encontra-se na faixa entre 120 e 200 pares de bases, e a distribuição é similar nas diferentes amostras, o que pode ser notado no gráfico.

Fonte: OGT NGS Project QC/Analysis report

A análise do sequenciamento de exoma pode ser dividida em três etapas principais: chamada de bases e análise de imagem, alinhamento e chamada de SNPs. Os arquivos de leitura com sua respectiva qualidade *Fastq* (COCK et al., 2010) foram gerados pela plataforma de sequenciamento de acordo com indicações do fabricante, apresentando a estrutura base exemplificada a seguir.

@EAS100R:136:FC706VJ:2:2104:15343:197393 1:Y:18:ATCAG

GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATAGTAAATCCATTTGTTCAACTCACAGTTT

+

!*(((((*+))%%%%%%%%+)(%%%%%%%%).1***-+*))**55CCF>>>>>CCCCCCCC65**

Estas quatro linhas representam um único *read*. A primeira linha especifica o nome do *read* e as coordenadas de seu *cluster* na *flow-cell*, e se inicia com o símbolo '@'. A segunda linha descreve a sequência em si do *read*. O código oficial para representar DNA é mantido pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) e inclui também códigos para identificar bases ambíguas, ou seja, os casos em que não se sabe ao certo a base correta, mas se sabe que deve ser um C ou T ou algo similar, sendo 'N' utilizado quando a base nucleotídica não pode ser determinada. A terceira linha começa com o caractere '+' e, opcionalmente, pode conter o identificador do *read*. Por fim, a última linha consiste em um código ASCII com o padrão de formato *Illumina* que se refere à qualidades das bases descritas na segunda linha. Estas qualidades são dadas em uma escala chamada '*Phred*' (valor de qualidade 'Q') que calcula a probabilidade de erro na determinação de uma base, cuja fórmula pode ser visualizada abaixo:

$$Q_{\text{sanger}} = -10 \log_{10} p$$

Tipicamente, os valores de *Phred score* estão entre 1 e 40. O **Gráfico III. 2**, abaixo, gerado através do pacote "*FastQC*", mostra as medianas das qualidades (*phred*) obtidas para as sequências de cada uma de nossas amostras. Um padrão de *Phred* > 30, indicador de ótima qualidade, pode ser visualizado para a grande maioria das sequências geradas para as 12 amostras.

Gráfico III. 2. Distribuições das medianas dos escores *Phred* de qualidade por amostra

Fonte: OGT NGS Project QC/Analysis report

Para analisar dados de sequenciamento é necessário um alinhamento com um genoma referência. Para humanos há várias opções de genoma referência, sendo mais relevantes as sequências disponibilizadas pelos bancos de dados *UCSC* e *Ensembl*. A versão mais recente do genoma humano referência do *UCSC* é chamada *hg19* e pode ser acessada pelo link <http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg19/bigZips/chromFa.tar.gz>. Os *reads* foram então mapeados contra a versão *hg19/GRCh37* utilizando o pacote *Burrows-Wheeler Aligner (BWA)* versão 0.6.1 (LI e DURBIN, 2010) (<http://bio-bwa.sourceforge.net>). Para aumentar a eficiência de alinhamento e de processamento computacional durante a análise, os algoritmos diminuem a sensibilidade, limitando o número de *mismatches* (bases que não correspondem entre a sequência referência e a sequência gerada pelo experimento, ou entre as sequências geradas) permitidos. Como os *reads* de NGS normalmente possuem uma qualidade maior em seu início é utilizada uma estratégia de "*seed and extend*": na primeira fase há investigação no início do *read*, e faz-se

a busca permitindo poucos erros (LI e HOMER, 2010). Encontrada uma posição de ancoramento do *read* em seu início, é feita a extensão do alinhamento de modo a maximizar o escore de alinhamento.

O realinhamento local nos *reads* em regiões mapeadas próximas a eventos de eventos de inserção/deleção (*indels*) foi realizado com o algoritmo *Genome Analysis Tool Kit* (GATK) versão 1.6 (<http://www.broadinstitute.org/gatk/download>) (MCKENNA et al., 2010). Este algoritmo prioriza um número mínimo de bases *mismatch*, ocasionando, como maior efeito, redução no número de chamadas de SNP (*single base polymorphism*) falso-positivas no entorno das *indels*, assim como uma melhor determinação do tamanho do evento.

Um viés da amplificação das sequências por meio de reações de PCR é a geração de artefatos como *reads* duplicadas, que podem introduzir chamadas de SNP falso-positivas. O algoritmo *Picard* versão 1.62 (<http://picard.sourceforge.net/>) foi utilizado para marcar *reads* duplicadas, não sendo estas removidas do alinhamento, mas sim desconsideradas para as análises seguintes. O escore de qualidade das bases (escala *Phred*) foi recalculado utilizando a recalibração por covariância do GATK, que melhora a acurácia da métrica de qualidade de bases, aumentando, por sua vez, a qualidade da chamada de variantes.

As chamadas para variantes de SNP e *indels* foram realizadas pelo algoritmo *GATK Unified Genotyper* (DEPRISTO et al., 2011). Os SNPs encontrados foram comparados aos existentes no banco de dados *dbSNP* versão 135 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), a fim de determinar quais já foram anteriormente descritos e quais eventos são inéditos na literatura. As variantes, assim como as anotações de genes e funções gênicas, foram obtidas através do *Ensembl*, permitindo associação sobre quais transcritos são afetados pelas variantes e quais variantes têm probabilidade de ocasionar problemas funcionais significativos. As anotações de variantes do *dbSNP* (versão 135) foram recuperadas para que as variantes encontradas com consequências preditas como danosas ao transcrito fossem rapidamente identificadas.

Todas as manipulações adicionais de arquivos BAM (*Binary Sequence Alignment/Mapping*) foram realizadas pelo algoritmo do *Samtools* 0.1.18 (<http://sourceforge.net/projects/samtools/files/samtools/0.1.18/>). A anotação dos variantes foi realizada através de uma ferramenta “*in house*”, e as chamadas disponibilizadas em formato tabular. Os alinhamentos foram visualizados e explorados pelo *IGV* (*Integrative Genomics Viewer, Broad Institute* - <http://www.broadinstitute.org/igv/>) versão 2.3 e *Microsoft Office Excel* (*Microsoft*).

A quantidade de dados gerada pelo sequenciamento das 12 amostras alcançou um total de 53,43 gigabases alinhadas. A predição acerca de alterações de aminoácidos capazes de alterar funções proteicas foi realizada através do algoritmo SIFT (*'Sorting Tolerant From Intolerant'* - <http://sift.jcvi.org/>), que analisa o grau de conservação de resíduos de aminoácidos em sequências correlatas (KUMAR; HENIKOFF; e NG, 2009). As alterações encontradas foram comparadas àquelas depositadas no banco de dados de mutações somáticas em câncer COSMIC versão 67 (FORBES et al., 2011) (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>). A análise *in silico* de enriquecimento de vias gênicas foi realizada através do *software Ingenuity Pathways Analysis* (IPA - Qiagen), utilizando a ferramenta “*core analysis*”, considerando o banco de dados do *software* (*Ingenuity Knowledgebase - genes + endogenous chemicals*).

A análise terciária dos dados com a anotação dos variantes foi realizada através de duas frentes independentes: (1) SVS: Filtragem e manipulação de variantes pelo *software* SVS (*SNP & Variation Suite 8*); (2) CIPE: Manipulação “*in house*”, com as chamadas disponibilizadas em formato tabular, na qual os alinhamentos foram visualizados e explorados pelo *IGV* (*Integrative Genomics Viewer, Broad Institute* - <http://www.broadinstitute.org/igv/>) versão 2.3 e *Microsoft Office Excel* (*Microsoft*).

Na primeira análise (SVS), utilizando o *software* SVS, optamos por selecionar apenas variantes com qualidade >15 e cobertura >10, ausentes da listagem de variantes comuns do *dbSNP138*, e presentes em frequência menor que 1% nos projetos *1000 Genomes Phase I Project* e *NHLBI Exome Sequencing Project*, ficando assim somente com

variantes raras. Partindo da lista de variantes obtidas para o grupo tumoral, excluimos todas as variantes presentes com qualquer qualidade ou cobertura no grupo de fígado maduro não-tumoral, resultando nas variantes tidas como somáticas. Por fim, filtramos variantes na sequência codificadora e excluimos as sinônimas.

Na segunda análise (CIPE), filtramos bases com *Phred Score* >15 e variantes que estavam ausentes de todas as amostras normais sequenciadas. Foram mantidas apenas as variantes presentes em sequências codificadoras de genes (exclusão de pseudogenes) ou em sítios de *splicing*, e excluídas aquelas tidas como silenciosas ou sinônimas ou presentes na relação de *dbSNP Common*.

III. 6. Alterações no padrão de metilação de citosinas

Conversão de DNA por tratamento por bissulfito

Para análises de metilação de DNA na maioria das plataformas, o procedimento se inicia com a conversão de DNA genômico por bissulfito, no qual as citosinas não metiladas são convertidas em uracil enquanto citosinas metiladas permanecem sem modificação. Utilizamos o kit “EZ DNA Methylation” (Zymo Research Corp.) segundo as recomendações do fabricante para a conversão de DNA genômico por bissulfito. Realizamos o tratamento para 500ng de DNA para cada tipo de experimento de análise (microarranjo ou pirosequenciamento).

Microarranjo de metilação de DNA

Utilizamos 500ng de DNA convertido para a realização dos experimentos seguintes com o kit “Illumina HD Assay Methylation” (Illumina), seguindo o protocolo padrão para utilização dos arrays *BeadChip* “Infinium HD Assay Methylation Protocol guide”. O DNA genômico convertido passou então por um processo de desnaturação e neutralização, seguido de amplificação isotérmica *overnight*, o que aumenta a quantidade de DNA da

amostra em centenas de vezes. O produto amplificado passa por um processo de fragmentação enzimática, sendo a seguir precipitado e ressuspendido em solução tampão. A solução foi hibridizada com as *BeadChips*, quando se anela covalentemente com sondas específicas de 50mers durante uma incubação *overnight*. Após a hibridação, é realizada lavagem para retirada de fragmentos não anelados, e o *chip* é preparado para que haja a extensão de bases alelo-específicas incorporando nucleotídeos de citosina marcados com biotina. A amplificação da marcação incorporada fornece o sinal identificado por um laser (*Illumina™ iScan System*), que excita fluoróforos a cada base, permitindo a identificação dos sítios metilados no DNA investigado.

A partir da imagem escaneada, a extração de dados foi realizada utilizando o *software Genome Studio Integrated Informatics v.1.9.0 – Methylation module (Illumina)*, que contém ferramentas de bioinformática para normalização, visualização e análise dos dados. Extraímos os dados utilizando o arquivo *descriptor “HumanMethylation450_15017482_v.1.1.bpm”*, que contém as informações referentes a todas as 485.577 sondas.

Realizamos duas diferentes abordagens para a análise dos dados, brevemente descritas a seguir. Em ambas as abordagens, o valor Beta (medida de metilação absoluta por sítio CpG) foi calculado a partir da formula:

$$\beta = \frac{\text{metilado}}{(\text{metilado} + \text{não metilado})}$$

A primeira análise foi realizada no *software Genome Studio (Illumina)*, utilizando a normalização dos dados de acordo com controles internos da lâmina e subtração de *background* (identificado pela intensidade de sinal mensurado em sondas localizadas em regiões onde não há variação de metilação de citosinas) e cálculo de metilação diferencial pela abordagem Mann-Whitney.

Nossa segunda análise envolveu a normalização dos dados pelo método BMIQ (*Beta Mixture Quantile dilation*), que ajusta a distribuição dos dois tipos diferentes de sonda da plataforma (TESCHENDORFF et al., 2013). Os dados normalizados foram, então, submetidos à análise de metilação diferencial do pacote desenvolvido especialmente para utilização nas plataformas de microarranjos de metilação da Illumina: *Illumina Methylation Analyzer (IMA)* (WANG et al., 2012a), utilizando o teste não paramétrico *Wilcoxon rank-sum test* (WILCOXON, 1945) com limiar de *delta-beta* 0,1 e *p*-valor 0,05 pela correção de múltipla testagem *Benjamin-Hochberg* (BENJAMINI e HOCHBERG, 1995). A análise *in silico* de enriquecimento de vias gênicas foi realizada através do *software Ingenuity Pathways Analysis* (IPA - Qiagen), utilizando a ferramenta "*core analysis*", considerando o banco de dados do *software* (*Ingenuity Knowledgebase - genes + endogenous chemicals*).

Pirosequenciamento das regiões LINE-1e genes candidatos

Experimentos de pirosequenciamento foram desenvolvidos utilizando o sistema *PyroMark Q96 System* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante, para: (a) validação técnica de níveis de metilação encontrados pela plataforma 450k para duas regiões (genes *ASCL2* e *SLC16A5*), (b) avaliar os níveis de metilação de regiões LINE-1 utilizando o *kit PyroMark kit cat. 970042* (Qiagen; posição 305–331 - GenBank X58075).

Os níveis de metilação dos sítios CpG para validação técnica dos achados da plataforma 450k foram avaliados utilizando os primers indicados na **Tabela III.3**.

Tabela III.3. Pares de primers utilizados para validação técnica por pirosequenciamento de achados da plataforma 450k

Genes	Sondas validadas da plataforma 450k	Primer forward	Primer reverse (modificado com biotina na extremidade 5')	Primer de sequenciamento
ASCL2	cg21063716	GGTTTGGAGGTTTGTAT	CCAATCTCAATACCCTC	TTTGGAGGTTTGTATT
SLC16A5	cg27619475, cg21306329, cg17733616	GAAGTTAGAAAGAGGGT	AAAACCCACCTTCCAACCT	GGTTGTGTAAATTTTAGATAT

Os níveis de metilação dos sítios CpG nas regiões LINE-1 foram utilizados para estimar o nível de metilação global das regiões repetitivas do genoma. Utilizamos o kit "*PyroMark CpG LINE-1*" (Qiagen), que se baseia na tecnologia de pirosequenciamento em tempo real para quantificar os níveis de metilação de quatro sítios CpG (posições 331 a 305) de elementos LINE-1 (número de acesso *GenBank* X58075).

O procedimento seguiu as recomendações do fabricante, com utilização de 60ng de DNA convertido pelo *kit Zymo*, conforme descritos em seções anteriores. Como controle da amplificação e verificação da eficácia do pirosequenciamento, foram utilizadas amostras de DNA referência com conhecidas porcentagens de metilação, por meio de diluições do *DNA comercial EpiTect PCR control DNA set* (Qiagen), de modo a obter 0%, 25%, 50%, 75% e 100% de metilação.

A amplificação por PCR de um fragmento das regiões de interesse foi realizada utilizando o *kit "PyroMark PCR"* (Qiagen), com 25 µL de "*PyroMark PCR Master Mix*", 5 µL de "*CoralLoad Concentrate*", e 0.4 µM dos *primers forward* e *reverse* (*kit "PyroMark Q96 CpG LINE-1"*). O *primer reverse* é biotinilado e permite o isolamento do molde de DNA correto para a reação de pirosequenciamento. A solução foi mantida por 15 minutos a 95°C para ativação da enzima *HotStarTaq DNA Polymerase*, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, concluindo com uma etapa de extensão final de 10 minutos a 72°C. O sucesso da amplificação foi verificado através de eletroforese em gel de agarose 1%.

O passo seguinte consistiu na imobilização de 45 µL do produto amplificado biotinilado em 1 µL de *beads* de streptavidina e sefarose (GE), com auxílio do tampão *PyroMark Binding Buffer* (Qiagen). As soluções são agitadas a 1400 rpm por 5 minutos, quando seguiram para a etapa de preparo para sequenciamento, onde há desnaturação das fitas de DNA e anelamento do *primer* de sequenciamento (*kit "PyroMark Q96 CpG LINE-1"*). Foram adicionados 0,3 µM de *primer* às soluções, que então, na plataforma "*PyroMark Q96 Vacuum Workstation*" (Qiagen), são absorvidas pela ferramenta de vácuo, onde passam as soluções de etanol 70% para precipitação, solução de desnaturação e solução de lavagem

(ambas Qiagen). As soluções são então liberadas pelo aparato e a placa é aquecida a 80°C por 2 minutos, seguido de resfriamento a temperatura ambiente por 5 minutos. Utilizamos os reagentes (enzima, substrato e nucleotídeos) do *kit "PyroMark Gold Q96 Reagents"* no cartucho "Pyromark Q96 cartridge" (ambos Qiagen) , conforme volumes sugeridos pelo *software PyroMark CpG* versão 1.1.11 (Qiagen).

A corrida foi realizada no equipamento pirosequenciador *PyroMark ID* (Biotage). As análises foram realizadas com auxílio do *software PyroMark CpG 1.0.11 (build 14)*. Realizamos correção dos dados obtidos através da obtenção de regressão linear a partir da dispersão dos dados esperados e obtidos para as amostras referência de grau de metilação previamente conhecido utilizando o *software Microsoft Excel*. As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software GraphPad 6.0.1 (Prism)*, utilizando o método de Mann-Whitney e p -valor < 0,05.

Análise de expressão gênica de candidatos

O RNA total foi enzimaticamente convertido utilizando o *kit High Capacity cDNA RT (Thermo Fisher Scientific)*, e todos os procedimentos seguiram as instruções do fabricante. Foram analisados os perfis de expressão de RNA mensageiro de genes previamente selecionados como candidatos a marcadores epigenéticos em hepatoblastoma (*HOXA3* e *SLC16A5*) utilizando sistema baseado em *SYBR-green (Thermo Fisher Scientific)*. As sequências dos primers foram desenhadas e analisadas utilizando os *softwares Primer3* [39] e *OligoAnalyzer 3.1 (IDT – Integrated DNA Technologies)*. As sequências dos primers estão disponíveis na **Tabela III.4**, a seguir. O gene *ACTB* (beta actina) foi considerado como referência. A expressão relativa dos genes nas amostras foi obtida a partir de análise pelo método quantitativo relativo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [40].

Tabela III.4. Sequências de *primers* para avaliação de expressão gênica de genes diferencialmente metilados

Genes	Sequência Forward	Sequência Reverse
<i>SLC16A5</i>	TCAGCCAGCTCTACTTCACAG	CGCCGAAGACAAGGAAGGT
<i>HOXA3</i>	CACAAAGCAGAAAACCAGCA	ACAGGTAGCGGTTGAAGTGG

Capítulo IV.

Alterações em número de cópias de sequências de DNA

Capítulo IV. Alterações no número de cópias de sequências de DNA

A caracterização citogenética em hepatoblastomas permanece majoritariamente restrita a estudos utilizando técnicas citogenéticas clássicas, como cariótipo, apresentando uma baixa resolução e um poder limitado para o mapeamento de genes relevantes à oncogênese. No artigo a seguir, analisamos o perfil de alterações somáticas de número de cópias de segmentos genômicos (*somatic copy number aberrations* - SCNA) em nove hepatoblastomas provenientes do Banco de Tumores do ACCCC por meio de experimentos de *array*-CGH utilizando uma plataforma com cerca de 180 mil sondas de oligonucleotídeos.

A caracterização citogenética dos hepatoblastomas revelou um padrão marcante de ocorrência de aneuploidias, totais ou de braços inteiros, assim como eventos envolvendo grandes segmentos cromossômicos. Os tumores apresentaram um número reduzido de SCNAs totais focais, o que indica que o hepatoblastoma apresenta instabilidade genômica menor do que a detectada na maioria dos tumores sólidos. Corroborando dados da literatura (ref), eventos de ganho prevalecem sobre eventos de perda em nossa casuística. A identificação de alterações recorrentes foi limitada, possivelmente devido ao número restrito de amostras.

Considerando que SCNAs relevantes à oncogênese provavelmente devem representar vantagens adaptativas (TANG e AMON, 2013), a análise de amplicons, perdas em homozigose e, sobretudo, regiões de alterações recorrentes pode auxiliar na delimitação de segmentos e genes candidatos a marcadores tumorais. Três tumores apresentaram ganhos de tamanhos e amplitude variáveis em 2q, permitindo o delineamento de uma região mínima comum de ~10Mb em 2q24.1-q24.3, segmento este presente em alto número de cópias – amplicon – em um dos tumores (HB-4). Um gene contido na área amplificada em comum do segmento 2q24.1-q24.3, *DAPL1*, foi

escolhido para validação do aumento no número de cópias pelo uso da técnica de PCR quantitativo em tempo real. Os resultados indicaram que o tumor portador do amplicon possuía aproximadamente dez cópias do gene, e confirmaram presença de ao menos quatro cópias em outros dois tumores que exibiram ganhos em regiões maiores sobrepondo esse segmento em 2q24.1-q24.3.

Adicionalmente, selecionamos para validação de ganhos recorrentes em cinco tumores: um amplicon intrônico mapeado na região mínima em comum em 5q31.1. No entanto, detectamos que este segmento genômico também se encontrava amplificado nas amostras de fígado maduro (bordas tumorais). Aprofundamos a investigação da região e, por análises *in silico*, verificamos que toda a sequência alterada apresenta grande homologia (>85%) com outras regiões do genoma, sendo descrita como variante polimórfica em número de cópias nestas outras regiões. Embora tenhamos considerado que este achado genômico de amplicon em 5q31.1 possivelmente não é significativo para a carcinogênese, tratando-se talvez de uma variante de número de cópias populacional (CNP – *copy number polymorphism*), mantivemos o gene que contém a região (*PCBD2*) em nossa análise de expressão gênica.

A região delimitada em 2q24 inclui 48 genes diferentes. Tendo em vista determinar quais genes, dentre aqueles localizados na região de amplicon, poderiam ser bons candidatos a envolvimento no desenvolvimento ou progressão em hepatoblastomas, realizamos um estudo de expressão gênica para identificar aqueles sensíveis à presença da amplificação. A análise de expressão por meio de PCR quantitativo em tempo real revelou cinco genes super-expressos em hepatoblastomas, quando comparados ao tecido de fígado maduro normal: *DAPL1*, *ERMN*, *GALNT5*, *SCN1A* e *SCN3A*.

O gene *DAPL1* (*Death Associated Protein-Like 1*) apresenta funções gênicas interessantes, como o envolvimento em estágios precoces da diferenciação epitelial e apoptose. Já o gene *GALNT5* atua em modificações proteicas pós-traducionais, enquanto os genes *SCN1A* e *SCN3A* estão envolvidos em transporte iônico. O gene

ERMN (*ERM-Like Protein*), além de estar envolvido na regulação da forma e organização de projeção celular, apresenta interações preditas com duas diferentes proteínas: beta-catenina, que é um marcador já classicamente associado o hepatoblastomas, e *c-Jun*, um proto-oncogene mapeado em 1p32-p31, super-expresso/ativado em tumores humanos.

Todos os genes superexpressos em hepatoblastoma apresentaram um padrão de expressão gênica similar (superexpressão) às duas amostras de fígado fetal analisadas, sendo, porém, diferente das amostras de fígado maduro normal. Tal achado está de acordo com o modelo proposto sobre tumores embrionários serem originários de alterações no desenvolvimento normal.

O manuscrito que apresenta estes resultados em maiores detalhes encontra-se *in press* na revista *Future Oncology* (CAPES Qualis A2), e encontra-se integralmente disponível a seguir.

Upregulated genes at 2q24 gains as candidate oncogenes in hepatoblastomas

Tatiane Cristina Rodrigues

rodriguestatiane@gmail.com

Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Felipe Fidalgo

felipe.fidalgo9@gmail.com

International Center for Research, A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

Cecilia Maria Lima da Costa

cecimcosta@uol.com.br

Department of Pediatric Oncology, A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

Elisa Napolitano Ferreira

elisanapolitano@gmail.com

International Center for Research, A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

Isabela Werneck da Cunha

iwernneck0210@gmail.com

Department of Pathology, A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

Dirce Maria Carraro

dirce.carraro@cipe.accamargo.org.br

International Center for Research, A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

Ana Cristina Victorino Krepischi

ana.krepischi@cipe.accamargo.org.br

Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

International Center for Research, A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

Carla Rosenberg

carlarosenberg@uol.com.br

Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Corresponding author

Carla Rosenberg

Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, Rua do Matão 277, 05508-090, São Paulo-SP, Brazil.

E-mail: carlarosenberg@uol.com.br

Phone number: +55(11)3091-7573

ABSTRACT

Aims: Cytogenetic data of hepatoblastomas, a rare embryonal tumor of the liver, mostly consist of descriptions of whole-chromosome aneuploidies and large chromosome alterations. High-resolution cytogenetics may provide clues to hepatoblastoma tumorigenesis and indicate markers with clinical significance.

Methods: We used array-CGH (180K) to screen for genomic imbalances in nine hepatoblastomas. Additionally, we investigated the expression pattern of selected genes exhibiting copy number changes. **Results:** Analysis showed mainly whole-chromosome or chromosome-arm aneuploidies, but some focal aberrations were also mapped. Expression analysis of 48 genes mapped at one 10 Mb amplification at 2q24 revealed up-regulation of *DAPL1*, *ERMN*, *GALNT5*, *SCN1A* and *SCN3A* in the set of tumors compared to differentiated livers. **Conclusions:** These genes appear as candidates for hepatoblastoma tumorigenesis.

Keywords: hepatoblastoma; embryonal tumor; copy number aberration; array-CGH; gene expression; 2q24 amplification

INTRODUCTION

Hepatoblastoma (HB) is an embryonal tumor of the liver and its rate in the United States was estimated as 10.5 and 5.2 cases per million in children <1 and 1–4 years, respectively (HOWLADER et al., 2011). HBs are mainly diagnosed in children under the age of 18 months, although few cases in adults have also been described (ISAACS, Jr., 2007b; NAKAMURA et al., 2010b; ROUGEMONT et al., 2012). The 3-years event-free and overall survival rates are, respectively, higher than 80% and 70%, and relapses occur in less than 12% of patients after chemotherapy (SEMERARO et al., 2013). Although the vast majority of hepatoblastomas is sporadic, its incidence is elevated in certain genetic syndromes with known constitutive genomic alterations,

including Beckwith–Weidemann and Familial Adenomatosis Polyposis (EMRE; UMMAN; e RODRIGUEZ-DAVALOS, 2012b; KINGSTON et al., 1983; MORLAND e GOYET, 2004; SPECTOR e BIRCH, 2012).

It is assumed that adult tumors arise from accumulation of alterations that are acquired over several decades, whereas development of pediatric cancers occur over shorter periods, either because part of the conditions are already present assuming they arises from undifferentiated cells or, alternatively, they carry fewer mutations with higher penetrance (ARMENGOL et al., 2011; DAVENPORT; BLANCO; e SANDLER, 2012b; PAHLMAN et al., 2004b; SCOTTING; WALKER; e PERILONGO, 2005). Hepatoblastoma has the highest reported frequency of *CTNNB1* activating mutations of any cancer (TOMLINSON e KAPPLER, 2012b; UDATSU et al., 2001b). Few other molecular mechanisms engaged in hepatoblastoma oncogenesis are currently known, including overexpression of *IGF2* (GRAY et al., 2000a) and its transcriptional activator *PLAG1* (ZATKOVA et al., 2004), and down-regulation of *RASSF1A* by promoter hypermethylation (SUGAWARA et al., 2007a). Cytogenetic data in hepatoblastomas is limited mainly to reports of description of aneuploidies and copy number changes of large genomic regions, in particular gains of chromosomes 1, 2, 8, 20 ((TOMLINSON, 2012) and literature reviewed in **Table 1**). Gains affecting 8q11.2-q13 and 2q24 have been previously associated with poor prognosis (HU et al., 2000; KUMON et al., 2001b; TOMLINSON, 2012; WEBER et al., 2000; ZATKOVA et al., 2004).

We present here the cytogenetic investigation by array-CGH and target expression profiles of nine hepatoblastomas.

PATIENTS & METHODS

Patients

Samples from nine sporadic hepatoblastomas and eight matched non-tumoral mature livers were provided by the Biobank of the A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil. The present retrospective study was approved by the Local Ethics and

Research Committee (number 768/06) and written informed consent was obtained from all patients' legal guardians. All patients received pre-surgery chemotherapy according to the SIOPEL protocol (<http://www.siope.org/>). Patients were followed by clinical examination, imaging tests and alpha-fetoprotein dosage for a minimum period of 18 months.

DNA and RNA isolation

Frozen tissue samples from hepatoblastomas were obtained from the Biobank of the A. C. Camargo Cancer Center, and sections from tumor tissue blocks stained with hematoxylin and eosin were analyzed for subtype classification. Mature liver samples were resected by macrodissection from the safety margins of the tumors. Genomic DNA was extracted using a phenol:chlorophorm protocol, and total RNA was obtained using RNeasy Mini Kit (Qiagen; Limburg, Netherlands), following manufacturer's instructions. Nanodrop (Thermo Scientific; MA-USA) was used to access purity and DNA integrity was checked by electrophoresis in 0.8% agarose gels. RNA quantity and integrity were assessed by spectrophotometry (NanoDrop, Thermo Scientific; MA-USA) and microfluidics-based electrophoresis (Bioanalyzer, Agilent Technologies; CA, USA); only RNA samples with RIN >5.0 were used for the gene expression analysis. Commercial samples of DNA and cDNA from human fetal liver were obtained at two gestational ages (12 and 18 weeks; Novogenix Labs; CA-USA).

Comparative Genome Hybridization based on microarrays (array-CGH)

We performed comparative genomic hybridization based on microarrays (array-CGH) using a whole-genome customized 180K platform (Oxford Gene Technologies; Oxford, UK) with high coverage on genes previously related to hepatoblastomas, liver development and cancer (list of genes available in the **Supplementary Material S1**). Gender-matched commercial human pools of DNAs (Promega; WI, USA) were used as reference. Scanned images of the microarrays were processed using the software

Feature Extraction version 10.7.3.1 (Agilent Technologies; CA, USA). For the analysis, we applied the Genomic Workbench 6.9 software (Agilent Technologies; CA, USA), using the GC correction and diploid peak for normalization. For calling genomic imbalances, we applied the statistical algorithm ADM-2 with a sensitivity threshold of 6.7, and different $\log_2$ test/reference ratio thresholds for duplication (0.25), high copy number gain (1.2), and deletion (-0.25); only genomic segments encompassing a minimum of 5 consecutive probes and 50Kb, presenting a clear shift in the profile were considered. We excluded copy number variants reported in the Database of Genomic Variants (DGV; <http://projects.tcag.ca/variation/>) as well as aberrations from sexual chromosomes. Gene annotation was performed according to the GRCh37/hg19 using the University of California Santa Cruz Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

Copy number validation by real-time quantitative PCR

In order to validate the copy number status of a region at 2q24, we performed real-time quantitative PCR (Real-time quantitative PCR) of the *DAPL1* gene (primers F:CAGACACTGGATGCCCTG; R:GTCAATCTGCCCAGTGGATCC), using the SYBR Green system (Applied Biosystems; CA, USA) on a 7500 Fast Real-Time PCR System apparatus (Applied Biosystems; CA, USA). We used the same reference DNA (Promega; WI, USA) as control for copy number calibration, and values were normalized based on data from the *GAPDH* (12p13) and *P2RX7* (12q24) genes. All samples were run in triplicates and data were analyzed using the comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ cycle threshold method (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), which assumes that the calibrator DNA has two copies of the control genes; values in the range of 0.8-1.2 indicated normal copy number (2 copies), values < 0.6 were considered losses, and > 1.4 gains.

Gene expression analysis

We investigated the mRNA expression profile of 48 genes encompassed by the minimum common region amplified at 2q24 in the set of nine hepatoblastomas. We used the SYBR-green based customized array RT² qPCR Primer Customized Assay (Qiagen; Limburg, Netherlands). The total RNA was enzymatically converted to cDNA using kit First Strand (Qiagen; Limburg, Netherlands), and procedures followed the manufacturer's protocol. The determination of the most stable reference genes was performed using RefFinder algorithm (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>), that integrates geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002), Normfinder (ANDERSEN; JENSEN; e ORNTTOFT, 2004), BestKeeper (PFAFFL et al., 2004) and the comparative $\Delta\Delta C_t$ method (SILVER et al., 2006). Genes were considered differentially expressed between groups if fold changes were $\geq |4|$ through the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ relative quantitative method, and p-value ≤ 0.05 (t student test) using Prism 6 software (GraphPa; CA, USA). Predictive interactions were analysed by I2D Interologus Interactions Database (<http://ophid.utoronto.ca>).

RESULTS

The clinical features of the cohort are summarized in **Table 2**. Four out of nine hepatoblastomas did not show any alterations. A summary of the chromosome alterations detected in the remaining five tumors can be found in **Table 3**. A total of 15 whole-chromosomal or chromosome arms aneuploidies, and 7 segmental copy number changes were identified. Gain events were more frequent than losses: we detected 13 partial or whole-chromosome gains among 15 aneuploidies, and 5 gains out of 7 segmental copy number aberrations. Three tumors presented gains of variable size at 2q, and one of them harbored a high copy number gain of ~10Mb at 2q24.1-q24.3 (chr2:156868953-166963659, GRCh37; **Figure 1A**). The amplified segment

encompassed 48 genes, one of which (*DAPL1*), was chosen for validation by real-time qPCR of the copy number status of the 2q24 amplicon (**Figure 1B**).

Expression levels of the genes mapped within the 2q24 amplicon were measured using real-time qPCR in all nine HBs. Five genes (*DAPL1*, *ERMN*, *GALNT5*, *SCN1A* and *SCN3A*) were significantly up-regulated in the hepatoblastoma group compared to differentiated livers (**Figure 2**). We also measured the gene expression levels of two fetal liver samples in different stages of development; all five genes also exhibited in fetal liver a pattern of up-regulation compared to differentiated liver. Another 11 genes also showed an up-regulation trend in hepatoblastomas although did not reach significance. No gene in the segment showed down-regulation in hepatoblastomas compared to differentiated livers.

DISCUSSION

The array-CGH analysis revealed only few genomic imbalances in the hepatoblastomas, indicating that these tumors have low chromosomal instability compared to carcinomas, similarly to most pediatric solid tumors. Two tumors exhibited increased instability (HB-1 and HB-9), and it is unclear if this feature is somehow related to their phenotypes. Although there is no obvious correlation between this finding and tumor histology, both patients presented high alpha-feta protein levels. Patient 9 was unusual for presenting a congenital tumor, and patient 1 presented the worst overall survival; however, these findings are not exclusive of these two patients in our cohort. In agreement with previous reports ((TOMLINSON, 2012; TOMLINSON e KAPPLER, 2012b); see review in **Table 1**), we detected recurrent gains of 1q, 2, 8 and 20. Some of these imbalances are also commonly found in embryonal rhabdomyosarcoma and other pediatric tumors related to Beckwith-Wiedemann syndrome (STEENMAN et al., 1999). Comparing chromosomal imbalances of HBs with

those detected in hepatocellular carcinomas, gains on chromosome 2 seem to be more frequent (WEBER et al., 2000).

Most reported chromosome aberrations in HB comprised either whole chromosomes or large segments, hampering the identification of driver genes. Earlier studies have related gains at 2q24 to poor prognosis (ARAI et al., 2010; HU et al., 2000; KUMON et al., 2001b), and we identified a ~10 Mb high amplification at 2q24.1-q24.3 in the tumor from a patient who exhibited an overall survival of at least 9 years (HB-4). This amplicon includes a 2q24 region of gain detected in a HB case reported by Arai *et al* (ARAI et al., 2010). The ~10 Mb segment amplified in HB-4 harbored 48 genes. Genes driving oncogenesis through copy number aberrations may be biased towards deregulation. Aiming to determine which genes at 2q24 exhibiting high copy number gain could be crucial for HB development or progression, we investigated their expression and identified five genes up-regulated in the HB group, namely *DAPL1*, *ERMN*, *GALNT5*, *SCN1A* and *SCN3A*. *DAPL1* (Death Associated Protein-Like 1) presumptively plays a role in the early stages of epithelial differentiation and apoptosis, although its mechanism of action is not known; *GALNT5* possibly acts in post-translational protein modification, whereas *SCN1A* and *SCN3A* are involved in ion transport (Genecards - <http://www.genecards.org/>). Interestingly, *ERMN* (ERM-Like Protein), in addition to be related to regulation of cell shape and cell projection organization, is predicted by I2D database (Interologous Interaction Database - <http://ophid.utoronto.ca/ophidv2.204/>) to interact with two different proteins: beta-catenin, a well-known hepatoblastoma marker (CAIRO et al., 2008), and c-Jun, a proto-oncogene mapped at 1p32-p31, over-expressed/activated in human tumors (HATTORI et al., 1988). Among those five genes, *DAPL1* and *ERMN*, because of their predicted function, stand out as candidates to drive oncogenesis in HBs.

Findings here presented were limited by the size of the cohort and the fact that both DNA copy number and gene expression data were obtained from HB samples

after chemotherapy. Further studies are required to determine the relevance of these results.

CONCLUSIONS

We provided the genomic imbalances profiles of nine hepatoblastomas, finding mainly whole-chromosomes or chromosome arms alterations. Expression analyses in the 9 HBs of 48 genes encompassed by a high amplitude amplification at 2q24 highlighted five genes presenting up-regulated expression, resembling the expression pattern observed in fetal livers. Among those upregulated genes one was related to the Wnt pathway (*ERMN*) and another to epithelial differentiation (*DAPL1*).

FUTURE PERSPECTIVES

Further studies approaching copy number and DNA/RNA sequencing by Next Generation should provide a broader overview of the genetic events underlying the occurrence of HBs.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Biobank from the A.C. Camargo Cancer Center (São Paulo, Brazil) for providing tumor samples, and the patients and their families for their precious collaboration. The present study was supported by FAPESP grants 2011/24007-9, 2009/00898-1, 2013/08028-1 and 2006/00054-0.

FINANCIAL & COMPETING INTERESTS DISCLOSURE

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or

pending, or royalties. No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

ETHICAL CONDUCT OF RESEARCH

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval and have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, informed consent has been obtained from the participants involved.

SUMMARY POINTS

BACKGROUND

- Hepatoblastoma is a rare embryonal tumor of the liver, and only a few molecular mechanisms engaged in its oncogenesis are currently known.
- Cytogenetic alterations of hepatoblastomas mostly consist of whole-chromosome aneuploidies and large chromosome alterations. Array-CGH may indicate genes or chromosome regions relevant to hepatoblastoma tumorigenesis.

PATIENTS AND METHODS

- We performed 180 K array-CGH investigation by array-CGH and target expression analyses of 48 genes in a group of nine hepatoblastomas

RESULTS

- Array-CGH analysis revealed few genomic imbalances hepatoblastomas, such as recurrent gains of 1q, 2, 8 and 20.
- Expression analyses of genes mapped within a 10Mb high amplification at 2q24.1-q24.3 to a ~10Mb minimum identified five up-regulated genes, namely *DAPL1*, *ERMN*, *GALNT5*, *SCN1A* and *SCN3A*.

DISCUSSION

- The five genes found to be up-regulated in HBs presented similar expression that fetal liver samples, suggesting that hepatoblastomas resemble undifferentiated liver.

CONCLUSIONS

- Two upregulated genes, one was related to the Wnt pathway (*ERMN*) and another to epithelial differentiation (*DAPL1*), appear as candidates for the tumorigenesis of HBs

TABLES

Table 1. Literature review and description of chromosomal regions frequently involved in numerical aberrations in hepatoblastomas.

Number of tumors	Technique / Platform	Gains	Amplicons	Losses	Reference
1	Karyotype	2	-	-	(BARDI et al., 1992)
1	Karyotype	2p25-q31, 8, 12, 17, 20	-	18	(SWARTS; WISECARVER ; e BRIDGE, 1996a)
4	Karyotype	1, 2, 5, 6, 7, 8, 13, 19, 20, 21	-	8	(SCHNEIDER et al., 1997)
1	Karyotype	1, 2, 4, 7, 8, 8q10, 14, 14q24, 16, 19, 20, 21, 22	-	1q12, 3q12, 13, 15, 17, 19	(PARADA et al., 1997)
9	Karyotype	1, 2, 6, 7, 8, 12q, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22	-	4, 12, 15	(SAINATI et al., 1998)
1	Karyotype, FISH	2q21-qter, 4q35, 20	-	9	(BALOGH et al., 1998)
16	CGH	1p, 2p, 2q, 3p21, 4q, 5q13, 7p, 8q, 10, 17, 20,	-	10p, 15q26, Xq26-qter	(STEENMAN et al., 1999)
1	Karyotype	2, 3, 20, Y	-	-	(YEH et al., 2000b)
7	Karyotype, FISH	1q12, 1q21, 2, 5, 7, 8, 10, 12, 16, 20	-	2q11-q23, 3, 7q11.2, 9q22, 12, 14, 18	(PARADA et al., 2000)
18	CGH	1q24-q25, 2q23-q24, 4, 9q32-qter, 17q22-qter, 19, 20q	-	2p13-pter, 2q22, 3q23-q25, 4q21-qter, 8p, 9q22-pter, 11q14-qter, 13q21-q22, 14, 15q, 18q	(GRAY et al., 2000b)
2	Karyotype	2, 3, 4, 5q31, 6, 7, 8, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, X	-	-	(ANDERSON et al., 2000b)
34	CGH	1q, 2p, 2q, 7q, 8p, 8q, 12p, 12q, 17, 20, 22q	2q24, 8q11.2-q13, 8q11.2-q21.3, 10q24-q26	1p, 4p, 4q, 10, 16q, 18q	(WEBER et al., 2000)
10	CGH	1q, 2, 2q14-q21, 2q24, 3, 6, 8q22-qter, 9q, 12, 16p, 17, 17pter-q21, 17q21-qter, 20	2q22-34	1, 4, 8p21-22, 11, 18	(HU et al., 2000)

Capítulo IV. Alterações em número de cópias de sequências de DNA

Number of tumors	Technique / Platform	Gains	Amplicons	Losses	Reference
1	Karyotype	-	-	3q11.2-q13.2	(SANDOVAL et al., 2002)
2	Karyotype	2q23-q36, 20	-	1q32	(ALI et al., 2002)
10	FISH	2, 8, 20	-	-	(SURACE et al., 2002)
35	CGH	1p32-pter, 2q, 3p, 4q, 5q, 6q, 8q, 20q, X	-	1p, 1q32-qter, 4q, 10, 11p, 14q, 17p11-pter	(TERRACCIANO et al., 2003)
2	Karyotype	1, 2, 4q35, 5, 6, 7, 8, 12, 18, 19, 20, 22	-	1p22, 12p12	(NAGATA et al., 2005)
111	Karyotype	2, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 22	-	4, 18, 21	(TOMLINSON et al., 2005)
17	SNP-array	1q, 2(2q), 8, 17q, 20	7q34, 11q22.2, 14q11.2	4q, 11q	(SUZUKI et al., 2008)
24	1 Mb Array-CGH	1q, 2q, 6p, 8q, 20	-	1p, 4q	(CAIRO et al., 2008)
9	Karyotype, FISH and 1 Mb Array-CGH	1, 1q10, 1q44, 2, 2q37, 5, 6q27, 7, 8, 8q10, 10q23-q26, 17, 20, 22	-	-	(STEJSKALOVA et al., 2009b)
15	Microsatellite markers	-	-	1q44, 4q21-22, 13q14, 17p13, and 17q11.2	(TERADA et al., 2009)
56	SNP-array	1q, 2q (2q24.2-24.3), 6p, 8q, 17q, 20	1q32.1	1p, 4q (4q32.3, 4q34.3-q35.2), 16q	(ARAI et al., 2010)

Table 2. Clinical features of the nine patients with hepatoblastomas.

ID	Age at diagnosis	Gender	Histology	Alfa-feto protein dosage (at diagnosis)	SIOPEL treatment	Risk evaluation	Recidive	Metastasis	Overall survival
HB-1	18 months	F	Embryonal	5,668	N/A	N/A	-	-	1 year
HB-2	10 months	M	Fetal	N/A	3	High	-	-	> 11 years
HB-3	36 months	F	Fetal	>400	3	N/A	-	-	> 10 years
HB-4	9 months	M	Embryonal	>200	3	Standard	-	-	> 9 years
HB-5	240 months	M	Embryonal	N/A	4	High	yes	-	1 year
HB-6	66 months	M	Mixed fetal /embryonal	>1,000	4	High	N/A	yes (lung)	N/A
HB-7	24 months	M	Fetal	742	N/A	Standard	-	-	> 5 years
HB-8	36 months	F	Embryonal	9,328	4	High	-	yes (lung)	> 5 years
HB-9	3 months	F	Fetal	8,399	3	N/A	-	-	> 2 years

F: female; M: male; N/A: not available; -: not present.

Table 3. Summary of the copy number chromosomal aberrations detected in the nine hepatoblastomas.

Tumor	Whole chromosomes or chromosome arms aneuploidies		Copy number aberrations (genomic coordinates)		
	Gain	Loss	Gain	High gain	Loss
HB1	6, 8, 9, 13, 17, 20	-	1p36.33-p36.32, 2q11.1-q36.1	-	-
HB4	-	-	-	2q24.1-24.3	2q24.3
HB6	-	15, 18	-	-	-
HB7	-	-	19q13.42	-	-
HB9	1q, 2, 7p, 12, 14, 19, 20p	-	7q11.23-q21.13	-	1p36.33-p36.31

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Recurrent 2q24 gains in three hepatoblastomas. (A) Array-CGH profiles of chromosome 2 (ideogram at left); depicting gains of different sizes in three hepatoblastomas, with a minimum common region of 10 Mb at 2q24 (HB-4 -red bar). **(B)** Bar graph showing real-time qPCR data from the *DAPL1* gene (error bars indicate the standard deviation of three replicates) in two hepatoblastomas. Copy number status of *DAPL1* validated the 2q24 gains identified by array-CGH; and indicated the presence of at least 8 *DAPL1* copies in HB-4.

Figure 2. Relative gene expression of five genes detected as significantly up-regulated in hepatoblastomas. Y axis: $\log_2$ relative gene expression; X axis: each column represents one group of samples (mature liver, hepatoblastoma and fetal liver), each point represents one sample. The (*) represent a significant p-value, detailed in the plot.

Capítulo V.

Mutações somáticas em regiões codificadoras do genoma

Capítulo V. Mutações somáticas em regiões codificadoras do genoma

No presente estudo, descrevemos os resultados preliminares do sequenciamento dos exomas de seis hepatoblastomas, tomando como referência amostras não tumorais (bordas de fígado não-tumoral pareadas e, em um caso, amostra de sangue periférico). Esta coorte inclui dois casos de hepatoblastomas atípicos: um de ocorrência congênita e um detectado em adulto (paciente de 20 anos).

O sequenciamento de exoma do grupo resultou em um total de 53,43 gigabases de sequências com leitura e alinhamento de alta qualidade, com uma média de 4,45 Gigabases por amostra. Mais de 95% das bases sequenciadas apresentaram *Phred score* acima de 20, demonstrando alta qualidade. Uma cobertura média de 42,6x por amostra foi alcançada, com 78,5% do alvo coberto ao menos 20x. Mais detalhes dos parâmetros de qualidade do alinhamento estão disponíveis na **Tabela V.1**.

Tabela V.1. Parâmetros de qualidade de alinhamento das 12 amostras sequenciadas.

	HB-2	FIG-2	HB-3	FIG-3	HB-4	FIG-4	HB-5	LP-5	HB-8	FIG-8	HB-9	FIG-9
Tamanho estimado da biblioteca (excluindo duplicatas)	333,759,903	343,445,295	344,845,142	423,191,800	291,700,147	230,850,858	328,888,106	232,180,851	354,640,161	354,627,645	264,917,361	307,516,545
% de reads alinhados	99.02%	98.90%	99.09%	98.91%	99.00%	98.92%	99.12%	99.04%	97.84%	94.73%	98.52%	95.81%
% de bases alinhadas com alta qualidade (>=Q20)	95.82%	95.77%	95.85%	95.63%	95.01%	95.12%	96.02%	94.86%	94.43%	94.55%	95.20%	94.57%
% de duplicação	3.67%	3.00%	3.58%	2.84%	3.53%	4.69%	4.14%	4.97%	2.66%	4.05%	5.51%	3.99%
Número de reads pareados	23,638,560	19,859,929	23,850,047	23,095,121	19,984,192	20,975,381	26,264,198	22,445,588	17,277,856	23,893,357	27,864,059	21,671,449
Tamanho médio dos insertos	181	176	179	181	184	177	182	189	184	176	190	179
% de bases alvo com cobertura de 20x	86.78%	81.97%	87.41%	85.97%	82.15%	83.17%	88.54%	85.56%	69.46%	55.61%	76.56%	59.23%
% de reads alinhados em pares	99.80%	99.80%	99.82%	99.77%	99.81%	99.79%	99.78%	99.85%	99.27%	97.89%	99.56%	98.47%
% de quimeras	0.56%	0.37%	0.63%	0.44%	0.28%	0.20%	0.30%	0.19%	2.05%	2.78%	0.64%	2.05%
Número total de reads examinado	49,942,520	41,637,338	50,338,292	48,386,002	42,044,956	44,670,756	60,536,678	47,856,654	37,343,058	55,215,216	55,550,218	48,873,646
Cobertura média	42.53	43.18	42.99	41.98	42.53	42.78	42.83	42.17	41.82	43.44	42.24	43.14

Na primeira vertente da análise (SVS) encontramos 42 variantes, uma média de 7 mutações somáticas por tumor (variando entre 0 e 33 variantes por tumor). A segunda metodologia de análise (CIPE) foi menos estridente, revelando 59 variantes, uma média de 9,8 por tumor. Entre as duas análises houve uma sobreposição de 25 variantes. Em suma, foram relatadas 76 diferentes variantes em hepatoblastomas.

Nossos achados refletem uma baixa frequência de mutações somáticas em hepatoblastomas, em conformidade com estudos anteriores (FUJITA et al., 2014; JIA et al., 2014; KOSAKI et al., 2014). Estes resultados estão de acordo com a ideia de que os tumores embrionários não requerem tantas alterações genéticas em sua tumorigênese quanto tumores adultos típicos (VOGELSTEIN et al., 2013a).

Mutações no gene *CTNNB1* têm sido reportadas em 50-90% dos hepatoblastomas (CAIRO; ARMENGOL; e BUENDIA, 2012; KOCH et al., 1999; UDATSU et al., 2001b). Em nossa análise detectamos no éxon 3 do gene da beta-catenina do tumor HB-4 uma mutação não-sinônima nunca antes descrita em hepatoblastomas. Essa mutação (variante rs121913412) consiste em substituição de A/G (proporção 48/35) e resulta na substituição de uma treonina por uma alanina. O algoritmo PROVEAN prediz a mutação como deletéria, e SIFT descreve a variante como danosa. Assim, acreditamos que esta nova mutação provavelmente contribui para o fenótipo do hepatoblastoma.

A lista completa das variantes, incluindo detalhamento de qual análise a originou e em que amostra tumoral está presente encontra-se na **Tabela V.2**.

Tabela V.2. Lista das variantes encontradas pelas analyses de sequenciamento de exoma.

Análise	chr	Posição	Gene	Refseq	exon-refseq	Ref	Var	Amostra tumoral
ambas	1	35900602	<i>KIAA0319L</i>	NM_024874.4	21	T	TA	HB-9
ambas	1	36759520	<i>THRAP3</i>	NM_005119.3	8	G	T	HB-9
ambas	2	28248226	<i>BRE</i>	NM_004899.4	5	T	C	HB-8
ambas	2	208420441	<i>CREB1</i>	NM_134442.3	2	C	G	HB-9
ambas	2	212566704	<i>ERBB4</i>	NM_005235.2	12	C	T	HB-9
ambas	3	133377883	<i>TOPBP1</i>	NM_007027.3	3	C	T	HB-8
ambas	3	41266124	<i>CTNNB1</i>	NM_001098210.1	3	A	G	HB-4
ambas	5	169291341	<i>DOCK2</i>	NM_001129891.1, NM_004946.2	27,4	G	A	HB-9
ambas	6	165957009	<i>PDE10A</i>	NM_001130690.2	2	C	G	HB-9
ambas	7	55270270	<i>EGFR</i>	NM_005228.3	27	G	T	HB-9
ambas	7	55270271	<i>EGFR</i>	NM_005228.3	27	G	T	HB-9
ambas	8	28837586	<i>HMBOX1</i>	NM_024567.3	4,5	A	G	HB-3, HB-9
ambas	8	38693776	<i>TACC1</i>	NM_006283.2	7	A	T	HB-9
ambas	9	108145590	<i>SLC44A1</i>	NM_080546.4	14	T	A	HB-3, HB-9
ambas	11	121058633	<i>TECTA</i>	NM_005422.2	20	G	A	HB-9
ambas	12	81110919	<i>MYF5</i>	NM_005593.2	1	G	T	HB-9
ambas	12	94649010	<i>PLXNC1</i>	NM_005761.2	17	A	T	HB-9
ambas	15	89659728	<i>ABHD2</i>	NM_152924.4	3	A	T	HB-9
ambas	15	83358196	<i>AP3B2</i>	NR_046096.1, NM_001278512.1	3,2	G	T	HB-3, HB-9
ambas	16	57416454	<i>CX3CL1</i>	NM_002996.3	3	C	G	HB-2, HB-8, HB-9
ambas	20	20349503	<i>INSM1</i>	NM_002196.2	1	C	T	HB-9

Análise	chr	Posição	Gene	Refseq	exon-refseq	Ref	Var	Amostra tumoral
ambas	20	31421668	<i>MAPRE1</i>	NM_012325.2	3,3	A	T	HB-9
ambas	22	30681819	<i>GATSL3</i>	NM_001037666.2	8,8	A	C	HB-3, HB-8
ambas	22	32215040	<i>DEPDC5</i>	NM_001242896.1	22	C	T	HB-9
ambas	X	109694753	<i>RGAG1</i>	NM_020769.2	3	A	T	HB-3, HB-9
SVS	1	92187701	<i>TGFBR3</i>	NM_001195683.1		C	A	HB-8
SVS	3	38648234	<i>SCN5A</i>	NM_001099404.1	9	C	A	HB-4, HB-5
SVS	4	71471945	<i>AMBN</i>	NM_016519.5	13	G	T	HB-9
SVS	5	428016	<i>AHRR</i>	NM_020731.4	9	G	C	HB-5, HB-9
SVS	6	74073321	<i>KHDC3L</i>	NM_001017361.2	3	C	A	HB-9
SVS	7	4185507	<i>SDK1</i>	NM_152744.3	29	G	A	HB-9
SVS	7	129832651	<i>TMEM209</i>	XM_005250656.1		-	T	HB-3, HB-8
SVS	11	10648030	<i>MRVI1</i>	NM_130385.3	9	T	C	HB-9
SVS	14	103410303	<i>CDC42BPB</i>	NM_006035.3	30	C	T	HB-9
SVS	14	103410304	<i>CDC42BPB</i>	NM_006035.3	30	C	A	HB-9
SVS	15	63972908	<i>HERC1</i>	XM_005254743.1		T	C	HB-8
SVS	16	17202722	<i>XYLT1</i>	NM_022166.3	12	C	T	HB-9
SVS	16	78064518	<i>CLEC3A</i>	NM_005752.4	3	T	C	HB-4, HB-9
SVS	17	10443364	<i>MYH2</i>	NM_001100112.1		C	A	HB-9
SVS	17	42807304	<i>DBF4B</i>	NM_145663.2	4	G	T	HB-9
SVS	18	32833844	<i>ZSCAN30</i>	XM_005258185.1		C	G	HB-8
SVS	X	12734213	<i>FRMPD4</i>	NM_014728.3	15	C	A	HB-8, HB-9
CIPE	1	201180140	<i>IGFN1</i>	NM_001164586.1	12	C	T	HB-5, HB-8
CIPE	1	215914826	<i>USH2A</i>	NM_206933.2	60	T	C	HB-8
CIPE	1	161187850	<i>FCER1G</i>	NM_004106.1	2	C	T	HB-2

Análise	chr	Posição	Gene	Refseq	exon-refseq	Ref	Var	Amostra tumoral
CIPE	2	119739738	MARCO	NM_006770.3	11	C	A	HB-9
CIPE	2	88427520	FABP1	NM_001443.2	1	T	A	HB-9
CIPE	2	27424305	SLC5A6	NM_021095.2	15	G	A	HB-4
CIPE	3	41266104	CTNNB1	NM_001098210.1	3	G	A	HB-2
CIPE	5	140732126	PCDHGA3	NM_018912.2, NM_018916.3, NM_018915.3, NM_018922.2	1,1,1,1	A	T	HB-9
CIPE	5	135390554	TGFBI	NM_000358.2	10,10	A	T	HB-9
CIPE	6	160241506	PNLDC1	NM_001271862.1	19	C	A	HB-9
CIPE	7	33397476	BBS9	NM_198428.2	16	G	A	HB-2, HB-9
CIPE	9	140249195	EXD3	NM_017820.3	9	C	T	HB-3
CIPE	9	27524364	IFNK	NM_024761.4, NM_020124.2	1,1	G	GTGTT	HB-8
CIPE	9	96439033	PHF2	NM_005392.3	21	G	C	HB-8
CIPE	9	105405479	LINC00587	NR_103830.1	4	T	G	HB-8
Análise	chr	Posição	Gene	Refseq	exon-refseq	Ref	Var	Amostra tumoral
CIPE	9	33466636	NOL6	NM_022917.4	16	C	T	HB-9
CIPE	10	71332787	NEUROG3	NM_020999.3	2	G	T	HB-9
CIPE	11	637361	DRD4	NM_000797.3	1	CGCGGG GGCATC T	C	HB-4
CIPE	12	9013753	A2ML1	NM_144670.4	28	T	A	HB-9
CIPE	12	51737568	CELA1	NM_001971.5	3	A	T	HB-9
CIPE	12	74686404	LOC100507377	NR_038300.1	1	A	G	HB-9

Análise	chr	Posição	Gene	Refseq	exon-refseq	Ref	Var	Amostra tumoral
CIPE	12	74686396	<i>LOC100507377</i>	NR_038300.1	1	C	A	HB-9
CIPE	15	20740231	<i>GOLGA6L6</i>	NM_001145004.1	8	T	C	HB-2, HB-4
CIPE	16	75256702	<i>CTRB1</i>	NM_001906.4	2	G	C	HB-9
CIPE	17	4904144	<i>KIF1C</i>	NM_006612.5	4,4	G	T	HB-2, HB-9
CIPE	17	39346592	<i>KRTAP9-1</i>	NM_001190460.1	1	ACCT	A	HB-8
CIPE	18	33724901	<i>ELP2</i>	NM_001242875.1	9,10	G	T	HB-9
CIPE	18	32833554	<i>ZSCAN30</i>	NM_001112734.2	4	A	C	HB-8
CIPE	18	32833866	<i>ZSCAN30</i>	NM_001112734.2	4	C	T	HB-8
CIPE	20	126161	<i>DEFB126</i>	NM_030931.3	2	A	G	HB-9
CIPE	20	126160	<i>DEFB126</i>	NM_030931.3	2	C	G	HB-9
CIPE	22	19960467	<i>ARVCF</i>	NM_001670.2	15	C	T	HB-9
CIPE	X	139865933	<i>CDR1</i>	NM_004065.2	1	T	C	HB-8
CIPE	X	3238150	<i>MXRA5</i>	NM_015419.3	5	G	T	HB-9

É notável o acentuado aumento de variações encontradas no tumor HB-9, que provavelmente são resultado de um viés na construção das bibliotecas. Os parâmetros e cobertura encontrados para as amostras não-tumorais FIG-8 e, especialmente, FIG-9 são visualmente menos homogêneos quando comparados aos dados obtidos para as demais amostras, tendo uma pior cobertura de algumas regiões alvo e, conseqüentemente, induzindo a uma frequência superior de achados falso positivo, isto é, variantes presentes no tumor e não identificadas no tecido correspondente normal.

A abordagem adotada pelo estudo apresenta limitações quanto à detecção de mutações genéticas. Entre outros fatores, o sequenciamento teve como alvo apenas regiões codificadoras do genoma, excluindo a possibilidade de detecção de variantes relacionadas a sequências não-codificadoras que podem ter envolvimento na tumorigênese. Além disso, as amostras de nossa casuística podem não ser representativas da variedade encontrada no tipo tumoral, assim como a cobertura de aproximadamente 50x pode não ser a mais apropriada para tecidos com mosaicismo genético. Por fim, nossa escolha envolveu análise apenas de variantes somáticas, o que exclui a investigação de variantes já presentes na borda hepática histologicamente classificada como normal e plausível de conter variantes germinativas de predisposição tumoral, assim como aquelas relacionadas à fase de iniciação da tumorigênese.

Os genes identificados como mutados nesse estudo e considerados como potencialmente mais interessantes, assim como genes previamente relacionados a hepatoblastoma em estudos anteriores do nosso e de outros grupos, foram selecionados para fazer parte de um painel customizado de genes a serem sequenciados em todos os 19 tumores, e constituem projeto de mestrado que está iniciando. Serão sequenciadas as regiões codificadoras dos genes revelados pelos seguintes estudos: estudos prévios de sequenciamento de exoma em hepatoblastoma (EICHENMULLER et al., 2014; FUJITA et al., 2014; JIA et al., 2014; KOSAKI et al., 2014), estudo de caracterização de alterações em número de cópias do nosso grupo (RODRIGUES, T.C. et al., In press 2014), análise do perfil global de metilação de DNA de nosso grupo (Rodrigues et al., em preparação – ver Capítulo

VI), genes relacionados à maquinaria epigenética – especificamente modificação de DNA (PLASS et al., 2013) e genes consensualmente relacionados ao hepatoblastoma pela literatura.

A listagem dos genes selecionados para, conjuntamente com as variantes derivadas das análises de exoma, validação por sequenciamento alvo posterior está disponível na **Tabela V.3**, a seguir.

Table V.3. Lista completa dos genes relacionados a hepatoblastoma por estudos anteriores e selecionados para a próxima etapa de sequenciamento alvo de regiões codificadoras de genes. Na primeira coluna temos a descrição da fonte originária dos genes: artigos de exoma em hepatoblastomas (EICHENMULLER et al., 2014;FUJITA et al., 2014;JIA et al., 2014;KOSAKI et al., 2014)); genes da maquinaria epigenética, genes relacionados a alterações em número de cópias (RODRIGUES,T.C. et al., In press 2014); genes relacionados a metilação diferencial de DNA (Rodrigues, TC. Em preparação – Capítulo VI); e, por fim, genes consenso relacionados ao tumor pela literatura.

Fonte	Chr	Gene
Literatura exoma	12	CAPRIN2
Literatura exoma	17	SPOP
Literatura exoma	11	OR5L1
Literatura exoma	5	CDC20B
Literatura exoma	2	NFE2L2
Literatura exoma	5	TERT
Literatura exoma	5	RAD17
Literatura exoma	17	TP53
Literatura exoma	X	GPC3
Literatura exoma	X	WTX
Maquinaria epigenética	19	DNMT1
Maquinaria epigenética	12	AICDA
Maquinaria epigenética	14	ALKBH1
Maquinaria epigenética	11	ALKBH3
Maquinaria epigenética	12	APOBEC1
Maquinaria epigenética	16	FTO
Maquinaria epigenética	12	TDG
Maquinaria epigenética	10	TET1

Maquinaria epigenética	4	<i>TET2</i>
Maquinaria epigenética	2	<i>TET3</i>
Maquinaria epigenética	2	<i>IDH1</i>
Maquinaria epigenética	15	<i>IDH2</i>
Maquinaria epigenética	10	<i>MGMT</i>
Maquinaria epigenética	18	<i>MBD1</i>
Maquinaria epigenética	19	<i>MBD3</i>
Maquinaria epigenética	3	<i>MBD4</i>
Maquinaria epigenética	X	<i>MECP2</i>
Maquinaria epigenética	20	<i>PCNA</i>
Maquinaria epigenética	19	<i>UHRF1</i>
Rodrigues TC et al., in press.	2	<i>DAPL1</i>
Rodrigues TC et al., in press.	2	<i>ERMN</i>
Rodrigues TC et al., in press.	2	<i>GALNT5</i>
Rodrigues TC et al., in press.	2	<i>SCN1A</i>
Rodrigues TC et al., in press.	2	<i>SCN3A</i>
Rodrigues TC et al., em preparação.	11	<i>ASCL2</i>
Rodrigues TC et al., em preparação.	1	<i>FGR</i>
Rodrigues TC et al., em preparação.	7	<i>HOXA3</i>
Rodrigues TC et al., em preparação.	4	<i>MSX1</i>
Rodrigues TC et al., em preparação.	17	<i>FSCN2</i>
Rodrigues TC et al., em preparação.	17	<i>SLC16A5</i>
Rodrigues TC et al., em preparação.	5	<i>ALC6A19</i>
Rodrigues TC et al., em preparação.	12	<i>TSPAN9</i>
Literatura	4	<i>AFP</i>
Literatura	5	<i>APC</i>
Literatura	7	<i>MET</i>
Literatura	8	<i>MYC</i>
Literatura	7	<i>SHH</i>
Literatura	17	<i>BRCA1</i>
Literatura	16	<i>AXIN1</i>

Em conclusão, no presente estudo descrevemos os resultados preliminares das análises de sequenciamento de exoma em 6 hepatoblastomas, identificando um número pequeno de variantes somáticas quando comparado à magnitude vislumbrada em tumores adultos. Os achados serão melhor caracterizados através de sequenciamento alvo da região codificadora dos genes que apresentaram variantes, juntamente com outros genes previamente associados a este tipo tumoral.

Capítulo VI.

Alterações no padrão de metilação de citosinas

Capítulo VI. Alterações no padrão de metilação de citosinas

Este é o primeiro estudo envolvendo análises globais de metilação de citosinas em hepatoblastomas. No artigo a seguir, analisamos o perfil de alterações no padrão de metilação de DNA em dezenove hepatoblastomas, provenientes tanto do Banco de Tumores do *AC Camargo Cancer Center* quanto do Grupo de Apoio ao Adolescente e Criança com câncer (GRAACC). As amostras foram divididas em dois grupos de réplicas biológicas, de acordo com a instituição de origem. Como controle, utilizamos dez amostras de fígado maduro, consistindo em bordas hepáticas normais extraídas durante a cirurgia de excisão tumoral. Comparamos também os resultados de hepatoblastoma com o perfil de metilação de duas amostras de fígado em diferentes estágios embrionários de desenvolvimento (1º e 2º trimestres).

Avaliamos o padrão global de metilação de citosinas utilizando uma plataforma de microarranjos enriquecida para sequência codificadoras e (*BeadArray Infinium 450k - Illumina*) e complementamos através da técnica de pirosequenciamento com a análise de sequências não-codificadoras repetitivas, especificamente sequências *Long interspread nuclear element-1* (LINE-1 ou L1), que compreendem aproximadamente 17% do genoma humano (BECK et al., 2010).

O achado mais marcante em nossas análises foi a ocorrência de hipometilação global das sequências dispostas na plataforma 450k (DNA não repetitivo) em hepatoblastomas quando comparado a fígado diferenciado. Já os níveis globais de metilação de DNA encontrados nas amostras de fígado fetal são ainda mais baixos que os encontrados nas amostras tumorais. Assim, a metilação de citosinas em hepatoblastomas apresenta um perfil intermediário ao observado em fígados diferenciados e em fígados fetais, como ilustrado na Figura 1 do artigo a seguir, sendo compatível com o modelo de

tumorigênese embrionária, no qual o tumor recapitularia alguns padrões moleculares encontrados nos tecidos fetais.

A avaliação do grau de metilação das sequências LINE-1 é um indicador do status de metilação global de DNA repetitivo do tumor (BABA et al., 2010). Um menor nível de metilação (hipometilação) de LINE-1 é comum entre tumores, particularmente nos mais avançados, sendo utilizado como marcador de estadiamento e prognóstico (KITKUMTHORN e MUTIRANGURA, 2011). Em nosso estudo, não detectamos diferença significativa nos padrões de metilação de LINE-1 entre hepatoblastomas e fígado diferenciado, achado que está de acordo com outro estudo recente em hepatoblastomas (RUMBAJAN et al., 2013). Portanto, nossos dados evidenciam um padrão de hipometilação global de sequências não repetitivas em hepatoblastoma

Dentro do grupo de CpGs consideradas como diferencialmente metiladas em hepatoblastomas, podemos ressaltar a presença de metilação aberrante em promotores de genes previamente relacionados a este tumor, como *RASSF1*, *MT1G* e *IGF2*. Também destacamos dez regiões diferencialmente metiladas contendo genes possivelmente relevantes para a origem ou progressão de hepatoblastomas. As regiões envolvem onze genes (*ACSL*, *C22orf26*, *LOC150381*, *FGR*, *FLJ39609*, *FSCN2*, *HOXA3*, *MSX1*, *SLC16A5*, *SLC6A19* e *TSPAN9*), alguns já previamente relacionados com processos de desenvolvimento ou processos oncogênicos. Duas dessas regiões foram validadas quanto ao nível de metilação através de pirosequenciamento e, adicionalmente, avaliamos também os níveis de expressão de dois genes a fim de estudar os efeitos da metilação diferencial nos níveis de transcrição dos candidatos.

O manuscrito a seguir apresenta e discute esses resultados e está atualmente em processo de submissão.

Hepatoblastomas show unusual global DNA hypomethylation pattern

Tatiane Cristina Rodrigues¹, Erica Sara Souza Araujo², André Yoshiaki Kashiwaba³, Henrique Cursino Vieira⁴, Cecília Maria Lima da Costa⁵, Isabela Werneck da Cunha⁶, Claudia Regina Gasque Schoof¹, Luciana Vasquez¹, Monica Cypriano⁷, Helena Paula Brentani⁴, Silvia Regina Caminada de Toledo⁷, Dirce Maria Carraro², Carla Rosenberg¹, Ana Cristina Victorino Krepschi^{1, 2}

¹ Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

² International Research Center, A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

³ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Cornélio Procopio, Paraná, Brazil

⁴ Department of Psychiatry, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁵ Department of Pediatric Oncology, A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

⁶ Department of Pathology, A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

⁷ Pediatric Oncology Institute (GRAACC), Department of Pediatrics, Federal University of São Paulo, São Paulo SP, Brazil

Corresponding author

Ana C. V. Krepschi

Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, Rua do Matão 277, 05508-090, São Paulo-SP, Brazil.

E-mail: ana.krepischi@ib.usp.br

Phone number: +55(11)3091-7573

Keywords: hepatoblastoma; embryonal tumor; DNA methylation; hipomethylation

ABSTRACT

Hepatoblastoma is a rare embryonal tumor of the liver. In despite of that, it accounts for more than 80% of the hepatic tumors in childhood. Previous genetic and cytogenetic studies of hepatoblastomas detected only few alterations, and epigenetic investigations were limited to specific targets. This study reports the first genome-wide DNA methylation profiling of hepatoblastomas using both Illumina 450k microarray platform and pyrosequencing of LINE-1.

We performed global methylation profiling in nine pairs of hepatoblastoma and matched differentiated liver tissue, and compared to fetal DNA samples. We identified in hepatoblastomas a global hypomethylation pattern compared to differentiated liver. This finding was corroborated by replication of the results in a independent cohort of 10 hepatoblastomas, and contrasts with usual findings in solid tumors. These differentially methylated sites (DMS) disclosed 10 genes potentially relevant to hepatoblastoma tumorigenesis. In contrast, a single CpG site of LINE-1 sequence was found to be hypomethylated in hepatoblastomas compared to differentiated livers. Therefore, in contrary to most adult tumors, hepatoblastomas present a hypomethylation pattern associated to non-repetitive DNA.

INTRODUCTION

The embryonal tumor hepatoblastoma is the most common hepatic tumor in childhood, and its incidence in the United States was estimated as 10.5 and 5.2 cases per million in children <1 and 1-4 years old, respectively (Howlader N., et al. 2011). Due to its rarity, knowledge regarding relevant genetic factors is limited. The relatively small amount of genetic mutations in embryonal tumors when compared to adult solid tumors may partially correlate with early age of onset (VOGELSTEIN et al., 2013b). Another possible explanation for such low mutational burden is the occurrence of a disruption of normal development in undifferentiated cells, a model proposed for embryonal tumors (MARIS e DENNY, 2002).

Cytogenetic studies revealed few abnormalities and genetic alterations affect mostly the WNT signaling pathway, with a high frequency of *CTNNB1* activating mutations (EICHENMULLER et al., 2014;FUJITA et al., 2014;KOSAKI et al., 2014;UDATSU et al., 2001b).

A less investigated mechanism that could explain either cancer development or developmental disruption is the occurrence of epigenetic changes in the genome (MARIS e DENNY, 2002). DNA methylation is a stable modification involved in many biological processes, including tissue differentiation, embryogenesis, and diseases (LISTER et al., 2009). In cancer, anomalous DNA methylation represents an important mechanism driving tumor development and progression (ROBERTSON, 2005). Although the role of DNA methylation is not totally elucidated, promoter hypermethylation is usually associated with inappropriate transcriptional repression (JONES, 2012;JONES e BAYLIN, 2002) of tumor suppressor genes, while hypomethylation of repetitive sequences may result in activation of retrotransposable elements and genomic instability (BAYLIN e JONES, 2011;CHATTERJEE e VINSON, 2012).

Few studies have investigated the DNA methylation pattern of hepatoblastomas, most of which focused in specific genes or genomic regions. Differential methylation at the promoter region has been investigated for *RASSF1A* (HARADA et al., 2002;HONDA et al., 2008b;HONDA et al., 2013;SUGAWARA et al., 2007b), *CASP8* (HONDA et al., 2008b),

SOCS1 (HONDA et al., 2008b;NAGAI et al., 2003;SAKAMOTO et al., 2010), *APC*, *CDH1*, *MT1G* (SAKAMOTO et al., 2010), *HHIP* (EICHENMULLER et al., 2009), *CDKN2A* (SHIM et al., 2003), *IGFBP3* (REGEL et al., 2012), *IGF2* (ERIKSSON et al., 2001;HONDA et al., 2008a;MAGRELLI et al., 2009) and *H19* (FUKUZAWA et al., 1999;HONDA et al., 2008a).

In the present study we interrogated in 19 hepatoblastomas the DNA methylation status of both ~485,000 CpG sites spread over the entire genome and LINE-1 sequences, and compared the results to differentiated and fetal non-tumoral livers. Differentially methylated sites (DMS) containing candidate loci for tumorigenesis were identified.

MATERIAL AND METHODS

Casuistic

The study was approved by the local Ethics and Research Committee (number 768/06) and signed informed consents were obtained from all patients' legal guardians. DNA samples extracted from frozen tissues of 9 sporadic hepatoblastomas and 10 non-tumoral differentiated livers (including matched normal tissue of tumor samples disregarded in consequence of necrosis) were provided by the Biobank of the A. C. Camargo Cancer Center – ACCCC, São Paulo, Brazil (described here as **Hepatoblastoma set#1, HB1 to HB9**). Additionally, tissues samples of 10 other hepatoblastomas were obtained from Pediatric Oncology Institute (GRAACC) (**Hepatoblastoma set#2, HB10 to Hb19**), São Paulo, Brazil. All patients received pre-surgery chemotherapy according to the SIOPEL (<http://www.siope.org/>) or COG (<http://www.childrensoncologygroup.org/>) protocols. Patients were followed by clinical examination, imaging tests and alpha-fetoprotein dosage for a minimum period of 18 months.

DNA and RNA isolation

All samples were clinically and pathologically well-characterized and tumors were macro-dissected for enrichment of neoplastic cellularity. Sections from tumor tissue blocks stained with hematoxylin and eosin were analyzed for subtype classification. Nucleic acids

extraction procedures were performed at Macromolecule Bank (A. C. Camargo Cancer Center). Genomic DNA was extracted using a phenol:chlorophorm protocol, and total RNA was obtained using RNeasy Mini Kit (Qiagen), following manufacturer's instructions. Nanodrop (Thermo Scientific) was used to access purity and DNA integrity was checked by electrophoresis in 0.8% agarose gels. RNA quantity and integrity were assessed by spectrophotometry (NanoDrop) and microfluidics-based electrophoresis (Bioanalyzer, Agilent Technologies); only RNA samples with RIN >5.0 were used for the gene expression analysis.

Commercial samples of DNA and cDNA were acquired from human fetal livers at two gestational ages (12 and 18 weeks; Novogenix Labs).

DNA methylation microarray experimental procedures

Bisulfite conversion of 500 ng of DNA was performed using the EZ DNA Methylation kit (Zymo Research) according to manufacturer's recommendations. Bisulfite-converted DNA samples were used for hybridization in HumanMethylation450 BeadChip microarrays (Illumina), following the Illumina Infinium HD Methylation protocol. These 450K microarrays interrogated the DNA methylation status of 485,577 loci distributed across the genome at single-nucleotide resolution. The Illumina iScan SQ scanner (Illumina) was used to obtain images of the microarrays.

Differential methylation microarray analysis

Data from scanned images of the microarrays were extracted using the GenomeStudio software (v.2011.1) with the methylation module v.1.9.0 (Illumina). Only experiments exhibiting the recommended quality control parameters (call rate >99% of probes with detection p-value ≤ 0.01) were considered for analyzes. Methylation value for each CpG probe is provided in beta-values ranging from 0 to 1 (0 indicating unmethylated CpGs, and 1, fully methylated CpGs). We excluded from our analysis CpG probes not detected in all samples, as well as those mapped in chromosomes X and Y.

The raw data were loaded to IMA package (WANG et al., 2012b) preprocessing stage for quality verification. Normalization and preprocessing of data was made using a Beta-mixture quantile normalization through the ChAMP pipeline, incorporating correction of the signals of the different Infinium probes (MORRIS et al., 2013). Differential methylation analysis comparing the hepatoblastomas to differentiated livers was performed applying the IMA pipeline with the following statistical parameters: Wilcoxon test and Benjamini-Hochberg test for multiple hypothesis testing correction (BENJAMINI e HOCHBERG, 1995) with $p < 0.05$, and a delta-beta threshold of $|0.1|$. Annotations of CpG loci were provided by Illumina platform, based on UCSC database (hg19).

Pyrosequencing

Pyrosequencing was performed using PyroMark Q96 System (Qiagen) according manufacturer's instructions, both for: (a) technical validation of two regions found as differentially methylated in hepatoblastomas and normal tissue by the 450K platform (Primer sequences in **Supplementary Table S1**), and (b) evaluating LINE-1 methylation levels using PyroMark kit cat. 970042 (Qiagen; position 305–331 - GenBank X58075).

PyroMark CpG 1.0.11 software build 14 (Qiagen) was used for raw data analysis, and the amount of C relative to the total amount of C+T at each CpG site was calculated in percentage using PyroMark Q96-CpG Software (Qiagen). Statistical correction was performed by linear regression from the dispersion of data obtained in the experiments using a control DNA methylation set (EpiTect PCR control DNA set - Qiagen). Statistical tests were made using Prism 6.04 software (GraphPad).

Gene expression analysis

The total RNA was enzymatically converted to cDNA using High Capacity cDNA RT kit (Thermo Fisher Scientific), and all procedures followed the manufacturer's protocol. We investigated the mRNA expression profile of selected genes (ASCL2, HOXA3 and SLC16A5) using SYBR-green based assay (Thermo Fisher Scientific). Primers sequences were

designed and analyzed using Primer3 (UNTERGASSER et al., 2012) and OligoAnalyzer 3.1 (IDT – Integrated DNA Technologies) softwares; sequences are available in **Supplementary Table S2**. *ACTB* (actin beta) was considered as the reference gene. We choose one of the non-tumoral liver samples as reference in all runs, and gene expression results were obtained through the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ relative quantitative method (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

RESULTS

Global hypomethylation in hepatoblastomas

Using the 450K platform we analyzed 19 hepatoblastomas (*Hepatoblastoma set#1* and *Hepatoblastoma set#2*). The clinical features of the patients with hepatoblastomas are summarized in **Table 1**.

Hepatoblastoma sets #1 and #2 presented a global hypomethylation pattern compared to differentiated liver. However, the hypomethylation level was not as prominent as found in fetal liver. **Figure 1** shows the DNA methylation status of hepatoblastomas, in between that presented by differentiated and fetal livers.

Identification of differentially methylated sites (DMSs)

In comparison to differentiated livers, *Hepatoblastoma set#1* presented 8,528 differentially methylated CpGs ($\Delta\beta > |0.1|$; $p < 0.05$), vast majority of which (6,018 CpGs; 70.5%) were hypomethylated (**Figure 2.a**, top). A second independent cohort of ten hepatoblastomas (*Hepatoblastoma set#2*) was used to replicate the analysis. Set #2 presented 43,346 differentially methylated CpGs ($\Delta\beta > |0.1|$; $p < 0.05$) and a large proportion of them, similarly to set #1 (85.9%; 37,262 CpGs), were hypomethylated (**Figure 2a**, bottom).

Between the DMSs identified in the two sets, there was an overlap of 6,798 DMS (**Figure 2b**), all of them exhibiting similar methylation status compared to the differentiated livers (either both hyper or both hypomethylated, maximum variation = 0.21, average

deviation = 0.009). The majority of the shared DMSs (4,930 CpGs; 72.5%) were hypomethylated in relation to differentiated livers (**Figure 2c**). From the shared 6,798 DMSs, 4,719 were associated with 3,471 genes. Among those, 2,534 genes had hypomethylated sites while 1,078 genes had hypermethylated CpGs. Within the DMSs we identified three genes previously reported as relevant for hepatoblastomas presenting differentially methylated promoters: *RASSF1*, *MT1G*, and *IGF2* (**Supplementary Figure 1**). The set of genes associated with the shared DMSs was evaluated using the network analysis tool of Ingenuity Pathways Analysis software (IPA). The top canonical pathway was related to cancer, development and cell cycle. The analysis highlighted the *CTNNB1* gene as the top precursor and liver hyperplasia/hyperproliferation as an important disease associated to the sets of genes.

We selected 10 regions (11 genes) presenting three or more CpGs differentially methylated located at CpG islands within a promoter or transcription site regions (5'UTR, TSS1500 and TSS200). The genes and their functions are described in **Table 2** and a detailed view of CpGs is provided in **Supplementary Figure 2**.

Two of these differentially methylated regions (*ASCL2* and *SLC16A5* genes) were chosen for technical validation using pyrosequencing. Pyrosequencing results showed a high correlation with the methylation levels obtained by the 450K platform (Pearson's correlation coefficient > 0.9).

Gene expression analysis

Three candidate genes (Table 2) were selected for gene expression by quantitative PCR (*HOXA3*, *ASCL2* and *SLC16A5*). We were not able to detect any expression from *ASCL2*. *HOXA3* expression showed a direct correlation with the methylation levels of the associated CpGs at its promoter, while *SLC16A5* gene expression was variable and did not correlate with methylation data (Pearson correlations 0.66 and 0.02, respectively). The gene expression analyses and comparisons to the promoter CpGs methylation are shown in **Figure 3**.

LINE-1 methylation status

We analyzed by pyrosequencing the methylation status of four CpGs sites mapped within LINE-1 sequences. The LINE-1 methylation levels were very similar across hepatoblastomas, differentiated and fetal liver samples. Focusing on the analysis of individual CpGs, Hepatoblastomas from set #1 showed a slightly hypomethylated pattern only at the first CpG of the LINE-1 sequence when compared to the differentiated livers ($p = 0.0259$); (**Figure 4a**).

The copy number alteration profile for each sample of the Hepatoblastoma set #1 has been previously evaluated by array-CGH (RODRIGUES,T.C. et al., In press 2014). Tumor samples with and without chromosome alterations >100 kb were compared to differentiated livers regarding the methylation level of LINE-1. Significant differences in LINE-1 methylation levels were found again only for the first CpG, which is hypomethylated in hepatoblastomas with copy number alterations ($p = 0.0057$). The Kruskal-Wallis test also points a difference between the groups of $p = 0.0166$ at this CpG. These graphs are shown in **Figure 4.b**.

DISCUSSION

Embryonal tumors are believed to evolve from disruption of normal embryogenesis (RUSHTON e LOPEZ-TERRADA, 2010;YASHIMA et al., 1998) and DNA methylation changes are probably involved in this process. Investigation of non-repetitive DNA revealed that hepatoblastomas present a global hypomethylation pattern compared to their normal counterparts, displaying an intermediate global DNA status in between differentiated and fetal livers. This hypomethylated pattern of non-repetitive DNA is unusual for most solid tumors, which generally exhibit hypermethylation. Recently, global hypomethylation was reported for hepatocellular carcinoma (SHEN et al., 2013), and the embryonal tumor medulloblastoma (HOVESTADT et al., 2014), The results of global DNA hypomethylation in non-repetitive sequences of hepatoblastomas may reflect a different mechanism of tumorigenesis related to embryonal tumors (HOVESTADT et al., 2014); alternatively, it may

be an aspect of hepatic tumorigenesis (SHEN et al., 2013), or even both, requiring further investigations.

To complement the methylation profile of hepatoblastomas, we investigated LINE-1, a repetitive element that constitutes approximately 17% of the human genome. LINE-1 is hypomethylated in many adult tumors, and its methylation level correlates with clinical/pathological features of tumors (BABA et al., 2010; BECK et al., 2010). We did not find differences in LINE-1 methylation in hepatoblastoma compared to differentiated liver, except for the first CpG, which was significantly hypomethylated. Similar results for the same CpG were recently described in another hepatoblastoma study (RUMBAJAN et al., 2013).

Hypomethylation of LINE-1 in adult tumors has been associated with the occurrence of copy number alterations (BABA et al., 2014; CADIEUX et al., 2006; SHIGAKI et al., 2013), due to genomic instability. Comparing tumors with and without copy number alterations, it seems that our observation of hypomethylation of the first CpG of LINE-1 in hepatoblastomas compared to differentiated liver can be ascribed mainly to samples harboring chromosome alterations.

The set of genes that was differentially methylated in hepatoblastomas compared to differentiated liver was evaluated for pathway enrichments. The top canonical pathway was related to cancer, development and cell cycle. *CTNNB1* was highlighted as the top precursor gene, and the whole set of genes was also associated with liver hyperplasia/hyperproliferation.

Differentially methylated CpGs included genes already reported to be altered in hepatoblastomas, such as: *RASSF1A*, which promoter hypermethylation is the most well-known epigenetic aberration in hepatoblastoma (HONDA et al., 2013); *MT1G* (SAKAMOTO et al., 2010), a tumor suppressor associated with some types of carcinomas (GUMULEC et al., 2014; HENRIQUE et al., 2005; PEDERSEN et al., 2009), including hepatocellular (KANDA et al., 2009); and *IGF2* (ERIKSSON et al., 2001; HONDA et al., 2008a).

Most of the ten genes selected for presenting larger differences in methylation at promoter or transcription sites are either associated with development and morphogenesis

(*ASCL2*, *HOXA3*, *MSX1*, *FSCN2* and *TSPAN9*), or with cancer (*ASCL2*, *HOXA3*, *FSN2*, *SLC6A19*, *FGR*). The presence of consistent differential methylation in these gene promoters/transcription sites in combination with their functions make them plausible candidates for hepatoblastoma tumorigenesis.

In medulloblastomas (HOVESTADT et al., 2014), the prevalence of hypomethylation correlated with increased gene expression. In fact, promoter methylation usually presents a negative correlation with transcription (CHATTERJEE e VINSON, 2012). We selected two of the candidate genes at the promoter region to assess the impact of the altered methylation in gene expression. While no statistical correlation was observed for *SLC16A5*, we unexpectedly detected a direct correlation between methylation and expression data for *HOXA3*, i.e., the occurrence of hypermethylation correlated with increased gene expression. Nowadays, it is stated that quantitative relationship between promoter methylation and gene expression is far more complicated than earlier assumed (JONES, 2012). It is important to notice that methylation evaluation based on sodium bisulfite modifications, such as the platform used here, does not distinguish between 5-methylcytosine (5mC) and 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) (HUANG et al., 2010). 5hmC is the first oxidative product in the active demethylation of 5-methylcytosine (5mC) by TET enzymes (TAHILIANI et al., 2009), leading to the hypothesis that 5hmC may be an intermediate in the removal of 5mC (BRANCO; FICZ; e REIK, 2012). There are studies associating 5hmC with euchromatin, and stating that while 5mC is under-represented at gene promoters and CpG islands, 5hmC is enriched and could be associated with increased gene expression, consistent with a direct correlation such as observed for *HOXA3*(FICZ et al., 2011;SZULWACH et al., 2011).

CONCLUSIONS

Our results showed that hepatoblastomas exhibit a global hypomethylation pattern of non-repetitive DNA sequences. This pattern contrasts to the vast majority of tumor types that display hypermethylation of coding sequences and hypomethylation of repetitive sequences such as LINE-1. These results could either indicate that embryonal tumors have different

oncogenic mechanisms, once it has also been also observed in meduloblastomas or, alternatively, be a characteristic feature of hepatic tumors, since it has been reported in hepatocellular carcinoma. The pathway analysis of the differentially methylated genes revealed an enrichment for cancer, development and cell cycle. Confirming previous finding, *CTNNB1* was highlighted as the top precursor gene, suggesting a non-stochastic mechanism of CpG methylation in hepatoblastomas. We also provided a list of potential candidate genes for hepatoblastomas.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Biobank of the A. C. Camargo Cancer Center and GRAACC (both from São Paulo, Brazil) for providing tissues and DNA samples. We are very grateful to the patients and their families for their precious collaboration. The present study was supported by FAPESP grants 2011/24007-9 and 2009/00898-1.

TABLES

Table 1. Clinical characterization of the group of 19 patients with hepatoblastoma.

ID	Age at diagnosis	Gender	Histology*	Alpha-fetoprotein (ug/L) (at diagnosis)	Treatment Protocol	Recurrence	Metastasis	Overall survival
HB-1	2.5 years	F	Embryonal	5,668	PRETEXT	-	-	1 year
HB-2	10 months	M	Fetal	N/A	PRETEXT III	-	-	> 11 years
HB-3	3 years	F	Fetal	> 400	PRETEXT III	-	-	> 10 years
HB-4	9 months	M	Embryonal	> 200	PRETEXT III	-	-	> 9 years
HB-5	20 years	M	Embryonal	N/A	PRETEXT IV	yes	-	1 year
HB-6	5.5 years	M	Mixed fetal (85%) /embryonal (10%) + small cells (5%)	> 1,000	PRETEXT IV	N/A	yes (lung)	N/A
HB-7	2 years	M	Fetal	742	PRETEXT	-	-	> 5 years
HB-8	3 years	F	Embryonal	9,328	PRETEXT IV	-	yes (lung)	> 5 years
HB-9	3 months	F	Fetal	8,399	PRETEXT III	-	-	> 2 years
HB-10	2 years and 2 months	M	Fetal	N/A	PRETEXT III	-	-	> 10 years
HB-11	1 year and 1 month	F	Mixed fetal (5%)/embryonal (40%) + tumoral stroma (55%) + non-tumoral stroma (10%)	1,870	PRETEXT	-	-	> 7 years
HB-12	12 years	F	Fetal + non-tumoral stroma (10%)	643	PRETEXT IV	-	-	> 2 years
HB-13	7 years	M	Fetal + non-tumoral stroma (30%)	> 300	PRETEXT II	-	-	8 months
HB-14	2 years	M	Fetal	1,842	PRETEXT	-	-	> 4 years
HB-15	2 years	M	Mixed fetal/embryonal + tumoral stroma (55%)	201,733	COG	-	yes (lung)	> 2.5 years
HB-16	13 years	M	Fetal + tumoral stroma (50%)	N/A	PRETEXT	-	-	N/A
HB-17	1.5 years	M	Embryonal + tumoral stroma (50%)	183,476	PRETEXT III	-	-	> 6 years
HB-18	4,5 years	M	Embryonal + tumoral stroma (30%)	N/A	PRETEXT	-	-	N/A
HB-19	5 months	F	Fetal (90%)	41,000	PRETEXT	-	-	8 months

F: Female; M: Male; N/A: not available. (*) The histology description refers to the frozen tissue sent to DNA extraction.

Table 2. List of genes harboring at least 3 differentially methylated CpGs in hepatoblastoma, located at CpG island within promoter regions. Hypomethylated genes are colored in red while hypermethylated are shown in green.

Chr	Gene symbol	Gene name	Number of CpGs in DMS-HB	Average beta-values of CpGs in DMS-HB	UCSC Refgene group	Gene function (Entrez description and GO annotation)
11	ASCL2	achaete-scute complex homolog 2 (Drosophila)	11	0.29	TSS1500	Member of the basic helix-loop-helix (BHLH) family of transcription factors. Involved in utero embryonic development (GO:0001701). Associated with colon and colorectal cancer, choriocarcinoma and Beckwith-Wiedemann syndrome.
1	FGR	Feline Gardner-Rasheed Sarcoma Viral Oncogene Homolog	3	0.28	TSS200, 5'UTR	Member of the Src family of protein tyrosine kinases (PTKs). Related to immune response regulation (GO: 0002768). Associated with placental insufficiency, chronic myeloid leukemia, chronic myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes and neuroblastoma.
7	HOXA3	Homeobox A	3	0.25	TSS150, 5'UTR	Encodes a class of transcription factors. Expression of these proteins is spatially and temporally regulated during embryonic development. This gene is part of the A cluster on chromosome 7 and encodes a DNA-binding transcription factor which may regulate gene expression, morphogenesis, and differentiation. Association with teratocarcinoma.

Chr	Gene symbol	Gene name	Number of CpGs in DMS-HB	Average beta-values of CpGs in DMS-HB	UCSC Refgene group	Gene function (Entrez description and GO annotation)
4	MSX1	msh homeobox 1	6	0.26	TSS1500	Member of the muscle segment homeobox gene family. The encoded protein functions as a transcriptional repressor during embryogenesis (GO:0006351). It may also have roles in limb-pattern formation, craniofacial development, particularly odontogenesis, and tumor growth inhibition. Association with in utero embryonic development GO: 0003198).
22	C22orf26/ LOC150381	chromosome 22 open reading frame 26 / Uncharacterized LOC150381	4	-0.18	TSS200	Protein coding gene, few information available / RNA gene, and is affiliated with the lncRNA class few information available
1	FLJ39609	hypothetical protein FLJ39609	3	-0.18	TSS200	Predicted RNA gene, no information available.
17	FSCN2	fascin homolog 2, actin-bundling protein, retinal (Strongylocentrotus purpuratus)	3	-0.21	TSS1500, TSS200	Member of the fascin protein family. Play a role in photoreceptor disk morphogenesis. Associated with retinitis, dendritic cell sarcoma, esophageal squamous cell carcinoma, squamous cell carcinoma and colon cancer.

Chr	Gene symbol	Gene name	Number of CpGs in DMS-HB	Average beta-values of CpGs in DMS-HB	UCSC Refgene group	Gene function (Entrez description and GO annotation)
17	SLC16A5	solute carrier family 16 (monocarboxylate transporter), member 5	4	-0.31	TSS200, 5'UTR	Member of the monocarboxylate transporter family and the major facilitator superfamily. Aberrant hypomethylation associated with neuroblastoma (SUGITO et al., 2013).
5	SLC6A19	solute carrier family 6 (neutral amino acid transporter), member 19	4	-0.18	TSS200	Encodes a system B(0) transmembrane protein that actively transports most neutral amino acids across the apical membrane of epithelial cells. Mutations in this gene result in Hartnup disorder. The transporter encoded mediates epithelial resorption of neutral amino acids across the apical membrane of epithelial cells in the kidney and intestine. Associated with choriocarcinoma.
12	TSPAN9	tetraspanin 9	4	-0.27	5'UTR	The protein mediates signal transduction events that play a role in the regulation of cell development, activation, growth and motility. Association with alzheimer's disease.

Figures

Figure 1. Global methylation pattern in hepatoblastomas. The distribution of CpG methylation values of all 450K platform probes (Beta values ranging from 0 for unmethylated to 1 for fully methylated) obtained from four groups of samples: hepatoblastomas (sets 1 and 2), and differentiated and fetal livers.

Figure 2. Distribution of the differentially methylated sites (DMS) in hepatoblastomas compared to differentiated liver. **a)** proportion of the DMSs (light blue) among all CpG targets and distribution of them in hypo (green) and hypermethylated (red) sites (set #1 top and set #2, bottom). **b)** Venn diagram showing the number of DMSs in hepatoblastomas sets #1 and #2, and the DMSs shared by both groups **c)** distribution of shared DMSs in hypo (green) and hypermethylated (red) sites

Figure 3. Representation of promoter CpGs methylation levels and gene expression data for *HOXA3* and *SLC16A5* genes. CpGs methylation data were colored according to the minimum and maximum status of methylation (0-1) and gene expression data were colored according the lowest and highest relative gene expression values obtained in the analysis.

Figure 4. Methylation status of LINE-1 in hepatoblastomas (sets#1 and #2), and in differentiated and fetal livers. Graphics at left show average methylation levels of all four CpGs located at LINE-1; at right, methylation levels only of the first CpG (CpG1). **a)** hypomethylation of the hepatoblastoma samples (set#1) was detected only for the CpG1. **b)** comparison of methylation levels from tumor samples (set#1) with and without chromosomal alterations (>100 kb) to differentiated livers. Hepatoblastomas harboring chromosome alterations showed hypomethylation of CpG1 located only on hepatoblastomas with chromosome alterations. The * means statistical significance.

Supplementary Table S1. Primer sequences used for technical validation of two regions found as differentially methylated in hepatoblastomas and normal tissue by the 450K platform.

Gene	450k CpG probe investigated	Forward sequence	Reverse sequence (5' biotin modification)	Sequence primer
ASCL2	cg21063716	GGTTTGGAGGTTTGTAT	CCAATCTCAATACCCTC	TTTGGAGGTTTGTATT
SLC16A5	cg27619475, cg21306329, cg17733616	GAAGTTAGAAAGAGGGT	AAAACCCACCTTCCAACCT	GGTTGTGTAAATTTAGATAT

Supplementary Table S2. Primers sequences used for gene expression analysis.

Gene	Foward sequence	Reverse sequence
ASCL2	GCTACTCGACTTCTCCAGCT	CTCCAAGCCCGTTTCCAC
SLC16A5	TCAGCCAGCTCTACTTCACAG	CGCCGAAGACAAGGAAGGT
HOXA3	CACAAAGCAGAAAACCAGCA	ACAGGTAGCGGTTGAAGTGG

Supplementary Figure 1. Three genes previously reported as differentially methylated in hepatoblastomas were also found among the DMS-HB: RASSF1, MT1G, and IGF2 – here illustrated. X axis: average beta values, Y axis: CpGs interrogated within the gene. Orange arrows indicate the CpG present in the DMS list.

Supplementary Figure 2. Aiming to disclose candidate differentially methylated markers for hepatoblastoma, we selected 10 regions (11 genes) presenting three or more CpGs differentially methylated in DMS-HB located at CpG islands within a promoter or transcription site regions (5'UTR, TSS1500 and TSS200). Here we illustrated the CpGs methylation profile of *SLC16A5* gene. X axis: average beta values, Y axis: CpGs interrogated within the gene. Orange arrows indicate the CpG present in the DMS list.

Capítulo VII.

Limitações e perspectivas do estudo

Capítulo VII. Limitações e perspectivas do estudo

O presente estudo apresentou algumas limitações não previstas inicialmente, assim como trouxe como resultado algumas novas perspectivas para continuidade do trabalho, que são discutidas a seguir.

O número amostral considerado como casuística para o estudo é bem reduzido. Este fator deve em parte pela raridade do tumor hepatoblastoma, assim como pela ausência de projeto antecedente que providenciasse o armazenamento das amostras em bancos de tumores brasileiros. Essa limitação em tamanho amostral resulta em baixo poder estatístico, prejudicial para a detecção de efeitos genéticos discretos (EVANS e PURCELL, 2012). Outra consequência do baixo número de amostras é a possível distorção da frequência das alterações encontradas em nossa casuística frente ao valor real para o grupo de hepatoblastomas. Para os estudos de alterações em número de cópias, área melhor explorada para este tipo tumoral, o problema foi minimizado com a corroboração dos dados obtidos com os disponibilizados anteriormente pela literatura. Já para o estudo de mutações em sequências codificadoras, a perspectiva é investigar a frequência das alterações encontradas a partir do grupo inicial de 6 tumores no restante da casuística (13 tumores adicionais).

A qualidade dos materiais genéticos extraídos não alcançou padrões de excelência máxima, o que é um problema frequentemente associado ao uso de amostras tumorais. Uma qualidade um pouco inferior interfere na detecção de alterações de número de cópias de pequenos segmentos cromossômicos pela técnica de *array*-CGH, visto que a técnica envolve uma etapa de marcação com utilização de enzimas de restrição, onde a qualidade sub-ótima do DNA pode interferir na reação (COSTA et al., 2008). Para lidarmos com essa limitação, além de limitar os parâmetros de qualidade dos experimentos abordados nas análises, restringimos o tamanho mínimo das alterações consideradas; adicionalmente, as alterações detectadas pelo software foram avaliadas individualmente, e só foram apenas

consideradas aquelas alterações que apresentavam uma clara e acentuada mudança do perfil cromossômico, excluindo aqueles calls devidos a oscilações do perfil ao redor do limiar, característica de ruído. Na sua maioria, porém, a qualidade dos experimentos foi satisfatória e não interferiu de maneira importante em seus resultados.

Hepatoblastoma é um tumor embrionário que se origina de uma célula precursora de hepatócitos e frequentemente parece recapitular os estágios de desenvolvimento do fígado refletidos em uma combinação de padrões histológicos (CZAUDERNA et al., 2014). As avaliações referentes aos subtipos histológicos presentes neste estudo foram desenvolvidas por um mesmo patologista e sempre revisadas por um segundo clínico seguindo critérios internacionais (FINEGOLD et al., 2007). Ainda assim, por questões amostrais, uma variação na classificação é possível.

Os diversos padrões histológicos de hepatoblastomas já foram inclusive associados a diferentes prognósticos (ROWLAND, 2002). Já foi comprovado para outros tumores pediátricos que os padrões moleculares também sofrem variação entre os diferentes tipos histológicos (MASCHIETTO et al., 2008). Devemos considerar que no presente estudo as peças tumorais provenientes de biópsia foram submetidas apenas à macrodissecção manual a fim de enriquecer o conteúdo celular neoplásico nas amostras. Não houve isolamento de regiões com tipos histológicos específicos. Assim, as alterações e efeitos encontrados refletem o comportamento do tumor de modo geral, sendo que as diferentes regiões histopatológicas podem apresentar comportamento distinto, afetando a oncogênese. No mais, algumas alterações de número de cópias de segmentos cromossômicos ou de expressão gênica específicas a regiões histológicas distintas podem ter sido subestimadas, devido a mosaicismo tumoral.

Para todas as vertentes do presente trabalho seria desejável que estudos posteriores validassem os achados em um número maior de tumores, possibilitando uma estimativa mais fidedigna quanto à frequência e ao impacto das alterações aqui descritas.

Capítulo VIII.

Conclusões

Capítulo VIII. Conclusões

Alterações em número de cópias de sequências de DNA

O baixo número de alterações de número de cópias encontradas nesse estudo evidencia que hepatoblastomas geralmente apresentam baixa instabilidade ao nível de rearranjos cromossômicos em comparação ao encontrado em outros tumores sólidos. As alterações são, em sua maioria, ganhos de grandes regiões cromossômicas, sendo comum aneuploidias completas ou de braços cromossômicos. Tais achados corroboram dados presentes na literatura até o momento.

Uma região previamente associada a pior prognóstico em hepatoblastomas, localizada na região 2q24, foi encontrada como um ganho de alta amplitude (amplicon) em uma das amostras. O amplicon tem aproximadamente 10Mb e engloba 48 genes, e estreita a região previamente conhecida. A fim de restringir o número de genes potencialmente associados ao tumor, uma análise de expressão gênica foi realizada e destacou 5 dos 48 genes como superexpressos em hepatoblastomas, condizente o ganho no número de cópias. Os genes *DAPL1*, *ERMN*, *GALNT5*, *SCN1A* e *SCN3A* emergem então como potenciais marcadores em hepatoblastoma.

A análise de expressão gênica dos genes candidatos foi também realizada nas amostras de fígado fetal, ressaltando a similaridade entre os níveis de expressão dos genes encontrados no tumor embrionário e aqueles encontrados nas amostras de fígado em desenvolvimento, reforçando o modelo de recapitulação de aspectos da morfogênese em hepatoblastomas. Importante notar que o fígado desenvolvido apresentou padrão distinto do fígado fetal e do tumor.

Mutações somáticas em regiões codificadoras do genoma

Observamos baixa ocorrência de mutações somáticas não-sinônimas em hepatoblastomas, quando comparada às variações encontradas em outros tumores sólidos

em adultos. O achado está de acordo com o conhecimento sobre tumores pediátricos, onde é descrito um número mais restrito de mutações. Os primeiros trabalhos envolvendo estudos de mutações em hepatoblastoma foram publicados este ano, e apresentam uma grandeza similar com relação às mutações encontradas.

Descrevemos uma nova mutação não-sinônima no éxon 3 do gene *CTNNB1* (beta-catenina) em uma amostra, marcador molecular de destaque em hepatoblastomas. Segundo algoritmos de predição de impacto funcional, a mutação é danosa, e deve impactar a ocorrência tumoral no paciente.

Dentre a lista de alterações somáticas encontradas, cabe destacar um enriquecimento da via Wnt, via da beta-catenina, que é bem estudada em hepatoblastomas e apresenta correlação tanto com desenvolvimento embrionário como com o processo de carcinogênese.

Destacamos uma lista de mutações somáticas não-sinônimas presentes com boa cobertura em nossos experimentos, e ausentes ou presentes em baixa frequência (< 1%) na população. Os genes alterados são potencialmente relevantes para a origem ou progressão dos hepatoblastoma, e serão investigados nas demais amostras disponíveis nos próximos meses.

Alterações no padrão de metilação de citosinas

O presente estudo é o primeiro analisando de maneira global as alterações no padrão de metilação de citosinas em hepatoblastomas, e revelou um padrão incomum de hipometilação global. O padrão de metilação global encontrado para os hepatoblastomas apresenta um nível intermediário entre o encontrado para os fígados maduros e aquele encontrado para os fígados fetais, o que está de acordo com o modelo que postula a ocorrência de recapitulação de fases do desenvolvimento durante a oncogênese de hepatoblastoma.

A hipometilação não está associada a regiões repetitivas (LINE-1), onde o nível de metilação entre os tumores e os fígados maduros se manteve constante, a exceção da primeira CpG da sequência. Comparando tumores que apresentam ou não alterações em número de cópias, é sugestivo que a observação acerca de hipometilação na primeira CpG da LINE-1 pode ser associada a amostras que apresentam alterações cromossômicas.

A análise de pirosequenciamento dos genes candidatos demonstrou alta concordância com os resultados obtidos através da técnica de avaliação de metilação por microarranjos (450k Illumina). Os níveis de metilação em promotor de gene candidato mostrou correlação de maneira direta com a expressão gênica, ao contrário do que é esperado para hipometilação de promotores gênicos. Um número maior de genes precisa ser investigado, mas uma das hipóteses que explicaria o quadro é a ocorrência de metilação por meio da adição de grupo 5-hidroxi-metil, ao invés de grupos 5-metil, em hepatoblastomas.

Apêndice

Apêndice

Item I. "Termo de Informação e Consentimento para Guarda de Material Biológico para Pesquisas"

INFORMAÇÃO E CONSENTIMENTO PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA PESQUISAS

Para obter um maior conhecimento sobre o câncer, o Corpo Clínico deste Hospital (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica e científica, para conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto, buscar oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. O material biológico retirado é destinado para exames clínicos laboratoriais, necessários para um diagnóstico. O restante do material retirado pode ser armazenado para novos exames, caso seja considerado necessário. Caso contrário, é descartado, conforme Legislação Sanitária regulamentar sobre o assunto.

Estamos solicitando a sua permissão para guardar e utilizar o resto de tecidos e/ou fluídos retirados de você que não são mais necessários para o seu diagnóstico. A obtenção e o estudo dos referidos fragmentos de tumor e material biológico não implicarão em riscos adicionais no seu tratamento ou na sua cirurgia, nem tampouco, em aumento no tempo da operação ou extensão da mesma.

O depositário destes tecidos será o Banco de Tumores do Hospital do Câncer (A.C.Camargo). Este material poderá ser usado em pesquisas futuras. Os projetos de pesquisa propostos que vierem a utilizar este material serão previamente apresentados à apreciação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital. Sua privacidade e identidade serão sempre preservadas.

A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita sempre de modo a manter o seu anonimato. Todo material do Banco de Tumores é codificado e apenas o Diretor do Banco (Dr. Antônio Hugo José Fróes de Marques Campos, patologista, CRM-SP 110.240) tem acesso irrestrito à sua identidade. Caso sejam realizadas pesquisas genéticas utilizando seu material armazenado conosco, e estas pesquisas indiquem alterações que envolvam riscos futuros para seus familiares, as mesmas podem ser informadas a você, se esse for o seu desejo.

Não existem quaisquer benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes de pesquisas realizadas nesta Instituição.

Sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu tratamento.

A autorização para manutenção destas amostras é por prazo indeterminado, podendo ser cancelada por aviso escrito ao Diretor do banco de Tumores da instituição.

Caso haja questões a esclarecer sobre este Termo de Consentimento para Guarda de Material Biológico para Pesquisas, por gentileza entre em contato com a Comissão de Ética em Pesquisa, pelo telefone 2189-5000 ramal 5020. Você receberá cópia deste documento.

Somente assine este documento, se consentir integralmente com os termos deste.

Declaro estar ciente das informações ora prestadas, tendo lido atentamente o texto, e:

1. Eu (escrever Sim ou Não)..... **consinto (concordo)** que tecidos, sangue e outros fluídos corporais, quando não necessários para o meu diagnóstico, possam ser coletados, guardados e usados pelo banco de tumores do Hospital do Câncer (A.C.Camargo) e seus colaboradores, para pesquisas sobre a prevenção, tratamento, diagnóstico ou cura do câncer ou outras doenças e problemas de saúde, bem como dados de idade, sexo, fatores epidemiológicos relacionados, outras informações do meu prontuário médico, diagnóstico, tratamento e história familiar.

1.2 Se a resposta anterior for **SIM**, minha informação e amostra poderão ser usadas em testes genéticos que podem identificar risco de doenças genéticas para meus familiares. Neste caso (**escrever Sim ou Não**),.....quero ser informado da descoberta.

Por expressão de verdade firmo o presente Termo.

São Paulo.....,de.....de 2009.

RG

CPF

Prestador de Serviço de Saúde: Fundação Antonio Prudente, mantenedora do Hospital A. C. Camargo-Centro de Tratamento, Ensino e Pesquisa em Câncer, CNPJ/MF sob nº 60.961.968/0001-06, com sede na Rua Prof. Antonio Prudente, 211 – Liberdade – Capital/SP, CEP 01509-010 Fone(11) 2189-5000

Item II. Lista de genes selecionados para enriquecimento de cobertura nas lâminas de array-CGH customizadas

Gene IDs									
<i>ABCC2</i>	<i>BIRC3</i>	<i>CEACAM1</i>	<i>DNMT3</i>	<i>GRIK1</i>	<i>KRAS</i>	<i>MPL</i>	<i>PIP4K2</i>	<i>SHBG</i>	<i>TOP2A</i>
<i>ABCG2</i>	<i>BMI1</i>	<i>CEBPB</i>	<i>EBAG9</i>	<i>GSK3B</i>	<i>KRT18</i>	<i>MSH2</i>	<i>PKD1L2</i>	<i>SHCBP1</i>	<i>TP53</i>
<i>AFP</i>	<i>BRAF</i>	<i>CHEK2</i>	<i>EDA</i>	<i>H19</i>	<i>KRT7</i>	<i>MSH3</i>	<i>PLAG1</i>	<i>SLC10A1</i>	<i>TTK</i>
<i>AHR</i>	<i>BRCA1</i>	<i>CKMT2</i>	<i>EGFR</i>	<i>HDHD1A</i>	<i>LAMB2T</i>	<i>MYC</i>	<i>PMS1</i>	<i>SLC22A18</i>	<i>TWIST1</i>
<i>AIB1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>CKS1B</i>	<i>ELK1</i>	<i>HIF</i>	<i>LEF1</i>	<i>NCOA3</i>	<i>PNPLA4</i>	<i>SMAD4</i>	<i>TYR</i>
<i>AKT2</i>	<i>BRIP1</i>	<i>CLDN2</i>	<i>EMS1</i>	<i>HMGCLL1</i>	<i>LKB1</i>	<i>NCRNA00189</i>	<i>PPARA</i>	<i>SNAI1</i>	<i>UBP6</i>
<i>APC</i>	<i>C17ORF106</i>	<i>CNTN3</i>	<i>EPOR</i>	<i>HNF1A</i>	<i>LRP1B</i>	<i>NF1</i>	<i>PTEN</i>	<i>SNAI2</i>	<i>UGT2B4</i>
<i>APOA2</i>	<i>C21orf41</i>	<i>CNTN6</i>	<i>ERBB2</i>	<i>HNF4A</i>	<i>MAGEA8</i>	<i>NF2</i>	<i>PTMA</i>	<i>SNRPB2</i>	<i>VAMP8</i>
<i>APOB</i>	<i>C21orf57</i>	<i>CRAT</i>	<i>EVII</i>	<i>HRAS</i>	<i>MAGEC2</i>	<i>NFKB</i>	<i>PTPRK</i>	<i>ST6GALNAC3</i>	<i>VEGF</i>
<i>AR</i>	<i>C21orf58</i>	<i>CSF2RA</i>	<i>FAM155B</i>	<i>IGF1R</i>	<i>MAP2K4</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>RAC1</i>	<i>ST6GALNAC5</i>	<i>VEGFA</i>
<i>ARHGAP15</i>	<i>C21orf7</i>	<i>CSMD3</i>	<i>FAM160A1</i>	<i>IGF2</i>	<i>MAPK8</i>	<i>NQO2</i>	<i>RAD17</i>	<i>STAT1</i>	<i>VEGFC</i>
<i>ARRDC4</i>	<i>C2CD4A</i>	<i>CTNNA3</i>	<i>FANCA</i>	<i>IGSF11</i>	<i>MCART2</i>	<i>NRAS</i>	<i>RAD50</i>	<i>STAT3</i>	<i>VIM</i>
<i>ASAP2</i>	<i>C2CD4B</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>FANCC</i>	<i>IL22</i>	<i>MDM1</i>	<i>NXF1</i>	<i>RAD51</i>	<i>STK11</i>	<i>WNT1</i>
<i>ATM</i>	<i>C9orf152</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>FANCD1</i>	<i>IL26</i>	<i>MDM2</i>	<i>OCT4</i>	<i>RAD51C</i>	<i>TAF6L</i>	<i>WNT2</i>
<i>AXIN1</i>	<i>CASP9</i>	<i>CTNNBIP1</i>	<i>FGF1</i>	<i>ILK</i>	<i>MEP1B</i>	<i>OTC</i>	<i>RASGRF2</i>	<i>TERC</i>	<i>WNT5A</i>
<i>AXIN2</i>	<i>CCND1</i>	<i>CUBN</i>	<i>FGF12</i>	<i>INSL4</i>	<i>MET</i>	<i>PALB2</i>	<i>RB1</i>	<i>TERT</i>	<i>WNT5B</i>
<i>BACH1</i>	<i>CDH1</i>	<i>CXCR4</i>	<i>FGF3</i>	<i>INSL6</i>	<i>MGAT3</i>	<i>PCNT</i>	<i>RHOA</i>	<i>THPO</i>	<i>WWOX</i>
<i>BACH1</i>	<i>CDH13</i>	<i>CXorf26</i>	<i>FGFR1</i>	<i>JMJD2B</i>	<i>MLH1</i>	<i>PDGF</i>	<i>ROBO1</i>	<i>TMEM123</i>	<i>XRCC4</i>
<i>BARD1</i>	<i>CDH2</i>	<i>CYP27A1</i>	<i>FGGY</i>	<i>KCNH8</i>	<i>MMP14</i>	<i>PGR</i>	<i>ROBO2</i>	<i>TMEM164</i>	<i>YAP</i>
<i>BCL2</i>	<i>CDK3</i>	<i>CYP3A4</i>	<i>FHIT</i>	<i>KDM6A</i>	<i>MMP2</i>	<i>PHGDH</i>	<i>RXRA</i>	<i>TMEM179B</i>	<i>ZCCHC9</i>
<i>BCL2L1</i>	<i>CDKN1C</i>	<i>CYP7A1</i>	<i>FOXMI</i>	<i>KIAA1012</i>	<i>MMP3</i>	<i>PIGK</i>	<i>S6K</i>	<i>TMEM223</i>	<i>ZNF217</i>
<i>BCMO1</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>DIP2A</i>	<i>GPC3</i>	<i>KIAA1797</i>	<i>MMP7</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>SCF</i>	<i>TNFA</i>	
<i>BIRC2</i>	<i>CDO1</i>	<i>DKK1</i>	<i>GPX1</i>	<i>KIT</i>	<i>MMP9</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>SERPINA6</i>	<i>TOP1</i>	

Referências Bibliográficas

_____. Cancer Statistics UK. 2014.

AGARWALA, S. Primary malignant liver tumors in children. **Indian J Pediatr.** v. 79, n. 6, p. 793-800, Jun 2012. Disponível em: PM:22382512.

ALEXANDROV, L. B.; NIK-ZAINAL, S.; WEDGE, D. C.; APARICIO, S. A.; BEHJATI, S.; BIANKIN, A. V.; BIGNELL, G. R.; BOLLI, N.; BORG, A.; BORRESEN-DALE, A. L.; BOYALT, S.; BURKHARDT, B.; BUTLER, A. P.; CALDAS, C.; DAVIES, H. R.; DESMEDT, C.; EILS, R.; EYFJORD, J. E.; FOEKENS, J. A.; GREAVES, M.; HOSODA, F.; HUTTER, B.; ILICIC, T.; IMBEAUD, S.; IMIELINSKI, M.; JAGER, N.; JONES, D. T.; JONES, D.; KNAPPSKOG, S.; KOOL, M.; LAKHANI, S. R.; LOPEZ-OTIN, C.; MARTIN, S.; MUNSHI, N. C.; NAKAMURA, H.; NORTHOTT, P. A.; PAJIC, M.; PAPAEMMANUIL, E.; PARADISO, A.; PEARSON, J. V.; PUENTE, X. S.; RAINE, K.; RAMAKRISHNA, M.; RICHARDSON, A. L.; RICHTER, J.; ROSENSTIEL, P.; SCHLESNER, M.; SCHUMACHER, T. N.; SPAN, P. N.; TEAGUE, J. W.; TOTOKI, Y.; TUTT, A. N.; VALDES-MAS, R.; VAN BUUREN, M. M.; VAN, '., V.; VINCENT-SALOMON, A.; WADDELL, N.; YATES, L. R.; ZUCMAN-ROSSI, J.; FUTREAL, P. A.; MCDERMOTT, U.; LICHTER, P.; MEYERSON, M.; GRIMMOND, S. M.; SIEBERT, R.; CAMPO, E.; SHIBATA, T.; PFISTER, S. M.; CAMPBELL, P. J. e STRATTON, M. R. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature** v. 500, n. 7463, p. 415-421, Aug 22 2013. Disponível em: PM:23945592.

ALI, W.; SAVASAN, S.; RABAH, R. e MOHAMED, A. N. Cytogenetic findings in two new cases of hepatoblastoma. **Cancer Genet Cytogenet** v. 133, n. 2, p. 179-182, Mar 2002. Disponível em: PM:11943350.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L. e ORNTOF, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Res** v. 64, n. 15, p. 5245-5250, Aug 1 2004. Disponível em: PM:15289330.

ANDERSON, L. M. Environmental genotoxins/carcinogens and childhood cancer: bridgeable gaps in scientific knowledge. **Mutat Res** v. 608, n. 2, p. 136-156, Sep 28 2006. Disponível em: PM:16829162.

ANDERSON, L. M.; DIWAN, B. A.; FEAR, N. T. e ROMAN, E. Critical windows of exposure for children's health: cancer in human epidemiological studies and neoplasms in experimental animal models. **Environ.Health Perspect.** v. 108 Suppl 3, p. 573-594, Jun 2000a. Disponível em: PM:10852857.

ANDERSON, L. M.; DIWAN, B. A.; FEAR, N. T. e ROMAN, E. Critical windows of exposure for children's health: cancer in human epidemiological studies and neoplasms in experimental animal models. **Environ.Health Perspect.** v. 108 Suppl 3, p. 573-594, Jun 2000b. Disponível em: PM:10852857.

ARAI, Y.; HONDA, S.; HARUTA, M.; KASAI, F.; FUJIWARA, Y.; OHSHIMA, J.; SASAKI, F.; NAKAGAWARA, A.; HORIE, H.; YAMAOKA, H.; HIYAMA, E. e KANEKO, Y. Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and MDM4 amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. **Genes Chromosomes Cancer** v. 49, n. 7, p. 596-609, Jul 2010. Disponível em: PM:20461752.

ARMENGOL, C.; CAIRO, S.; FABRE, M. e BUENDIA, M. A. Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: the hepatoblastoma model. **Int J Biochem.Cell Biol.** v. 43, n. 2, p. 265-270, Feb 2011. Disponível em: PM:19646548.

BABA, Y.; HUTTENHOWER, C.; NOSHO, K.; TANAKA, N.; SHIMA, K.; HAZRA, A.; SCHERNHAMMER, E. S.; HUNTER, D. J.; GIOVANNUCCI, E. L.; FUCHS, C. S. e OGINO, S. Epigenomic diversity of colorectal cancer indicated by LINE-1 methylation in a database of 869 tumors. **Mol Cancer** v. 9, p. 125, 2010. Disponível em: PM:20507599.

BABA, Y.; WATANABE, M.; MURATA, A.; SHIGAKI, H.; MIYAKE, K.; ISHIMOTO, T.; IWATSUKI, M.; IWAGAMI, S.; YOSHIDA, N.; OKI, E.; SAKAMAKI, K.; NAKAO, M. e BABA, H. LINE-1 hypomethylation, DNA copy number alterations, and CDK6 amplification in esophageal squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res** v. 20, n. 5, p. 1114-1124, Mar 1 2014. Disponível em: PM:24423610.

BALOGH, E.; SWANTON, S.; KISS, C.; JAKAB, Z. S.; SECKER-WALKER, L. M. e OLAH, E. Fluorescence in situ hybridization reveals trisomy 2q by insertion into 9p in hepatoblastoma. **Cancer Genet Cytogenet** v. 102, n. 2, p. 148-150, Apr 15 1998. Disponível em: PM:9546070.

BARDI, G.; JOHANSSON, B.; PANDIS, N.; HEIM, S.; MANDAH, N.; BEKASSY, A.; HAGERSTRAND, I. e MITELMAN, F. Trisomy 2 as the sole chromosomal abnormality in a hepatoblastoma. **Genes Chromosomes Cancer** v. 4, n. 1, p. 78-80, Jan 1992. Disponível em: PM:1377013.

BAYLIN, S. B. e JONES, P. A. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. **Nat Rev Cancer** v. 11, n. 10, p. 726-734, Oct 2011. Disponível em: PM:21941284.

BECK, C. R.; COLLIER, P.; MACFARLANE, C.; MALIG, M.; KIDD, J. M.; EICHLER, E. E.; BADGE, R. M. e MORAN, J. V. LINE-1 retrotransposition activity in human genomes. **Cell** v. 141, n. 7, p. 1159-1170, Jun 25 2010. Disponível em: PM:20602998.

BENJAMINI, Y. ; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. 57. 1995. cap. 1, p.289-300.

- BEROUKHIM, R.; MERMEL, C. H.; PORTER, D.; WEI, G.; RAYCHAUDHURI, S.; DONOVAN, J.; BARRETINA, J.; BOEHM, J. S.; DOBSON, J.; URASHIMA, M.; MC HENRY, K. T.; PINCHBACK, R. M.; LIGON, A. H.; CHO, Y. J.; HAERY, L.; GREULICH, H.; REICH, M.; WINCKLER, W.; LAWRENCE, M. S.; WEIR, B. A.; TANAKA, K. E.; CHIANG, D. Y.; BASS, A. J.; LOO, A.; HOFFMAN, C.; PRENSNER, J.; LIEFELD, T.; GAO, Q.; YECIES, D.; SIGNORETTI, S.; MAHER, E.; KAYE, F. J.; SASAKI, H.; TEPPER, J. E.; FLETCHER, J. A.; TABERNERO, J.; BASELGA, J.; TSAO, M. S.; DEMICHELIS, F.; RUBIN, M. A.; JANNE, P. A.; DALY, M. J.; NUCERA, C.; LEVINE, R. L.; EBERT, B. L.; GABRIEL, S.; RUSTGI, A. K.; ANTONESCU, C. R.; LADANYI, M.; LETAI, A.; GARRAWAY, L. A.; LODA, M.; BEER, D. G.; TRUE, L. D.; OKAMOTO, A.; POMEROY, S. L.; SINGER, S.; GOLUB, T. R.; LANDER, E. S.; GETZ, G.; SELLERS, W. R. e MEYERSON, M. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. **Nature** v. 463, n. 7283, p. 899-905, Feb 18 2010. Disponível em: PM:20164920.
- BOZIC, I.; ANTAL, T.; OHTSUKI, H.; CARTER, H.; KIM, D.; CHEN, S.; KARCHIN, R.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. e NOWAK, M. A. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. **Proc Natl Acad Sci U S A** v. 107, n. 43, p. 18545-18550, Oct 26 2010. Disponível em: PM:20876136.
- BRANCO, M. R.; FICZ, G. e REIK, W. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. **Nat Rev Genet** v. 13, n. 1, p. 7-13, Jan 2012. Disponível em: PM:22083101.
- BUNIN, G. R. Nongenetic causes of childhood cancers: evidence from international variation, time trends, and risk factor studies. **Toxicol.Appl Pharmacol.** v. 199, n. 2, p. 91-103, Sep 1 2004. Disponível em: PM:15313582.
- CADIEUX, B.; CHING, T. T.; VANDENBERG, S. R. e COSTELLO, J. F. Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation. **Cancer Res** v. 66, n. 17, p. 8469-8476, Sep 1 2006. Disponível em: PM:16951158.
- CAIRO, S.; ARMENGOL, C. e BUENDIA, M. A. Activation of Wnt and Myc signaling in hepatoblastoma. **Front Biosci.(Elite.Ed)** v. 4, p. 480-486, 2012. Disponível em: PM:22201888.
- CAIRO, S.; ARMENGOL, C.; DE, R. A.; WEI, Y.; THOMAS, E.; RENARD, C. A.; GOGA, A.; BALAKRISHNAN, A.; SEMERARO, M.; GRESH, L.; PONTOLIO, M.; STRICK-MARCHAND, H.; LEVILLAYER, F.; NOUET, Y.; RICKMAN, D.; GAUTHIER, F.; BRANCHEREAU, S.; BRUGIERES, L.; LAITHIER, V.; BOUVIER, R.; BOMAN, F.; BASSO, G.; MICHIELS, J. F.; HOFMAN, P.; ARBEZ-GINDRE, F.; JOUAN, H.; ROUSSELET-CHAPEAU, M. C.; BERREBI, D.; MARCELLIN, L.; PLENAT, F.; ZACHAR, D.; JOUBERT, M.; SELVES, J.; PASQUIER, D.; BIOULAC-SAGE, P.; GROTZER, M.; CHILDS, M.; FABRE, M. e BUENDIA, M. A. Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer. **Cancer Cell** v. 14, n. 6, p. 471-484, Dec 9 2008. Disponível em: PM:19061838.
- CALL, K. M.; GLASER, T.; ITO, C. Y.; BUCKLER, A. J.; PELLETIER, J.; HABER, D. A.; ROSE, E. A.; KRAL, A.; YEGER, H.; LEWIS, W. H. e . Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. **Cell** v. 60, n. 3, p. 509-520, Feb 9 1990. Disponível em: PM:2154335.
- CANNITO, S.; NOVO, E.; DI BONZO, L. V.; BUSLETTA, C.; COLOMBATTO, S. e PAROLA, M. Epithelial-mesenchymal transition: from molecular mechanisms, redox regulation to implications in human health and disease. **Antioxid.Redox.Signal.** v. 12, n. 12, p. 1383-1430, Jun 15 2010. Disponível em: PM:19903090.
- CHATTERJEE, R. e VINSON, C. CpG methylation recruits sequence specific transcription factors essential for tissue specific gene expression. **Biochim.Biophys.Acta** v. 1819, n. 7, p. 763-770, Jul 2012. Disponível em: PM:22387149.
- CHEN, R. Z.; PETTERSSON, U.; BEARD, C.; JACKSON-GRUSBY, L. e JAENISCH, R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. **Nature** v. 395, n. 6697, p. 89-93, Sep 3 1998. Disponível em: PM:9738504.
- CHODAVARAPU, R. K.; FENG, S.; BERNATAVICHUTE, Y. V.; CHEN, P. Y.; STROUD, H.; YU, Y.; HETZEL, J. A.; KUO, F.; KIM, J.; COKUS, S. J.; CASERO, D.; BERNAL, M.; HUIJSER, P.; CLARK, A. T.; KRAMER, U.; MERCHANT, S. S.; ZHANG, X.; JACOBSEN, S. E. e PELLEGRINI, M. Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. **Nature** v. 466, n. 7304, p. 388-392, Jul 15 2010. Disponível em: PM:20512117.
- CIENTFUEGOS, J. A.; LABIANO, T.; PEDANO, N.; ZOZAYA, G. N.; MARTI-CRUCHAGA, P.; PANIZO, A. e ROTELLAR, F. Adult hepatoblastoma. **Rev Esp.Enferm Dig.** v. 105, n. 4, p. 229-231, Apr 2013. Disponível em: PM:23859453.
- COCK, P. J.; FIELDS, C. J.; GOTO, N.; HEUER, M. L. e RICE, P. M. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. **Nucleic Acids Res.** v. 38, n. 6, p. 1767-1771, Apr 2010. Disponível em: PM:20015970.
- CONRAD, D. F.; PINTO, D.; REDON, R.; FEUK, L.; GOKCUMEN, O.; ZHANG, Y.; AERTS, J.; ANDREWS, T. D.; BARNES, C.; CAMPBELL, P.; FITZGERALD, T.; HU, M.; IHM, C. H.; KRISTIANSSON, K.; MACARTHUR, D. G.; MACDONALD, J. R.; ONYIAH, I.; PANG, A. W.; ROBSON, S.; STIRRUPS, K.; VALSesia, A.; WALTER, K.; WEI, J.; TYLER-SMITH, C.; CARTER, N. P.; LEE, C.; SCHERER, S. W. e HURLES, M. E. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. **Nature** v. 464, n. 7289, p. 704-712, Apr 1 2010. Disponível em: PM:19812545.
- COPELAND, N. G. e JENKINS, N. A. Deciphering the genetic landscape of cancer--from genes to pathways. **Trends Genet.** v. 25, n. 10, p. 455-462, Oct 2009. Disponível em: PM:19818523.

- COSTA, J. L.; MEIJER, G.; YLSTRA, B. e CALDAS, C. Array comparative genomic hybridization copy number profiling: a new tool for translational research in solid malignancies. **Semin.Radiat.Oncol** v. 18, n. 2, p. 98-104, Apr 2008. Disponível em: PM:18314064.
- COWELL, J. K. e HOGG, A. Genetics and cytogenetics of retinoblastoma. **Cancer Genet Cytogenet** v. 64, n. 1, p. 1-11, Nov 1992. Disponível em: PM:1458443.
- CURIA, M. C.; ZUCKERMANN, M.; DE, L. L.; CATALANO, T.; LATTANZIO, R.; ACETO, G.; VESCHI, S.; CAMA, A.; OTTE, J. B.; PIANTELLI, M.; MARIANI-COSTANTINI, R.; CETTA, F. e BATTISTA, P. Sporadic childhood hepatoblastomas show activation of beta-catenin, mismatch repair defects and p53 mutations. **Mod.Pathol** v. 21, n. 1, p. 7-14, Jan 2008. Disponível em: PM:17962810.
- CURRALL, B. B.; CHIANG, C.; TALKOWSKI, M. E. e MORTON, C. C. Mechanisms for Structural Variation in the Human Genome. **Curr.Genet Med Rep.** v. 1, n. 2, p. 81-90, Jun 1 2013. Disponível em: PM:23730541.
- CZAUDERNA, P. Hepatoblastoma throughout SIOPEL trials - clinical lessons learnt. **Front Biosci.(Elite.Ed)** v. 4, p. 470-479, 2012. Disponível em: PM:22201887.
- CZAUDERNA, P.; LOPEZ-TERRADA, D.; HIYAMA, E.; HABERLE, B.; MALOGOLOWKIN, M. H. e MEYERS, R. L. Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy. **Curr.Opin.Pediatr.** v. 26, n. 1, p. 19-28, Feb 2014. Disponível em: PM:24322718.
- DAVENPORT, K. P.; BLANCO, F. C. e SANDLER, A. D. Pediatric malignancies: neuroblastoma, Wilm's tumor, hepatoblastoma, rhabdomyosarcoma, and sacrococcygeal teratoma. **Surg.Clin North Am** v. 92, n. 3, p. 745-67, x, Jun 2012a. Disponível em: PM:22595719.
- DAVENPORT, K. P.; BLANCO, F. C. e SANDLER, A. D. Pediatric malignancies: neuroblastoma, Wilm's tumor, hepatoblastoma, rhabdomyosarcoma, and sacrococcygeal teratoma. **Surg.Clin North Am** v. 92, n. 3, p. 745-67, x, Jun 2012b. Disponível em: PM:22595719.
- DAVID, H. Rudolf Virchow and modern aspects of tumor pathology. **Pathol Res Pract.** v. 183, n. 3, p. 356-364, Jun 1988. Disponível em: PM:3047716.
- DE CAMARGO, B.; DE OLIVEIRA, S. M.; REBELO, M. S.; DE SOUZA, R. R.; FERMAN, S.; NORONHA, C. P. e POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: first report of 14 population-based cancer registries. **Int J Cancer** v. 126, n. 3, p. 715-720, Feb 1 2010. Disponível em: PM:19642142.
- DE, C. B.; DE OLIVEIRA FERREIRA, J. M.; DE SOUZA, R. R.; FERMAN, S.; DE OLIVEIRA, S. M. e POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. Socioeconomic status and the incidence of non-central nervous system childhood embryonic tumours in Brazil. **BMC Cancer** v. 11, p. 160, 2011. Disponível em: PM:21545722.
- DE, I. M.; BRUGIERES, L.; ZIMMERMANN, A.; KEELING, J.; BROCK, P.; MAIBACH, R.; PRITCHARD, J.; SHAFFORD, L.; ZSIROS, J.; CZAUDERNA, P. e PERILONGO, G. Hepatoblastoma with a low serum alpha-fetoprotein level at diagnosis: the SIOPEL group experience. **Eur.J Cancer** v. 44, n. 4, p. 545-550, Mar 2008. Disponível em: PM:18166449.
- DEHNER, L. P. The evolution of the diagnosis and understanding of primitive and embryonic neoplasms in children: living through an epoch. **Mod.Pathol** v. 11, n. 7, p. 669-685, Jul 1998. Disponível em: PM:9688189.
- DEPRISTO, M. A.; BANKS, E.; POPLIN, R.; GARIMELLA, K. V.; MAGUIRE, J. R.; HARTL, C.; PHILIPPAKIS, A. A.; DEL, A. G.; RIVAS, M. A.; HANNA, M.; MCKENNA, A.; FENNELL, T. J.; KERNYTSKY, A. M.; SIVACHENKO, A. Y.; CIBULSKIS, K.; GABRIEL, S. B.; ALTSHULER, D. e DALY, M. J. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. **Nat Genet** v. 43, n. 5, p. 491-498, May 2011. Disponível em: PM:21478889.
- DING, L.; WENDL, M. C.; KOBOLDT, D. C. e MARDIS, E. R. Analysis of next-generation genomic data in cancer: accomplishments and challenges. **Hum.Mol.Genet.** v. 19, n. R2, p. R188-R196, Oct 15 2010. Disponível em: PM:20843826.
- EICHENMULLER, M.; GRUNER, I.; HAGL, B.; HABERLE, B.; MULLER-HOCKER, J.; VON, S. D. e KAPPLER, R. Blocking the hedgehog pathway inhibits hepatoblastoma growth. **Hepatology** v. 49, n. 2, p. 482-490, Feb 2009. Disponível em: PM:19177589.
- EICHENMULLER, M.; TRIPPEL, F.; KREUDER, M.; BECK, A.; SCHWARZMAYR, T.; HABERLE, B.; CAIRO, S.; LEUSCHNER, I.; VON, S. D.; STROM, T. M. e KAPPLER, R. The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies with HCC-like features. **J Hepatol.** Aug 15 2014. Disponível em: PM:25135868.
- EMRE, S.; UMMAN, V. e RODRIGUEZ-DAVALOS, M. Current concepts in pediatric liver tumors. **Pediatr.Transplant.** v. 16, n. 6, p. 549-563, Sep 2012a. Disponível em: PM:22554057.
- EMRE, S.; UMMAN, V. e RODRIGUEZ-DAVALOS, M. Current concepts in pediatric liver tumors. **Pediatr.Transplant.** v. 16, n. 6, p. 549-563, Sep 2012b. Disponível em: PM:22554057.

- ERIKSSON, T.; FRISK, T.; GRAY, S. G.; VON, S. D.; PIETSCH, T.; LARSSON, C.; SANDSTEDT, B. e EKSTROM, T. J. Methylation changes in the human IGF2 p3 promoter parallel IGF2 expression in the primary tumor, established cell line, and xenograft of a human hepatoblastoma. **Exp.Cell Res** v. 270, n. 1, p. 88-95, Oct 15 2001. Disponível em: PM:11597130.
- ESTELLER, M.; CORN, P. G.; BAYLIN, S. B. e HERMAN, J. G. A gene hypermethylation profile of human cancer. **Cancer Res** v. 61, n. 8, p. 3225-3229, Apr 15 2001. Disponível em: PM:11309270.
- ESTIVILL, X. e ARMENGOL, L. Copy number variants and common disorders: filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies. **PLoS Genet** v. 3, n. 10, p. 1787-1799, Oct 2007. Disponível em: PM:17953491.
- EVANS, D. M. e PURCELL, S. Power calculations in genetic studies. **Cold Spring Harb.Protoc.** v. 2012, n. 6, p. 664-674, Jun 2012. Disponível em: PM:22661434.
- FEINBERG, A. P.; GEHRKE, C. W.; KUO, K. C. e EHRLICH, M. Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. **Cancer Res** v. 48, n. 5, p. 1159-1161, Mar 1 1988. Disponível em: PM:3342396.
- FEINBERG, A. P.; OHLSSON, R. e HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nat.Rev.Genet.** v. 7, n. 1, p. 21-33, Jan 2006. Disponível em: PM:16369569.
- FEINBERG, A. P. e TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nat Rev Cancer** v. 4, n. 2, p. 143-153, Feb 2004. Disponível em: PM:14732866.
- FEINBERG, A. P. e VOGELSTEIN, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. **Nature** v. 301, n. 5895, p. 89-92, Jan 6 1983. Disponível em: PM:6185846.
- FICZ, G.; BRANCO, M. R.; SEISENBERGER, S.; SANTOS, F.; KRUEGER, F.; HORE, T. A.; MARQUES, C. J.; ANDREWS, S. e REIK, W. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. **Nature** v. 473, n. 7347, p. 398-402, May 19 2011. Disponível em: PM:21460836.
- FINEGOLD, M. J.; LOPEZ-TERRADA, D. H.; BOWEN, J.; WASHINGTON, M. K. e QUALMAN, S. J. Protocol for the examination of specimens from pediatric patients with hepatoblastoma. **Arch.Pathol Lab Med** v. 131, n. 4, p. 520-529, Apr 2007. Disponível em: PM:17425379.
- FORBES, S. A.; BINDAL, N.; BAMFORD, S.; COLE, C.; KOK, C. Y.; BEARE, D.; JIA, M.; SHEPHERD, R.; LEUNG, K.; MENZIES, A.; TEAGUE, J. W.; CAMPBELL, P. J.; STRATTON, M. R. e FUTREAL, P. A. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. **Nucleic Acids Res** v. 39, n. Database issue, p. D945-D950, Jan 2011. Disponível em: PM:20952405.
- FOUSE, S. D.; NAGARAJAN, R. O. e COSTELLO, J. F. Genome-scale DNA methylation analysis. **Epigenomics.** v. 2, n. 1, p. 105-117, Feb 2010. Disponível em: PM:20657796.
- FUJITA, A.; OCHI, N.; FUJIMAKI, H.; MURAMATSU, H.; TAKAHASHI, Y.; NATSUME, J.; KOJIMA, S.; NAKASHIMA, M.; TSURUSAKI, Y.; SAITSU, H.; MATSUMOTO, N. e MIYAKE, N. A novel WTX mutation in a female patient with osteopathia striata with cranial sclerosis and hepatoblastoma. **Am J Med Genet A** Jan 23 2014. Disponível em: PM:24459086.
- FUKUZAWA, R.; UMEZAWA, A.; OCHI, K.; URANO, F.; IKEDA, H. e HATA, J. High frequency of inactivation of the imprinted H19 gene in "sporadic" hepatoblastoma. **Int J Cancer** v. 82, n. 4, p. 490-497, Aug 12 1999. Disponível em: PM:10404060.
- FULLWOOD, M. J.; WEI, C. L.; LIU, E. T. e RUAN, Y. Next-generation DNA sequencing of paired-end tags (PET) for transcriptome and genome analyses. **Genome Res** v. 19, n. 4, p. 521-532, Apr 2009. Disponível em: PM:19339662.
- GAMA-SOSA, M. A.; SLAGEL, V. A.; TREWYN, R. W.; OXENHANDLER, R.; KUO, K. C.; GEHRKE, C. W. e EHRLICH, M. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. **Nucleic Acids Res** v. 11, n. 19, p. 6883-6894, Oct 11 1983. Disponível em: PM:6314264.
- GOVINDAN, R.; DING, L.; GRIFFITH, M.; SUBRAMANIAN, J.; DEES, N. D.; KANCHI, K. L.; MAHER, C. A.; FULTON, R.; FULTON, L.; WALLIS, J.; CHEN, K.; WALKER, J.; MCDONALD, S.; BOSE, R.; ORNITZ, D.; XIONG, D.; YOU, M.; DOOLING, D. J.; WATSON, M.; MARDIS, E. R. e WILSON, R. K. Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. **Cell** v. 150, n. 6, p. 1121-1134, Sep 14 2012. Disponível em: PM:22980976.
- GRAY, S. G.; ERIKSSON, T.; EKSTROM, C.; HOLM, S.; VON, S. D.; KOGNER, P.; SANDSTEDT, B.; PIETSCH, T. e EKSTROM, T. J. Altered expression of members of the IGF-axis in hepatoblastomas. **Br J Cancer** v. 82, n. 9, p. 1561-1567, May 2000a. Disponível em: PM:10789725.
- GRAY, S. G.; KYTOLA, S.; MATSUNAGA, T.; LARSSON, C. e EKSTROM, T. J. Comparative genomic hybridization reveals population-based genetic alterations in hepatoblastomas. **Br J Cancer** v. 83, n. 8, p. 1020-1025, Oct 2000b. Disponível em: PM:10993649.

- GREENMAN, C.; STEPHENS, P.; SMITH, R.; DALGLIESH, G. L.; HUNTER, C.; BIGNELL, G.; DAVIES, H.; TEAGUE, J.; BUTLER, A.; STEVENS, C.; EDKINS, S.; O'MEARA, S.; VASTRIK, I.; SCHMIDT, E. E.; AVIS, T.; BARTHORPE, S.; BHAMRA, G.; BUCK, G.; CHOUDHURY, B.; CLEMENTS, J.; COLE, J.; DICKS, E.; FORBES, S.; GRAY, K.; HALLIDAY, K.; HARRISON, R.; HILLS, K.; HINTON, J.; JENKINSON, A.; JONES, D.; MENZIES, A.; MIRONENKO, T.; PERRY, J.; RAINE, K.; RICHARDSON, D.; SHEPHERD, R.; SMALL, A.; TOFTS, C.; VARIAN, J.; WEBB, T.; WEST, S.; WIDAA, S.; YATES, A.; CAHILL, D. P.; LOUIS, D. N.; GOLDSTRAW, P.; NICHOLSON, A. G.; BRASSEUR, F.; LOOIJENGA, L.; WEBER, B. L.; CHIEW, Y. E.; DEFAZIO, A.; GREAVES, M. F.; GREEN, A. R.; CAMPBELL, P.; BIRNEY, E.; EASTON, D. F.; CHENEVIX-TRENCH, G.; TAN, M. H.; KHOO, S. K.; TEH, B. T.; YUEN, S. T.; LEUNG, S. Y.; WOOSTER, R.; FUTREAL, P. A. e STRATTON, M. R. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. **Nature** v. 446, n. 7132, p. 153-158, Mar 8 2007. Disponível em: PM:17344846.
- GROSFELD, J. L. Risk-based management: current concepts of treating malignant solid tumors of childhood. **J Am Coll.Surg.** v. 189, n. 4, p. 407-425, Oct 1999. Disponível em: PM:10509467.
- GRYFE, R. e GALLINGER, S. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and colorectal cancer. **Surgery** v. 130, n. 1, p. 17-20, Jul 2001. Disponível em: PM:11436007.
- GUMULEC, J.; RAUDENSKA, M.; ADAM, V.; KIZEK, R. e MASARIK, M. Metallothionein - immunohistochemical cancer biomarker: a meta-analysis. **PLoS One**. v. 9, n. 1, p. e85346, 2014. Disponível em: PM:24416395.
- GUPTA, A.; SHERIDAN, R. M.; TOWBIN, A.; GELLER, J. I.; TIAO, G. e BOVE, K. E. Multifocal hepatic neoplasia in 3 children with APC gene mutation. **Am J Surg.Pathol** v. 37, n. 7, p. 1058-1066, Jul 2013. Disponível em: PM:23715166.
- HABER, D. A. e SETTLEMAN, J. Cancer: drivers and passengers. **Nature** v. 446, n. 7132, p. 145-146, Mar 8 2007. Disponível em: PM:17344839.
- HAIG, D. The (dual) origin of epigenetics. **Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.** v. 69, p. 67-70, 2004. Disponível em: PM:16117634.
- HAN, L.; SU, B.; LI, W. H. e ZHAO, Z. CpG island density and its correlations with genomic features in mammalian genomes. **Genome Biol.** v. 9, n. 5, p. R79, 2008. Disponível em: PM:18477403.
- HANAHAN, D. e WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell** v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000. Disponível em: PM:10647931.
- HANAHAN, D. e WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** v. 144, n. 5, p. 646-674, Mar 4 2011. Disponível em: PM:21376230.
- HARADA, K.; TOYOOKA, S.; MAITRA, A.; MARUYAMA, R.; TOYOOKA, K. O.; TIMMONS, C. F.; TOMLINSON, G. E.; MASTRANGELO, D.; HAY, R. J.; MINNA, J. D. e GAZDAR, A. F. Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines. **Oncogene** v. 21, n. 27, p. 4345-4349, Jun 20 2002. Disponível em: PM:12082624.
- HARTMANN, W.; KUCHLER, J.; KOCH, A.; FRIEDRICHS, N.; WAHA, A.; ENDL, E.; CZERWITZKI, J.; METZGER, D.; STEINER, S.; WURST, P.; LEUSCHNER, I.; VON, S. D.; BUETTNER, R. e PIETSCH, T. Activation of phosphatidylinositol-3'-kinase/AKT signaling is essential in hepatoblastoma survival. **Clin Cancer Res** v. 15, n. 14, p. 4538-4545, Jul 15 2009. Disponível em: PM:19584164.
- HATTORI, K.; ANGEL, P.; LE BEAU, M. M. e KARIN, M. Structure and chromosomal localization of the functional intronless human JUN protooncogene. **Proc Natl Acad Sci U S A** v. 85, n. 23, p. 9148-9152, Dec 1988. Disponível em: PM:3194415.
- HECK, J. E.; MEYERS, T. J.; LOMBARDI, C.; PARK, A. S.; COCKBURN, M.; REYNOLDS, P. e RITZ, B. Case-control study of birth characteristics and the risk of hepatoblastoma. **Cancer Epidemiol.** v. 37, n. 4, p. 390-395, Aug 2013. Disponível em: PM:23558166.
- HENRIQUE, R.; JERONIMO, C.; HOQUE, M. O.; NOMOTO, S.; CARVALHO, A. L.; COSTA, V. L.; OLIVEIRA, J.; TEIXEIRA, M. R.; LOPES, C. e SIDRANSKY, D. MT1G hypermethylation is associated with higher tumor stage in prostate cancer. **Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.** v. 14, n. 5, p. 1274-1278, May 2005. Disponível em: PM:15894685.
- HENRYK DANCYGIER. **Malformations and Malpositions of the Liver**. Clinical Hepatology. 2010.
- HERZOG, C. E.; ANDRASSY, R. J. e EFTEKHARI, F. Childhood cancers: hepatoblastoma. **Oncologist**. v. 5, n. 6, p. 445-453, 2000. Disponível em: PM:11110595.
- HOLLAND, A. J. e CLEVELAND, D. W. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 10, n. 7, p. 478-487, Jul 2009. Disponível em: PM:19546858.
- HONDA, S.; ARAI, Y.; HARUTA, M.; SASAKI, F.; OHIRA, M.; YAMAOKA, H.; HORIE, H.; NAKAGAWARA, A.; HIYAMA, E.; TODO, S. e KANEKO, Y. Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypermethylation of the H19 differentially methylated region in hepatoblastoma. **Br J Cancer** v. 99, n. 11, p. 1891-1899, Dec 2 2008a. Disponível em: PM:19034281.

HONDA, S.; HARUTA, M.; SUGAWARA, W.; SASAKI, F.; OHIRA, M.; MATSUNAGA, T.; YAMAOKA, H.; HORIE, H.; OHNUMA, N.; NAKAGAWARA, A.; HIYAMA, E.; TODO, S. e KANEKO, Y. The methylation status of RASSF1A promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients. **Int J Cancer** v. 123, n. 5, p. 1117-1125, Sep 1 2008b. Disponível em: PM:18537155.

HONDA, S.; MIYAGI, H.; SUZUKI, H.; MINATO, M.; HARUTA, M.; KANEKO, Y.; HATANAKA, K. C.; HIYAMA, E.; KAMIJO, T.; OKADA, T. e TAKETOMI, A. RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients. **Pediatr.Surg.Int** v. 29, n. 11, p. 1147-1152, Nov 2013. Disponível em: PM:23989600.

HOVESTADT, V.; JONES, D. T.; PICELLI, S.; WANG, W.; KOOL, M.; NORTHCOTT, P. A.; SULTAN, M.; STACHURSKI, K.; RYZHOVA, M.; WARNATZ, H. J.; RALSER, M.; BRUN, S.; BUNT, J.; JAGER, N.; KLEINHEINZ, K.; ERKEK, S.; WEBER, U. D.; BARTHOLOMAE, C. C.; VON, K. C.; LAWRENZ, C.; EILS, J.; KOSTER, J.; VERSTEEG, R.; MILDE, T.; WITT, O.; SCHMIDT, S.; WOLF, S.; PIETSCH, T.; RUTKOWSKI, S.; SCHEURLEN, W.; TAYLOR, M. D.; BRORS, B.; FELSBURG, J.; REIFENBERGER, G.; BORKHARDT, A.; LEHRACH, H.; WECHSLER-REYA, R. J.; EILS, R.; YASPO, M. L.; LANDGRAF, P.; KORSHUNOV, A.; ZAPATKA, M.; RADLWIMMER, B.; PFISTER, S. M. e LICHTER, P. Decoding the regulatory landscape of medulloblastoma using DNA methylation sequencing. **Nature** May 18 2014. Disponível em: PM:24847876.

HOWLADER, N.; NOONE A.M.; KRAPCHO, M.; NEYMAN, M.; e AMINOU, R. **SEER cancer statistics review, 1975–2008**. Bethesda, MD, 2011. Disponível em: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/.

HU, J.; WILLS, M.; BAKER, B. A. e PERLMAN, E. J. Comparative genomic hybridization analysis of hepatoblastomas. **Genes Chromosomes Cancer** v. 27, n. 2, p. 196-201, Feb 2000. Disponível em: PM:10612809.

HUANG, S. e INGBER, D. E. A non-genetic basis for cancer progression and metastasis: self-organizing attractors in cell regulatory networks. **Breast Dis** v. 26, p. 27-54, 2006. Disponível em: PM:17473364.

HUANG, Y.; PASTOR, W. A.; SHEN, Y.; TAHILIANI, M.; LIU, D. R. e RAO, A. The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. **PLoS One**. v. 5, n. 1, p. e8888, 2010. Disponível em: PM:20126651.

IAFRATE, A. J.; FEUK, L.; RIVERA, M. N.; LISTEWNICK, M. L.; DONAHOE, P. K.; QI, Y.; SCHERER, S. W. e LEE, C. Detection of large-scale variation in the human genome. **Nat Genet** v. 36, n. 9, p. 949-951, Sep 2004. Disponível em: PM:15286789.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014. ISBN 978-85-7318-237-8.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Câncer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade. Brasil. Ministério da Saúde.**, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil.**, 2009.

ISAACS, H., Jr. Fetal and neonatal hepatic tumors. **J Pediatr.Surg.** v. 42, n. 11, p. 1797-1803, Nov 2007a. Disponível em: PM:18022426.

ISAACS, H., Jr. Fetal and neonatal hepatic tumors. **J.Pediatr.Surg.** v. 42, n. 11, p. 1797-1803, Nov 2007b. Disponível em: PM:18022426.

ISRAEL, M. A. Molecular origins of pediatric embryonal tumors. **Cancer Cells** v. 3, n. 5, p. 193-194, May 1991. Disponível em: PM:1679994.

JIA, D.; DONG, R.; JING, Y.; XU, D.; WANG, Q.; CHEN, L.; LI, Q.; HUANG, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Z.; LIU, L.; ZHENG, S.; XIA, Q.; WANG, H.; DONG, K. e HE, X. Exome sequencing of hepatoblastoma reveals novel mutations and cancer genes in the Wnt pathway and ubiquitin ligase complex. **Hepatology** Jun 9 2014. Disponível em: PM:24912477.

JOHNSON, K. J.; WILLIAMS, K. S.; ROSS, J. A.; KRAILO, M. D.; TOMLINSON, G. E.; MALOGOLOWKIN, M. H.; FEUSNER, J. H. e SPECTOR, L. G. Parental tobacco and alcohol use and risk of hepatoblastoma in offspring: a report from the children's oncology group. **Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.** v. 22, n. 10, p. 1837-1843, Oct 2013. Disponível em: PM:23950215.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nat Rev Genet** v. 13, n. 7, p. 484-492, Jul 2012. Disponível em: PM:22641018.

JONES, P. A. e BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat.Rev.Genet.** v. 3, n. 6, p. 415-428, Jun 2002. Disponível em: PM:12042769.

KALLIONIEMI, A.; KALLIONIEMI, O. P.; SUDAR, D.; RUTOVITZ, D.; GRAY, J. W.; WALDMAN, F. e PINKEL, D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. **Science** v. 258, n. 5083, p. 818-821, Oct 30 1992. Disponível em: PM:1359641.

- KANDA, M.; NOMOTO, S.; OKAMURA, Y.; NISHIKAWA, Y.; SUGIMOTO, H.; KANAZUMI, N.; TAKEDA, S. e NAKAO, A. Detection of metallothionein 1G as a methylated tumor suppressor gene in human hepatocellular carcinoma using a novel method of double combination array analysis. **Int J Oncol** v. 35, n. 3, p. 477-483, Sep 2009. Disponível em: PM:19639168.
- KHO, A. T.; ZHAO, Q.; CAI, Z.; BUTTE, A. J.; KIM, J. Y.; POMEROY, S. L.; ROWITCH, D. H. e KOHANE, I. S. Conserved mechanisms across development and tumorigenesis revealed by a mouse development perspective of human cancers. **Genes Dev** v. 18, n. 6, p. 629-640, Mar 15 2004. Disponível em: PM:15075291.
- KINGSTON, J. E.; HERBERT, A.; DRAPER, G. J. e MANN, J. R. Association between hepatoblastoma and polyposis coli. **Arch.Dis.Child** v. 58, n. 12, p. 959-962, Dec 1983. Disponível em: PM:6318669.
- KITKUMTHORN, N. e MUTIRANGURA, A. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications. **Clin Epigenetics** v. 2, n. 2, p. 315-330, Aug 2011. Disponível em: PM:22704344.
- KNUDSON, A. G. Chasing the cancer demon. **Annu Rev Genet** v. 34, p. 1-19, 2000. Disponível em: PM:11092820.
- KOBOLDT, D. C.; STEINBERG, K. M.; LARSON, D. E.; WILSON, R. K. e MARDIS, E. R. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. **Cell** v. 155, n. 1, p. 27-38, Sep 26 2013. Disponível em: PM:24074859.
- KOCH, A.; DENKHAUS, D.; ALBRECHT, S.; LEUSCHNER, I.; VON, S. D. e PIETSCH, T. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. **Cancer Res** v. 59, n. 2, p. 269-273, Jan 15 1999. Disponível em: PM:9927029.
- KOCH, A.; WEBER, N.; WAHA, A.; HARTMANN, W.; DENKHAUS, D.; BEHRENS, J.; BIRCHMEIER, W.; VON, S. D. e PIETSCH, T. Mutations and elevated transcriptional activity of conductin (AXIN2) in hepatoblastomas. **J Pathol** v. 204, n. 5, p. 546-554, Dec 2004. Disponível em: PM:15538750.
- KOSAKI, R.; TAKENOUCHI, T.; TAKEDA, N.; KAGAMI, M.; NAKABAYASHI, K.; HATA, K. e KOSAKI, K. Somatic CTNNB1 mutation in hepatoblastoma from a patient with Simpson-Golabi-Beckel syndrome and germline GPC3 mutation. **Am J Med Genet A** Jan 23 2014. Disponível em: PM:24459012.
- KUMAR, P.; HENIKOFF, S. e NG, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. **Nat Protoc** v. 4, n. 7, p. 1073-1081, 2009. Disponível em: PM:19561590.
- KUMON, K.; KOBAYASHI, H.; NAMIKI, T.; TSUNEMATSU, Y.; MIYAUCHI, J.; KIKUTA, A.; HORIKOSHI, Y.; KOMADA, Y.; HATAE, Y.; EGUCHI, H. e KANEKO, Y. 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. **Jpn.J Cancer Res** v. 92, n. 8, p. 854-862, Aug 2001a. Disponível em: PM:11509117.
- KUMON, K.; KOBAYASHI, H.; NAMIKI, T.; TSUNEMATSU, Y.; MIYAUCHI, J.; KIKUTA, A.; HORIKOSHI, Y.; KOMADA, Y.; HATAE, Y.; EGUCHI, H. e KANEKO, Y. 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. **Jpn.J Cancer Res** v. 92, n. 8, p. 854-862, Aug 2001b. Disponível em: PM:11509117.
- LEMAIGRE, F. e ZARET, K. S. Liver development update: new embryo models, cell lineage control, and morphogenesis. **Curr.Opin.Genet.Dev.** v. 14, n. 5, p. 582-590, Oct 2004. Disponível em: PM:15380251.
- LEMAIGRE, F. P. Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies. **Gastroenterology** v. 137, n. 1, p. 62-79, Jul 2009. Disponível em: PM:19328801.
- LI, H. e DURBIN, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics** v. 26, n. 5, p. 589-595, Mar 1 2010. Disponível em: PM:20080505.
- LI, H. e HOMER, N. A survey of sequence alignment algorithms for next-generation sequencing. **Brief.Bioinform.** v. 11, n. 5, p. 473-483, Sep 2010. Disponível em: PM:20460430.
- LI, J.; VESTERGAARD, M.; OBEL, C.; CNATTINGUS, S.; GISSLER, M.; AHRENSBERG, J. e OLSEN, J. Antenatal maternal bereavement and childhood cancer in the offspring: a population-based cohort study in 6 million children. **Br J Cancer** v. 107, n. 3, p. 544-548, Jul 24 2012. Disponível em: PM:22759879.
- LI, W.; KESSLER, P. e WILLIAMS, B. R. Transcript profiling of Wilms tumors reveals connections to kidney morphogenesis and expression patterns associated with anaplasia. **Oncogene** v. 24, n. 3, p. 457-468, Jan 13 2005. Disponível em: PM:15531917.
- LISTER, R.; PELIZZOLA, M.; DOWEN, R. H.; HAWKINS, R. D.; HON, G.; TONTI-FILIPPINI, J.; NERY, J. R.; LEE, L.; YE, Z.; NGO, Q. M.; EDSALL, L.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; STEWART, R.; RUOTTI, V.; MILLAR, A. H.; THOMSON, J. A.; REN, B. e ECKER, J. R. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **Nature** v. 462, n. 7271, p. 315-322, Nov 19 2009. Disponível em: PM:19829295.

- LIU, C.; MA, Z.; HOU, J.; ZHANG, H.; LIU, R.; WU, W.; LIU, W. e LU, Y. Germline traits of human hepatoblastoma cells associated with growth and metastasis. **Biochem.Biophys.Res Commun.** v. 437, n. 1, p. 120-126, Jul 19 2013. Disponível em: PM:23800414.
- LIU, X.; WANG, J. e CHEN, L. Whole-exome sequencing reveals recurrent somatic mutation networks in cancer. **Cancer Lett.** v. 340, n. 2, p. 270-276, Nov 1 2013. Disponível em: PM:23153794.
- LIVAK, K. J. e SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. **Methods** v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001. Disponível em: PM:11846609.
- LUGER, K.; DECHASSA, M. L. e TREMETHICK, D. J. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 13, n. 7, p. 436-447, Jul 2012. Disponível em: PM:22722606.
- MA, S. K.; CHEUNG, A. N.; CHOY, C.; CHAN, G. C.; HA, S. Y.; CHING, L. M.; WAN, T. S. e CHAN, L. C. Cytogenetic characterization of childhood hepatoblastoma. **Cancer Genet Cytogenet** v. 119, n. 1, p. 32-36, May 2000. Disponível em: PM:10812168.
- MACDONALD, J. R.; ZIMAN, R.; YUEN, R. K.; FEUK, L. e SCHERER, S. W. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. **Nucleic Acids Res** v. 42, n. 1, p. D986-D992, Jan 1 2014. Disponível em: PM:24174537.
- MAGRELLI, A.; AZZALIN, G.; SALVATORE, M.; VIGANOTTI, M.; TOSTO, F.; COLOMBO, T.; DEVITO, R.; DI, M. A.; ANTOCCIA, A.; LORENZETTI, S.; MARANGHI, F.; MANTOVANI, A.; TANZARELLA, C.; MACINO, G. e TARUSCIO, D. Altered microRNA Expression Patterns in Hepatoblastoma Patients. **Transl.Oncol** v. 2, n. 3, p. 157-163, Aug 18 2009. Disponível em: PM:19701500.
- MAKIN, E. e DAVENPORT, M. Fetal and neonatal liver tumours. **Early Hum Dev.** v. 86, n. 10, p. 637-642, Oct 2010. Disponível em: PM:20956063.
- MARDIS, E. R. A decade's perspective on DNA sequencing technology. **Nature** v. 470, n. 7333, p. 198-203, Feb 10 2011. Disponível em: PM:21307932.
- MARIS, J. M. e DENNY, C. T. Focus on embryonal malignancies. **Cancer Cell** v. 2, n. 6, p. 447-450, Dec 2002. Disponível em: PM:12498713.
- MARTE, B. Two-hit hypothesis: It takes (at least) two to tango. **Milestones Cancer.** 2006. cap. 9.
- MASCHIETTO, M.; DE, C. B.; BRENTANI, H.; GRUNDY, P.; SREDNI, S. T.; TORRES, C.; MOTA, L. D.; CUNHA, I. W.; PATRAO, D. F.; COSTA, C. M.; SOARES, F. A.; BRENTANI, R. R. e CARRARO, D. M. Molecular profiling of isolated histological components of wilms tumor implicates a common role for the Wnt signaling pathway in kidney and tumor development. **Oncology** v. 75, n. 1-2, p. 81-91, 2008. Disponível em: PM:18784435.
- MAXAM, A. M. e GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. 1977. **Biotechnology** v. 24, p. 99-103, 1992. Disponível em: PM:1422074.
- MCKENNA, A.; HANNA, M.; BANKS, E.; SIVACHENKO, A.; CIBULSKIS, K.; KERNYTSKY, A.; GARIMELLA, K.; ALTSHULER, D.; GABRIEL, S.; DALY, M. e DEPRISTO, M. A. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Res** v. 20, n. 9, p. 1297-1303, Sep 2010. Disponível em: PM:20644199.
- MEYERS, R. L.; CZAUDERNA, P. e OTTE, J. B. Surgical treatment of hepatoblastoma. **Pediatr.Blood Cancer** v. 59, n. 5, p. 800-808, Nov 2012. Disponível em: PM:22887704.
- MEYERS, R. L.; TIAO, G.; DE VILLE DE, G. J.; SUPERINA, R. e ARONSON, D. C. Hepatoblastoma state of the art: pre-treatment extent of disease, surgical resection guidelines and the role of liver transplantation. **Curr.Opin.Pediatr.** v. 26, n. 1, p. 29-36, Feb 2014. Disponível em: PM:24362406.
- MIAO, J.; KUSAFUKA, T.; UDATSU, Y. e OKADA, A. Sequence variants of the Axin gene in hepatoblastoma. **Hepatol.Res** v. 25, n. 2, p. 174-179, Feb 2003. Disponível em: PM:12644054.
- MORLAND, B. ; GOYET, J. V. **Primary Hepatic Tumours.** Second edition. 2004. cap. Chapter 19.
- MORRIS, T. J.; BUTCHER, L. M.; FEBER, A.; TESCHENDORFF, A. E.; CHAKRAVARTHY, A. R.; WOJDACZ, T. K. e BECK, S. ChAMP: 450k Chip Analysis Methylation Pipeline. **Bioinformatics.** Dec 16 2013. Disponível em: PM:24336642.
- MURTAZA, M.; DAWSON, S. J.; TSUI, D. W.; GALE, D.; FORSHEW, T.; PISKORZ, A. M.; PARKINSON, C.; CHIN, S. F.; KINGSBURY, Z.; WONG, A. S.; MARASS, F.; HUMPHRAY, S.; HADFIELD, J.; BENTLEY, D.; CHIN, T. M.; BRENTON, J. D.; CALDAS, C. e ROSENFELD, N. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. **Nature** v. 497, n. 7447, p. 108-112, May 2 2013. Disponível em: PM:23563269.

- NAGAI, H.; NAKA, T.; TERADA, Y.; KOMAZAKI, T.; YABE, A.; JIN, E.; KAWANAMI, O.; KISHIMOTO, T.; KONISHI, N.; NAKAMURA, M.; KOBAYASHI, Y. e EMI, M. Hypermethylation associated with inactivation of the SOCS-1 gene, a JAK/STAT inhibitor, in human hepatoblastomas. **J Hum Genet** v. 48, n. 2, p. 65-69, 2003. Disponível em: PM:12601549.
- NAGATA, T.; NAKAMURA, M.; SHICHINO, H.; CHIN, M.; SUGITO, K.; IKEDA, T.; KOSHINAGA, T.; FUKUZAWA, M.; INOUE, M. e MUGISHIMA, H. 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 Genet Cytogenet** v. 156, n. 1, p. 8-13, Jan 1 2005. Disponível em: PM:15588850.
- NAKAMURA, S.; SHO, M.; KANEHIRO, H.; TANAKA, T.; KICHIKAWA, K. e NAKAJIMA, Y. Adult hepatoblastoma successfully treated with multimodal treatment. **Langenbecks Arch.Surg.** v. 395, n. 8, p. 1165-1168, Nov 2010a. Disponível em: PM:20383775.
- NAKAMURA, S.; SHO, M.; KANEHIRO, H.; TANAKA, T.; KICHIKAWA, K. e NAKAJIMA, Y. Adult hepatoblastoma successfully treated with multimodal treatment. **Langenbecks Arch.Surg.** v. 395, n. 8, p. 1165-1168, Nov 2010b. Disponível em: PM:20383775.
- NANNEY, D. L. EPIGENETIC CONTROL SYSTEMS. **Proc Natl Acad Sci U S A** v. 44, n. 7, p. 712-717, Jul 15 1958. Disponível em: PM:16590265.
- NORDLING, C. O. A new theory on cancer-inducing mechanism. **Br J Cancer** v. 7, n. 1, p. 68-72, Mar 1953.
- OKANO, M.; BELL, D. W.; HABER, D. A. e LI, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell** v. 99, n. 3, p. 247-257, Oct 29 1999. Disponível em: PM:10555141.
- PAHLMAN, S.; STOCKHAUSEN, M. T.; FREDLUND, E. e AXELSON, H. Notch signaling in neuroblastoma. **Semin.Cancer Biol.** v. 14, n. 5, p. 365-373, Oct 2004a. Disponível em: PM:15288262.
- PAHLMAN, S.; STOCKHAUSEN, M. T.; FREDLUND, E. e AXELSON, H. Notch signaling in neuroblastoma. **Semin.Cancer Biol.** v. 14, n. 5, p. 365-373, Oct 2004b. Disponível em: PM:15288262.
- PARADA, L. A.; BARDI, G.; HALLEN, M.; HAGERSTRAND, I.; TRANBERG, K. G.; MITELMAN, F. e JOHANSSON, B. Cytogenetic abnormalities and clonal evolution in an adult hepatoblastoma. **Am J Surg.Pathol** v. 21, n. 11, p. 1381-1386, Nov 1997. Disponível em: PM:9351578.
- PARADA, L. A.; LIMON, J.; ILISZKO, M.; CZAUDERNA, P.; GISSELSOON, D.; HOGGLUND, M.; KULLENDORFF, C. M.; WIEBE, T.; MERTENS, F. e JOHANSSON, B. Cytogenetics of hepatoblastoma: further characterization of 1q rearrangements by fluorescence in situ hybridization: an international collaborative study. **Med Pediatr.Oncol** v. 34, n. 3, p. 165-170, Mar 2000. Disponível em: PM:10696121.
- PARK, W. S.; OH, R. R.; PARK, J. Y.; KIM, P. J.; SHIN, M. S.; LEE, J. H.; KIM, H. S.; LEE, S. H.; KIM, S. Y.; PARK, Y. G.; AN, W. G.; KIM, H. S.; JANG, J. J.; YOO, N. J. e LEE, J. Y. Nuclear localization of beta-catenin is an important prognostic factor in hepatoblastoma. **J Pathol** v. 193, n. 4, p. 483-490, Apr 2001. Disponível em: PM:11276007.
- PATEL, L. R.; NYKTER, M.; CHEN, K. e ZHANG, W. Cancer genome sequencing: understanding malignancy as a disease of the genome, its conformation, and its evolution. **Cancer Lett.** v. 340, n. 2, p. 152-160, Nov 1 2013. Disponível em: PM:23111104.
- PEDERSEN, M. O.; LARSEN, A.; STOLTENBERG, M. e PENKOWA, M. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. **Prog.Histochem.Cytochem.** v. 44, n. 1, p. 29-64, 2009. Disponível em: PM:19348910.
- PERILONGO, G.; SHAFFORD, E. e PLASCHKES, J. SIOPEL trials using preoperative chemotherapy in hepatoblastoma. **Lancet Oncol** v. 1, p. 94-100, Oct 2000a. Disponível em: PM:11905674.
- PERILONGO, G.; SHAFFORD, E. e PLASCHKES, J. SIOPEL trials using preoperative chemotherapy in hepatoblastoma. **Lancet Oncol.** v. 1, p. 94-100, Oct 2000b. Disponível em: PM:11905674.
- PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C. e NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnol.Lett.** v. 26, n. 6, p. 509-515, Mar 2004. Disponível em: PM:15127793.
- PINKEL, D. e ALBERTSON, D. G. Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. **Nat Genet** v. 37 Suppl, p. S11-S17, Jun 2005. Disponível em: PM:15920524.
- PINKEL, D.; SEGRAVES, R.; SUDAR, D.; CLARK, S.; POOLE, I.; KOWBEL, D.; COLLINS, C.; KUO, W. L.; CHEN, C.; ZHAI, Y.; DAIRKEE, S. H.; LJUNG, B. M.; GRAY, J. W. e ALBERTSON, D. G. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. **Nat Genet** v. 20, n. 2, p. 207-211, Oct 1998. Disponível em: PM:9771718.

PLASS, C.; PFISTER, S. M.; LINDROTH, A. M.; BOGATYROVA, O.; CLAUS, R. e LICHTER, P. Mutations in regulators of the epigenome and their connections to global chromatin patterns in cancer. **Nat.Rev.Genet.** v. 14, n. 11, p. 765-780, Nov 2013. Disponível em: PM:24105274.

POLLACK, J. R. A perspective on DNA microarrays in pathology research and practice. **Am J Pathol** v. 171, n. 2, p. 375-385, Aug 2007. Disponível em: PM:17600117.

PONDER, B. A. Cancer genetics. **Nature** v. 411, n. 6835, p. 336-341, May 17 2001. Disponível em: PM:11357140.

PORTELA, A.; LIZ, J.; NOGALES, V.; SETIEN, F.; VILLANUEVA, A. e ESTELLER, M. DNA methylation determines nucleosome occupancy in the 5'-CpG islands of tumor suppressor genes. **Oncogene** v. 32, n. 47, p. 5421-5428, Nov 21 2013. Disponível em: PM:23686312.

PURCELL, R.; CHILDS, M.; MAIBACH, R.; MILES, C.; TURNER, C.; ZIMMERMANN, A.; CZAUDERNA, P. e SULLIVAN, M. Potential biomarkers for hepatoblastoma: results from the SIOPEL-3 study. **Eur.J Cancer** v. 48, n. 12, p. 1853-1859, Aug 2012. Disponível em: PM:22137595.

RASALKAR, D. D.; CHU, W. C.; CHENG, F. W.; HUI, S. K.; LING, S. C. e LI, C. K. A pictorial review of imaging of abdominal tumours in adolescence. **Pediatr.Radiol.** v. 40, n. 9, p. 1552-1561, Sep 2010. Disponível em: PM:20602098.

REDON, R.; ISHIKAWA, S.; FITCH, K. R.; FEUK, L.; PERRY, G. H.; ANDREWS, T. D.; FIEGLER, H.; SHAPERO, M. H.; CARSON, A. R.; CHEN, W.; CHO, E. K.; DALLAIRE, S.; FREEMAN, J. L.; GONZALEZ, J. R.; GRATACOS, M.; HUANG, J.; KALAITZOPOULOS, D.; KOMURA, D.; MACDONALD, J. R.; MARSHALL, C. R.; MEI, R.; MONTGOMERY, L.; NISHIMURA, K.; OKAMURA, K.; SHEN, F.; SOMERVILLE, M. J.; TCHINDA, J.; VALSESIA, A.; WOODWARK, C.; YANG, F.; ZHANG, J.; ZERJAL, T.; ZHANG, J.; ARMENGOL, L.; CONRAD, D. F.; ESTIVILL, X.; TYLER-SMITH, C.; CARTER, N. P.; ABURATANI, H.; LEE, C.; JONES, K. W.; SCHERER, S. W. e HURLES, M. E. Global variation in copy number in the human genome. **Nature** v. 444, n. 7118, p. 444-454, Nov 23 2006. Disponível em: PM:17122850.

REGEL, I.; EICHENMULLER, M.; JOPPIEN, S.; LIEBL, J.; HABERLE, B.; MULLER-HOCKER, J.; VOLLMAR, A.; VON, S. D. e KAPPLER, R. IGFBP3 impedes aggressive growth of pediatric liver cancer and is epigenetically silenced in vascular invasive and metastatic tumors. **Mol Cancer** v. 11, p. 9, 2012. Disponível em: PM:22401581.

REIK, W.; DEAN, W. e WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science** v. 293, n. 5532, p. 1089-1093, Aug 10 2001. Disponível em: PM:11498579.

RIDEOUT, W. M., III; COETZEE, G. A.; OLUMI, A. F. e JONES, P. A. 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. **Science** v. 249, n. 4974, p. 1288-1290, Sep 14 1990. Disponível em: PM:1697983.

ROBERTSON, K. D. DNA methylation and human disease. **Nat.Rev.Genet.** v. 6, n. 8, p. 597-610, Aug 2005. Disponível em: PM:16136652.

<[04] Authors, primary>. <[03] Title, primary>.(In press) <[05] Date, primary>.

RODRIGUEZ-PAREDES, M. e ESTELLER, M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. **Nat Med** v. 17, n. 3, p. 330-339, Mar 2011. Disponível em: PM:21386836.

ROESSLER, J.; AMMERPOHL, O.; GUTWEIN, J.; HASEMEIER, B.; ANWAR, S. L.; KREIPE, H. e LEHMANN, U. Quantitative cross-validation and content analysis of the 450k DNA methylation array from Illumina, Inc. **BMC Res Notes** v. 5, p. 210, 2012. Disponível em: PM:22546179.

ROUGEMONT, A. L.; MCLIN, V. A.; TOSO, C. e WILDHABER, B. E. Adult hepatoblastoma: learning from children. **J.Hepatol.** v. 56, n. 6, p. 1392-1403, Jun 2012. Disponível em: PM:22326463.

ROWLAND, J. M. Hepatoblastoma: assessment of criteria for histologic classification. **Med.Pediatr.Oncol.** v. 39, n. 5, p. 478-483, Nov 2002. Disponível em: PM:12228903.

RUMBAJAN, J. M.; MAEDA, T.; SOUZAKI, R.; MITSUI, K.; HIGASHIMOTO, K.; NAKABAYASHI, K.; YATSUKI, H.; NISHIOKA, K.; HARADA, R.; AOKI, S.; KOHASHI, K.; ODA, Y.; HATA, K.; SAJI, T.; TAGUCHI, T.; TAJIRI, T.; SOEJIMA, H. e JOH, K. Comprehensive analyses of imprinted differentially methylated regions reveal epigenetic and genetic characteristics in hepatoblastoma. **BMC Cancer** v. 13, p. 608, 2013. Disponível em: PM:24373183.

RUSHTON, J. e LOPEZ-TERRADA, D. Molecular and genetic basis of childhood cancer. **Cancer Biomark.** v. 9, n. 1-6, p. 211-234, 2010. Disponível em: PM:22112478.

SAINATI, L.; LESZL, A.; STELLA, M.; MONTALDI, A.; PERILONGO, G.; RUGGE, M.; BOLCATO, S.; IOLASCON, A. e BASSO, G. Cytogenetic analysis of hepatoblastoma: hypothesis of cytogenetic evolution in such tumors and results of a multicentric study. **Cancer Genet Cytogenet** v. 104, n. 1, p. 39-44, Jul 1 1998. Disponível em: PM:9648556.

- SAKAMOTO, L. H.; DE, C. B.; CAJAIBA, M.; SOARES, F. A. e VETTORE, A. L. MT1G hypermethylation: a potential prognostic marker for hepatoblastoma. **Pediatr.Res** v. 67, n. 4, p. 387-393, Apr 2010. Disponível em: PM:20032811.
- SANDOVAL, C.; PIPER, J.; MOWERY-RUSHTON, P. A. e JAYABOSE, S. Fetal-type hepatoblastoma and del(3)(q11.2q13.2). **Cancer Genet Cytogenet** v. 134, n. 2, p. 162-164, Apr 15 2002. Disponível em: PM:12034532.
- SANDOVAL, J.; HEYN, H.; MORAN, S.; SERRA-MUSACH, J.; PUJANA, M. A.; BIBIKOVA, M. e ESTELLER, M. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. **Epigenetics**. v. 6, n. 6, p. 692-702, Jun 2011. Disponível em: PM:21593595.
- SANGER, F. e COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **J Mol Biol.** v. 94, n. 3, p. 441-448, May 25 1975. Disponível em: PM:1100841.
- SANGER, F.; NICKLEN, S. e COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A** v. 74, n. 12, p. 5463-5467, Dec 1977. Disponível em: PM:271968.
- SANLAVILLE, D.; LAPIERRE, J. M.; TURLEAU, C.; COQUIN, A.; BORCK, G.; COLLEAUX, L.; VEKEMANS, M. e ROMANA, S. P. Molecular karyotyping in human constitutional cytogenetics. **Eur.J Med Genet** v. 48, n. 3, p. 214-231, Jul 2005. Disponível em: PM:16179218.
- SCHIFFMAN, J. D.; GELLER, J. I.; MUNDT, E.; MEANS, A.; MEANS, L. e MEANS, V. Update on pediatric cancer predisposition syndromes. **Pediatr.Blood Cancer** v. 60, n. 8, p. 1247-1252, Aug 2013. Disponível em: PM:23625733.
- SCHNATER, J. M.; KOHLER, S. E.; LAMERS, W. H.; VON, S. D. e ARONSON, D. C. Where do we stand with hepatoblastoma? A review. **Cancer** v. 98, n. 4, p. 668-678, Aug 15 2003. Disponível em: PM:12910509.
- SCHNEIDER, N. R.; COOLEY, L. D.; FINEGOLD, M. J.; DOUGLASS, E. C. e TOMLINSON, G. E. The first recurring chromosome translocation in hepatoblastoma: der(4)t(1;4)(q12;q34). **Genes Chromosomes Cancer** v. 19, n. 4, p. 291-294, Aug 1997. Disponível em: PM:9258666.
- SCHRIDER, D. R.; NAVARRO, F. C.; GALANTE, P. A.; PARMIGIANI, R. B.; CAMARGO, A. A.; HAHN, M. W. e DE SOUZA, S. J. Gene copy-number polymorphism caused by retrotransposition in humans. **PLoS Genet** v. 9, n. 1, p. e1003242, 2013. Disponível em: PM:23359205.
- SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOCKER, S.; SALOWSKY, R.; LEIBER, M.; GASSMANN, M.; LIGHTFOOT, S.; MENZEL, W.; GRANZOW, M. e RAGG, T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Mol Biol.** v. 7, p. 3, 2006. Disponível em: PM:16448564.
- SCHULLER, U.; KHO, A. T.; ZHAO, Q.; MA, Q. e ROWITCH, D. H. Cerebellar 'transcriptome' reveals cell-type and stage-specific expression during postnatal development and tumorigenesis. **Mol Cell Neurosci.** v. 33, n. 3, p. 247-259, Nov 2006. Disponível em: PM:16962790.
- SCOTTING, P. J.; WALKER, D. A. e PERILONGO, G. Childhood solid tumours: a developmental disorder. **Nat Rev Cancer** v. 5, n. 6, p. 481-488, Jun 2005. Disponível em: PM:15905853.
- SEBAT, J.; LAKSHMI, B.; TROGE, J.; ALEXANDER, J.; YOUNG, J.; LUNDIN, P.; MANER, S.; MASSA, H.; WALKER, M.; CHI, M.; NAVIN, N.; LUCITO, R.; HEALY, J.; HICKS, J.; YE, K.; REINER, A.; GILLIAM, T. C.; TRASK, B.; PATTERSON, N.; ZETTERBERG, A. e WIGLER, M. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. **Science** v. 305, n. 5683, p. 525-528, Jul 23 2004. Disponível em: PM:15273396.
- SEGAL, E.; FONDUFE-MITTENDORF, Y.; CHEN, L.; THASTROM, A.; FIELD, Y.; MOORE, I. K.; WANG, J. P. e WIDOM, J. A genomic code for nucleosome positioning. **Nature** v. 442, n. 7104, p. 772-778, Aug 17 2006. Disponível em: PM:16862119.
- SEGAL, E. e WIDOM, J. What controls nucleosome positions? **Trends Genet** v. 25, n. 8, p. 335-343, Aug 2009. Disponível em: PM:19596482.
- SEMERARO, M.; BRANCHEREAU, S.; MAIBACH, R.; ZSIROS, J.; CASANOVA, M.; BROCK, P.; DOMERG, C.; ARONSON, D. C.; ZIMMERMANN, A.; LAITHIER, V.; CHILDS, M.; ROEBUCK, D.; PERILONGO, G.; CZAUDERNA, P. e BRUGIERES, L. Relapses in hepatoblastoma patients: clinical characteristics and outcome—experience of the International Childhood Liver Tumour Strategy Group (SIOPEL). **Eur.J Cancer** v. 49, n. 4, p. 915-922, Mar 2013. Disponível em: PM:23146961.
- SHAMES, D. S.; MINNA, J. D. e GAZDAR, A. F. Methods for detecting DNA methylation in tumors: from bench to bedside. **Cancer Lett.** v. 251, n. 2, p. 187-198, Jun 28 2007. Disponível em: PM:17166656.
- SHARMA, S.; KELLY, T. K. e JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis** v. 31, n. 1, p. 27-36, Jan 2010. Disponível em: PM:19752007.

- SHEN, J.; WANG, S.; ZHANG, Y. J.; WU, H. C.; KIBRIYA, M. G.; JASMINE, F.; AHSAN, H.; WU, D. P.; SIEGEL, A. B.; REMOTTI, H. e SANTELLA, R. M. Exploring genome-wide DNA methylation profiles altered in hepatocellular carcinoma using Infinium HumanMethylation 450 BeadChips. **Epigenetics**. v. 8, n. 1, p. 34-43, Jan 2013. Disponível em: PM:23208076.
- SHENDURE, J. e JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nat Biotechnol**. v. 26, n. 10, p. 1135-1145, Oct 2008. Disponível em: PM:18846087.
- SHIGAKI, H.; BABA, Y.; WATANABE, M.; MURATA, A.; IWAGAMI, S.; MIYAKE, K.; ISHIMOTO, T.; IWATSUKI, M. e BABA, H. LINE-1 hypomethylation in gastric cancer, detected by bisulfite pyrosequencing, is associated with poor prognosis. **Gastric.Cancer** v. 16, n. 4, p. 480-487, Oct 2013. Disponível em: PM:23179365.
- SHIM, Y. H.; PARK, H. J.; CHOI, M. S.; KIM, J. S.; KIM, H.; KIM, J. J.; JANG, J. J. e YU, E. Hypermethylation of the p16 gene and lack of p16 expression in hepatoblastoma. **Mod.Pathol** v. 16, n. 5, p. 430-436, May 2003. Disponível em: PM:12748249.
- SHIRAKI, N.; UMEDA, K.; SAKASHITA, N.; TAKEYA, M.; KUME, K. e KUME, S. Differentiation of mouse and human embryonic stem cells into hepatic lineages. **Genes Cells** v. 13, n. 7, p. 731-746, Jul 2008. Disponível em: PM:18513331.
- SHYR, D. e LIU, Q. Next generation sequencing in cancer research and clinical application. **Biol.Proced.Online**. v. 15, n. 1, p. 4, 2013. Disponível em: PM:23406336.
- SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D. e JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. **CA Cancer J Clin** v. 63, n. 1, p. 11-30, Jan 2013. Disponível em: PM:23335087.
- SILVA, A. G.; RODRIGUES, T. C.; PEARSON, P. L.; ROSENBERG, C. e KREPISCHI, A. C. V. Germline Genomic Copy Number Variation Contribution to Cancer Predisposition. In JOHN WILEY & SONS, L. (Ed.) **eLS**. 2013.
- SILVER, N.; BEST, S.; JIANG, J. e THEIN, S. L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Mol Biol**. v. 7, p. 33, 2006. Disponível em: PM:17026756.
- SMEETS, D. F. Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. **Clin Biochem**. v. 37, n. 6, p. 439-446, Jun 2004. Disponível em: PM:15183291.
- SMITH, Z. D. e MEISSNER, A. DNA methylation: roles in mammalian development. **Nat Rev Genet** v. 14, n. 3, p. 204-220, Mar 2013. Disponível em: PM:23400093.
- SPECTOR, L. G. e BIRCH, J. The epidemiology of hepatoblastoma. **Pediatr.Blood Cancer** v. 59, n. 5, p. 776-779, Nov 2012. Disponível em: PM:22692949.
- STEENMAN, M.; TOMLINSON, G.; WESTERVELD, A. e MANNENS, M. Comparative genomic hybridization analysis of hepatoblastomas: additional evidence for a genetic link with Wilms tumor and rhabdomyosarcoma. **Cytogenet Cell Genet** v. 86, n. 2, p. 157-161, 1999. Disponível em: PM:10545709.
- STEJSKALOVA, E.; MALIS, J.; SNAJDAUF, J.; PYCHA, K.; URBANKOVA, H.; BAJCIOVA, V.; STARY, J.; KODET, R. e JAROSOVA, M. Cytogenetic and array comparative genomic hybridization analysis of a series of hepatoblastomas. **Cancer Genet.Cytogenet**. v. 194, n. 2, p. 82-87, Oct 15 2009a. Disponível em: PM:19781440.
- STEJSKALOVA, E.; MALIS, J.; SNAJDAUF, J.; PYCHA, K.; URBANKOVA, H.; BAJCIOVA, V.; STARY, J.; KODET, R. e JAROSOVA, M. Cytogenetic and array comparative genomic hybridization analysis of a series of hepatoblastomas. **Cancer Genet.Cytogenet**. v. 194, n. 2, p. 82-87, Oct 15 2009b. Disponível em: PM:19781440.
- STILLER, C. A. Epidemiology and genetics of childhood cancer. **Oncogene** v. 23, n. 38, p. 6429-6444, Aug 23 2004. Disponível em: PM:15322515.
- STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J. e FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Nature** v. 458, n. 7239, p. 719-724, Apr 9 2009a. Disponível em: PM:19360079.
- STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J. e FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Nature** v. 458, n. 7239, p. 719-724, Apr 9 2009b. Disponível em: PM:19360079.
- SUGAWARA, W.; HARUTA, M.; SASAKI, F.; WATANABE, N.; TSUNEMATSU, Y.; KIKUTA, A. e KANEKO, Y. Promoter hypermethylation of the RASSF1A gene predicts the poor outcome of patients with hepatoblastoma. **Pediatr.Blood Cancer** v. 49, n. 3, p. 240-249, Sep 2007a. Disponível em: PM:16937357.
- SUGAWARA, W.; HARUTA, M.; SASAKI, F.; WATANABE, N.; TSUNEMATSU, Y.; KIKUTA, A. e KANEKO, Y. Promoter hypermethylation of the RASSF1A gene predicts the poor outcome of patients with hepatoblastoma. **Pediatr.Blood Cancer** v. 49, n. 3, p. 240-249, Sep 2007b. Disponível em: PM:16937357.
- SUGITO, K.; KAWASHIMA, H.; UEKUSA, S.; YOSHIZAWA, S.; HOSHI, R.; FURUYA, T.; KANEDA, H.; HOSODA, T.; MASUKO, T.; OHASHI, K.; IKEDA, T.; KOSHINAGA, T.; FUJIWARA, K.; IGARASHI, J.; GHOSH, S.; HELD, W. A. e NAGASE,

- H. Identification of aberrant methylation regions in neuroblastoma by screening of tissue-specific differentially methylated regions. **Pediatr.Blood Cancer** v. 60, n. 3, p. 383-389, Mar 2013. Disponível em: PM:22911660.
- SURACE, C.; LESZL, A.; PERILONGO, G.; ROCCHI, M.; BASSO, G. e SAINATI, L. Fluorescent in situ hybridization (FISH) reveals frequent and recurrent numerical and structural abnormalities in hepatoblastoma with no informative karyotype. **Med Pediatr.Oncol** v. 39, n. 5, p. 536-539, Nov 2002. Disponível em: PM:12228913.
- SUTER, C. M.; MARTIN, D. I. e WARD, R. L. Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue. **Int J Colorectal Dis** v. 19, n. 2, p. 95-101, Mar 2004. Disponível em: PM:14534800.
- SUZUKI, M.; KATO, M.; YUYAN, C.; TAKITA, J.; SANADA, M.; NANNYA, Y.; YAMAMOTO, G.; TAKAHASHI, A.; IKEDA, H.; KUWANO, H.; OGAWA, S. e HAYASHI, Y. Whole-genome profiling of chromosomal aberrations in hepatoblastoma using high-density single-nucleotide polymorphism genotyping microarrays. **Cancer Sci** v. 99, n. 3, p. 564-570, Mar 2008. Disponível em: PM:18271875.
- SWARTS, S.; WISECARVER, J. e BRIDGE, J. A. Significance of extra copies of chromosome 20 and the long arm of chromosome 2 in hepatoblastoma. **Cancer Genet Cytogenet** v. 91, n. 1, p. 65-67, Oct 1 1996a. Disponível em: PM:8908169.
- SWARTS, S.; WISECARVER, J. e BRIDGE, J. A. Significance of extra copies of chromosome 20 and the long arm of chromosome 2 in hepatoblastoma. **Cancer Genet Cytogenet** v. 91, n. 1, p. 65-67, Oct 1 1996b. Disponível em: PM:8908169.
- SZULWACH, K. E.; LI, X.; LI, Y.; SONG, C. X.; HAN, J. W.; KIM, S.; NAMBURI, S.; HERMETZ, K.; KIM, J. J.; RUDD, M. K.; YOON, Y. S.; REN, B.; HE, C. e JIN, P. Integrating 5-hydroxymethylcytosine into the epigenomic landscape of human embryonic stem cells. **PLoS Genet** v. 7, n. 6, p. e1002154, Jun 2011. Disponível em: PM:21731508.
- TAHILIANI, M.; KOH, K. P.; SHEN, Y.; PASTOR, W. A.; BANDUKWALA, H.; BRUDNO, Y.; AGARWAL, S.; IYER, L. M.; LIU, D. R.; ARAVIND, L. e RAO, A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. **Science** v. 324, n. 5929, p. 930-935, May 15 2009. Disponível em: PM:19372391.
- TAKAI, D.; YAGI, Y.; HABIB, N.; SUGIMURA, T. e USHIJIMA, T. Hypomethylation of LINE1 retrotransposon in human hepatocellular carcinomas, but not in surrounding liver cirrhosis. **Jpn.J Clin Oncol** v. 30, n. 7, p. 306-309, Jul 2000. Disponível em: PM:11007163.
- TANG, Y. C. e AMON, A. Gene copy-number alterations: a cost-benefit analysis. **Cell** v. 152, n. 3, p. 394-405, Jan 31 2013. Disponível em: PM:23374337.
- TANIGUCHI, K.; ROBERTS, L. R.; ADERCA, I. N.; DONG, X.; QIAN, C.; MURPHY, L. M.; NAGORNEY, D. M.; BURGART, L. J.; ROCHE, P. C.; SMITH, D. I.; ROSS, J. A. e LIU, W. Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. **Oncogene** v. 21, n. 31, p. 4863-4871, Jul 18 2002. Disponível em: PM:12101426.
- TERADA, Y.; MATSUMOTO, S.; BANDO, K. e TAJIRI, T. Comprehensive allelotyping of hepatoblastoma. **Hepatogastroenterology** v. 56, n. 89, p. 199-204, Jan 2009. Disponível em: PM:19453057.
- TERRACCIANO, L. M.; BERNASCONI, B.; RUCK, P.; STALLMACH, T.; BRINER, J.; SAUTER, G.; MOCH, H.; VECCHIONE, R.; POLLICE, L.; PETTINATO, G.; GURTL, B.; RATSCHKE, M.; DE, K. R.; TORNILLO, L. e BRUDER, E. Comparative genomic hybridization analysis of hepatoblastoma reveals high frequency of X-chromosome gains and similarities between epithelial and stromal components. **Hum Pathol** v. 34, n. 9, p. 864-871, Sep 2003. Disponível em: PM:14562281.
- TESCHENDORFF, A. E.; MARABITA, F.; LECHNER, M.; BARTLETT, T.; TEGNER, J.; GOMEZ-CABRERO, D. e BECK, S. A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data. **Bioinformatics** v. 29, n. 2, p. 189-196, Jan 15 2013. Disponível em: PM:23175756.
- TOMASETTI, C.; VOGELSTEIN, B. e PARMIGIANI, G. Half or more of the somatic mutations in cancers of self-renewing tissues originate prior to tumor initiation. **Proc Natl Acad Sci U S A** v. 110, n. 6, p. 1999-2004, Feb 5 2013. Disponível em: PM:23345422.
- TOMLINSON, G. E. Cytogenetics of hepatoblastoma. **Front Biosci.(Elite.Ed)** v. 4, p. 1287-1292, 2012. Disponível em: PM:22201954.
- TOMLINSON, G. E.; DOUGLASS, E. C.; POLLOCK, B. H.; FINEGOLD, M. J. e SCHNEIDER, N. R. Cytogenetic evaluation of a large series of hepatoblastomas: numerical abnormalities with recurring aberrations involving 1q12-q21. **Genes Chromosomes Cancer** v. 44, n. 2, p. 177-184, Oct 2005. Disponível em: PM:15981236.
- TOMLINSON, G. E. e KAPPLER, R. Genetics and epigenetics of hepatoblastoma. **Pediatr.Blood Cancer** v. 59, n. 5, p. 785-792, Nov 2012a. Disponível em: PM:22807084.
- TOMLINSON, G. E. e KAPPLER, R. Genetics and epigenetics of hepatoblastoma. **Pediatr.Blood Cancer** v. 59, n. 5, p. 785-792, Nov 2012b. Disponível em: PM:22807084.

- TRASK, B. J. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. **Nat Rev Genet** v. 3, n. 10, p. 769-778, Oct 2002. Disponível em: PM:12360235.
- TURNER, A. M. e MORRIS, K. V. Controlling transcription with noncoding RNAs in mammalian cells. **Biotechniques** v. 48, n. 6, p. ix-xvi, Jun 2010. Disponível em: PM:20569216.
- UDATSU, Y.; KUSAFUKA, T.; KURODA, S.; MIAO, J. e OKADA, A. High frequency of beta-catenin mutations in hepatoblastoma. **Pediatr.Surg.Int** v. 17, n. 7, p. 508-512, Sep 2001a. Disponível em: PM:11666046.
- UDATSU, Y.; KUSAFUKA, T.; KURODA, S.; MIAO, J. e OKADA, A. High frequency of beta-catenin mutations in hepatoblastoma. **Pediatr.Surg.Int** v. 17, n. 7, p. 508-512, Sep 2001b. Disponível em: PM:11666046.
- UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B. C.; REMM, M. e ROZEN, S. G. Primer3--new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Res** v. 40, n. 15, p. e115, Aug 2012. Disponível em: PM:22730293.
- VANDESOMPELE, J.; DE, P. K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN, R. N.; DE, P. A. e SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.** v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, Jun 18 2002. Disponível em: PM:12184808.
- VOGELSTEIN, B.; PAPADOPOULOS, N.; VELCULESCU, V. E.; ZHOU, S.; DIAZ, L. A., Jr. e KINZLER, K. W. Cancer genome landscapes. **Science** v. 339, n. 6127, p. 1546-1558, Mar 29 2013a. Disponível em: PM:23539594.
- VOGELSTEIN, B.; PAPADOPOULOS, N.; VELCULESCU, V. E.; ZHOU, S.; DIAZ, L. A., Jr. e KINZLER, K. W. Cancer genome landscapes. **Science** v. 339, n. 6127, p. 1546-1558, Mar 29 2013b. Disponível em: PM:23539594.
- WANG, D.; YAN, L.; HU, Q.; SUCHESTON, L. E.; HIGGINS, M. J.; AMBROSONE, C. B.; JOHNSON, C. S.; SMIRAGLIA, D. J. e LIU, S. IMA: an R package for high-throughput analysis of Illumina's 450K Infinium methylation data. **Bioinformatics.** v. 28, n. 5, p. 729-730, Mar 1 2012a. Disponível em: PM:22253290.
- WANG, D.; YAN, L.; HU, Q.; SUCHESTON, L. E.; HIGGINS, M. J.; AMBROSONE, C. B.; JOHNSON, C. S.; SMIRAGLIA, D. J. e LIU, S. IMA: an R package for high-throughput analysis of Illumina's 450K Infinium methylation data. **Bioinformatics.** v. 28, n. 5, p. 729-730, Mar 1 2012b. Disponível em: PM:22253290.
- WEAVER, B. A. e CLEVELAND, D. W. Does aneuploidy cause cancer? **Curr.Opin.Cell Biol.** v. 18, n. 6, p. 658-667, Dec 2006. Disponível em: PM:17046232.
- WEBER, R. G.; PIETSCH, T.; VON, S. D. e LICHTER, P. Characterization of genomic alterations in hepatoblastomas. A role for gains on chromosomes 8q and 20 as predictors of poor outcome. **Am J Pathol** v. 157, n. 2, p. 571-578, Aug 2000. Disponível em: PM:10934159.
- WIDSCHWENDTER, M.; FIEGL, H.; EGLE, D.; MUELLER-HOLZNER, E.; SPIZZO, G.; MARTH, C.; WEISENBERGER, D. J.; CAMPAN, M.; YOUNG, J.; JACOBS, I. e LAIRD, P. W. Epigenetic stem cell signature in cancer. **Nat Genet** v. 39, n. 2, p. 157-158, Feb 2007. Disponível em: PM:17200673.
- WILCOXON, F. Individual Comparisons by Ranking Methods. 1. 1945. cap. 6, p.80-86.
- WOJTULEWICZ, J. e COAKLEY, J. Extensive bowel resection in infancy is another cause of increasing plasma alpha-fetoprotein concentration. **Ann Clin Biochem.** v. 50, n. Pt 2, p. 162-165, Mar 2013. Disponível em: PM:23421992.
- WOLFFE, A. P. e MATZKE, M. A. Epigenetics: regulation through repression. **Science** v. 286, n. 5439, p. 481-486, Oct 15 1999. Disponível em: PM:10521337.
- WOOD, L. D.; PARSONS, D. W.; JONES, S.; LIN, J.; SJOBLUM, T.; LEARY, R. J.; SHEN, D.; BOCA, S. M.; BARBER, T.; PTAK, J.; SILLIMAN, N.; SZABO, S.; DEZSO, Z.; USTYANKSKY, V.; NIKOLSKAYA, T.; NIKOLSKY, Y.; KARCHIN, R.; WILSON, P. A.; KAMINKER, J. S.; ZHANG, Z.; CROSHAW, R.; WILLIS, J.; DAWSON, D.; SHIPITSIN, M.; WILLSON, J. K.; SUKUMAR, S.; POLYAK, K.; PARK, B. H.; PETHIYAGODA, C. L.; PANT, P. V.; BALLINGER, D. G.; SPARKS, A. B.; HARTIGAN, J.; SMITH, D. R.; SUH, E.; PAPADOPOULOS, N.; BUCKHAULTS, P.; MARKOWITZ, S. D.; PARMIGIANI, G.; KINZLER, K. W.; VELCULESCU, V. E. e VOGELSTEIN, B. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. **Science** v. 318, n. 5853, p. 1108-1113, Nov 16 2007. Disponível em: PM:17932254.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fact sheet N°297.**, 2009.
- WU, S. C. e ZHANG, Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. **Nat.Rev.Mol.Cell Biol.** v. 11, n. 9, p. 607-620, Sep 2010. Disponível em: PM:20683471.
- YASHIMA, K.; MAITRA, A.; TIMMONS, C. F.; ROGERS, B. B.; PINAR, H.; SHAY, J. W. e GAZDAR, A. F. Expression of the RNA component of telomerase in Wilms tumor and nephrogenic rest recapitulates renal embryogenesis. **Hum Pathol** v. 29, n. 5, p. 536-542, May 1998. Disponível em: PM:9596280.

YEH, Y. A.; RAO, P. H.; CIGNA, C. T.; MIDDLESWORTH, W.; LEFKOWITCH, J. H. e MURTY, V. V. Trisomy 1q, 2, and 20 in a case of hepatoblastoma: possible significance of 2q35-q37 and 1q12-q21 rearrangements. **Cancer Genet.Cytogenet.** v. 123, n. 2, p. 140-143, Dec 2000a. Disponível em: PM:11150606.

YEH, Y. A.; RAO, P. H.; CIGNA, C. T.; MIDDLESWORTH, W.; LEFKOWITCH, J. H. e MURTY, V. V. Trisomy 1q, 2, and 20 in a case of hepatoblastoma: possible significance of 2q35-q37 and 1q12-q21 rearrangements. **Cancer Genet.Cytogenet.** v. 123, n. 2, p. 140-143, Dec 2000b. Disponível em: PM:11150606.

ZACK, T. I.; SCHUMACHER, S. E.; CARTER, S. L.; CHERNIACK, A. D.; SAKSENA, G.; TABAK, B.; LAWRENCE, M. S.; ZHANG, C. Z.; WALA, J.; MERMEL, C. H.; SOUGNEZ, C.; GABRIEL, S. B.; HERNANDEZ, B.; SHEN, H.; LAIRD, P. W.; GETZ, G.; MEYERSON, M. e BEROUKHIM, R. Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. **Nat Genet** v. 45, n. 10, p. 1134-1140, Sep 26 2013. Disponível em: PM:24071852.

ZATKOVA, A.; ROUILLARD, J. M.; HARTMANN, W.; LAMB, B. J.; KUICK, R.; ECKART, M.; VON, S. D.; KOCH, A.; FONATSCH, C.; PIETSCH, T.; HANASH, S. M. e WIMMER, K. Amplification and overexpression of the IGF2 regulator PLAG1 in hepatoblastoma. **Genes Chromosomes Cancer** v. 39, n. 2, p. 126-137, Feb 2004. Disponível em: PM:14695992.

ZILLER, M. J.; GU, H.; MULLER, F.; DONAGHEY, J.; TSAI, L. T.; KOHLBACHER, O.; DE JAGER, P. L.; ROSEN, E. D.; BENNETT, D. A.; BERNSTEIN, B. E.; GNIRKE, A. e MEISSNER, A. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. **Nature** v. 500, n. 7463, p. 477-481, Aug 22 2013. Disponível em: PM:23925113.

ZIMMERMANN, A. The emerging family of hepatoblastoma tumours: from ontogenesis to oncogenesis. **Eur.J Cancer** v. 41, n. 11, p. 1503-1514, Jul 2005. Disponível em: PM:15982867.

ZIMMERMANN, A. e PERILONGO, G. **Pediatric Liver Tumors.**, 2011.

ZSIROS, J.; MAIBACH, R.; SHAFFORD, E.; BRUGIERES, L.; BROCK, P.; CZAUDERNA, P.; ROEBUCK, D.; CHILDS, M.; ZIMMERMANN, A.; LAITHIER, V.; OTTE, J. B.; DE, C. B.; MACKINLAY, G.; SCOPINARO, M.; ARONSON, D.; PLASCHKES, J. e PERILONGO, G. Successful treatment of childhood high-risk hepatoblastoma with dose-intensive multiagent chemotherapy and surgery: final results of the SIOPEL-3HR study. **J.Clin.Oncol.** v. 28, n. 15, p. 2584-2590, May 20 2010. Disponível em: PM:20406943.

ZVELEBIL, M.; OLIEMULLER, E.; GAO, Q.; WANSBURY, O.; MACKAY, A.; KENDRICK, H.; SMALLEY, M. J.; REIS-FILHO, J. S. e HOWARD, B. A. Embryonic mammary signature subsets are activated in Brca1-/- and basal-like breast cancers. **Breast Cancer Res** v. 15, n. 2, p. R25, Mar 18 2013. Disponível em: PM:23506684.

Biografia

Biografia

Tatiane Cristina Rodrigues

Formação acadêmica/titulação

2010

Doutorado em andamento em Ciências Biológicas (Genética)
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Anomalias genéticas e epigenéticas no tumor embrionário hepatoblastoma,
Orientador: Carla Rosenberg
Co-orientador: Ana C. V. Krepschi
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

2004 - 2010

Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
Título: Impacto das mutações somáticas pontuais em regiões reguladoras de Splicing em linhagens tumorais de mama.
Orientador: Sandro José de Souza
Co-orientador: Pedro A. F. Galante e Júlia P. C. da Cunha

Formação Complementar

2014 - 2014

Working with Human Genomes. (Carga horária: 50h).
Wellcome Trust Sanger Institute.

2013 - 2013

Principles of Clinical Research in Oncology. (Carga horária: 3h).
Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

2012 - 2012

Curso de Verão em Bioinformática. (Carga horária: 40h).
Instituto de Matemática e Estatística - USP.

2012 - 2012

Next generation sequencing: Abordagem computacional. (Carga horária: 70h).
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

2012 - 2012

EBI-Wellcome Trust Summer School in Bioinformatics. (Carga horária: 40h).
Wellcome Trust Sanger Institute.

2011 - 2011

Bioinformatics to understand studies in genomics. (Carga horária: 30h).
Maastricht University.

2011 - 2011

I Curso Prático de Programação para Bioinformática. (Carga horária: 60h).
Instituto Nacional de Câncer.

2011 - 2011

Mecanismos moleculares do desenvolvimento/evolução. (Carga horária: 3h).
Sociedade Brasileira de Genética.

2011 - 2011

Sequenciamento de ac.nucleicos em larga escala. (Carga horária: 3h).
Sociedade Brasileira de Genética.

2011 - 2011

Abordagens Básicas para o Controle do Câncer. (Carga horária: 30h).
Instituto Nacional de Câncer.

2010 - 2010

Epigenética: funções e sua relação com as doenças. (Carga horária: 3h).
Sociedade Brasileira de Genética.

2010 - 2010

MicroRNAs e Câncer: atualizações. (Carga horária: 3h).
Sociedade Brasileira de Genética.

2009 - 2009

DOENÇAS GENÔMICAS: Síndromes de Microdeleções. (Carga horária: 24h).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2008 - 2008

Extensão universitária em Toxicologia Aplicada. (Carga horária: 30h).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2006 - 2006

Extensão universitária em Manipulação de ácidos nucleicos. (Carga horária: 40h).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2005 - 2005

Farmacogenômica e câncer. (Carga horária: 8h).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2005 - 2005

Biologia Marinha. (Carga horária: 40h).
Instituto de Biociências.

Atuação Profissional

Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos, PRODUTOS ROCHE, Brasil.

Vínculo institucional

2014 - Atual

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Gerente Médico Científico, Carga horária: 40

Internacional Científica, INTERCIENTÍFICA, Brasil.

Vínculo institucional

2013 - 2014

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Coordenadora de projeto

Outras informações

Elaboração de projeto de inovação, parceria empresa - agência de fomento (FAPESP).
Aprovação de R\$200.000,00 para desenvolvimento de nova tecnologia para diagnóstico de hemoglobinopatias.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2010 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Doutoranda, Carga horária: 40

2013 - 2013

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitora, Carga horária: 6

Outras informações

Monitoria para a disciplina Genética (BIO105) - bolsa PAE (Programa de Aperfeiçoamento do Ensino)

2013 - 2013

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitoria, Carga horária: 6

Outras informações

Monitoria para a disciplina Abordagens Multidisciplinares em Genética (BIO0508) - bolsa PAE (Programa de Aperfeiçoamento do Ensino)

Centro de Estudos do Genoma Humano - USP, CEGH - USP, Brasil.

Vínculo institucional

2010 - 2014

Vínculo: autônomo, Enquadramento Funcional: Biologista molecular, Carga horária: 8

Outras informações

Assessoria ao oferecimento de exames de array-CGH pelo Centro de Estudos do Genoma Humano.

Atividades

05/2010 - Atual

Serviços técnicos especializados , CEGH, .

Serviço realizado: Bióloga molecular.

Fundação Antônio Prudente, FAP, Brasil.

Vínculo institucional

2010 - Atual

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Colaborador

Outras informações

Colaboradora no Projeto INCITO - análises em tumores de próstata e mama

Projeta Cursos Profissionalizantes, PROJETA, Brasil.

Vínculo institucional

2010 - 2010

Vínculo: Autônoma, Enquadramento Funcional: Docente e Coordenadora Pedagógica, Carga horária: 8

Outras informações

Docente dos cursos profissionalizantes da área de Saúde e coordenadora pedagógica da Unidade Osasco.

Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, ILPC, Brasil.

Vínculo institucional

2009 - 2010

Vínculo: Estagiária, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Atividades

02/2009 - 01/2010

Estágios, Laboratório de Bioinformática, .

Estágio realizado

Elaboração de monografia de conclusão de curso - título: Análise e estudo funcional de variantes de Splicing com expressão diferencial em tecidos tumorais encontrados em bancos de dados de tumores.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Vínculo institucional

2004 - 2008

Vínculo: Estagiária, Enquadramento Funcional: Estágio extra curricular, Carga horária: 8

Atividades

06/2004 - 04/2007

Conselhos, Comissões e Consultoria, Instituto de Biociências - Botucatu.

Cargo ou função

Diretoria - Comissão de formatura Turma XL Ciências Biológicas.

Prêmios e títulos

2014

Travel grant to "Working with Human Genomes", Wellcome Trust Institute.

2012

Travel grant to "AACR Annual Meeting 2012", University of São Paulo (USP).

2012

Melhor trabalho, Latin American School of Human and Medical Genetics (ELAG).

2012

Travel grant to "EBI-Wellcome Trust Summer School in Bioinformatics.", European Bioinformatics Institute (EBI).

2011

Travel grant to "7th International DECIPHER Symposium", Wellcome Trust Institute.

Produção Bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

LINHARES, N. ; SVARTMAN, M. ; SALGADO, M. I. ; **RODRIGUES, T.C.** ; COSTA, S. S. ^{1.} ; Rosenberg, C. ; VALADARES, E. . Dental developmental abnormalities in a patient with subtelomeric 7q36 deletion syndrome may confirm a novel role for the SHH gene. Meta Gene, v. 2, p. 16-24, 2014.

CANTON, A. ; COSTA, S. S. ; **RODRIGUES, T.C.** ; BERTOLA, D. ; MALAQUIAS, F. ; CORREA, F. ; ARNHOLD, I. J. P. ; ROSENBERG, Carla ; JORGE, A. A. L. . Genome-wide screening of copy number variants in children born small for gestational age reveal several candidate genes involved in growth pathways. European Journal of Endocrinology, v. 14, p. 0232, 2014.

ARAUJO, E. S. S. ; MARCHI, F. A. ; **RODRIGUES, T.C.** ; VIEIRA, H. C. ; KUASNE, H. ; ACHATZ, M. I. ; MOREDO, L. F. ; SA, B. C. S. ; DUPRAT NETO, J. P. ; BRENTANI, H. P. ; Rosenberg, C. ; CARRARO, D. M. ; Krepischi, A. C. V. . Genome-wide DNA methylation profile of leukocytes from melanoma patients with and without CDKN2A mutations. *Experimental and Molecular Pathology* (Print), v. 1, p. 1, 2014.

Capelli, Leonardo P. ; Krepischi, Ana C.V. ; Gurgel-Giannetti, Juliana ; Mendes, Mirian Fabiola S. ; **RODRIGUES, T. C.** ; Varela, Monica C. ; Koiffmann, Célia P. . Deletion of the RMGA and CHD2 genes in a child with epilepsy and mental deficiency. *European Journal of Medical Genetics*, v. 55, p. 132-134, 2011.

Livros publicados/organizados ou edições

Silva, Amanda Gonçalves; **RODRIGUES, T.C.** ; Pearson, Peter Lees ; Rosenberg, C. ; Krepischi, A. C. V. . *Germline Genomic Copy Number Variation Contribution to Cancer Predisposition*. 1. ed. , 2013.

Artigos aceitos para publicação

RODRIGUES, T. ; CARVALHO, F. F. ; COSTA, C. M. L. ; FERREIRA, E. N. ; WERNECK, I. ; CARRARO, D. M. ; Krepischi, A. C. V. ; ROSENBERG, Carla . Upregulated genes at 2q24 gains as candidate oncogenes in hepatoblastomas. *Future Oncology*, 2014.

FIDALGO, FELIPE ; **RODRIGUES, T. C.** ; PINILLA, M. ; GONCALVES, A. ; MACIEL, M. S. ; ROSENBERG, Carla ; ANDRADE, V. P. ; CARRARO, D. M. ; Krepischi, A. C. V. . Lymphovascular invasion and histologic grade are associated with specific genomic profiles in invasive carcinomas of the breast. *Tumor Biology*, 2014.

Resumos publicados em anais de congressos

CARVALHO, F. F. ; **RODRIGUES, T. C.** ; Silva, Amanda Gonçalves ; FACURE, L. ; NOBREGA, A. ; SA, B. ; DUPRAT, J. P. ; ACHATZ, M. I. ; ROSENBERG, Carla ; CARRARO, D. M. ; Krepischi, A. C. V. . Rare germline copy number variations in hereditary cutaneous melanoma. In: AACR, 2014, San Diego, CA. Proceedings of the 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. Philadelphia, PA: AACR, 2014. v. 2014. p. Abstract 3418.

RODRIGUES, T.C. ; Krepischi, A. C. V. ; COSTA, C. M. L. ; CARRARO, D. M. ; ROSENBERG, Carla . Characterization of genetic and epigenetic alterations in Hepatoblastoma. In: SPAS Advances in Molecular Oncology, 2013, São Paulo. Clinics (USP. Impresso), 2013.

CARVALHO, F. F. ; GONCALVES, A. ; **RODRIGUES, T.C.** ; FIORINI, A. ; CARRARO, D. M. ; ROSENBERG, Carla ; Krepischi, A. C. V. . Genome-wide profiling of copy number alterations in triple-negative breast cancer identifies a region at 19p13 associated with lymph node metastasis.. In: São Paulo School of Advanced Science: Advances in Molecular Oncology, 2013, São Paulo. Clinics (USP. Impresso), 2013.

Rodrigues, Tatiane ; CARVALHO, F. F. ; FERREIRA, E. N. ; WERNECK, I. ; COSTA, C.M.L. ; CARRARO, DIRCE ; KREPISCHI, A.C.V. ; Rosenberg, C. . Data integration aiming to identify driver regions of embryonic liver tumor. In: Advanced Topics in Genomics and Cell Biology, 2013, Campinas. Advanced Topics in Genomics and Cell Biology, 2013. v. 1.

Rodrigues, Tatiane ; CARVALHO, F. F. ; FERREIRA, E. N. ; WERNECK, I. ; COSTA, C. M. L. ; CARRARO, D. M. ; Krepischi, A. C. V. ; ROSENBERG, Carla . An integrated approach to identify candidate driver regions of Hepatoblastoma. In: Next Frontiers to Cure Cancer - Integrating science and patient care, 2013, São Paulo. Applied Cancer Research. São Paulo, 2013. v. 2013. p. 93.

CARVALHO, F. F. ; **Rodrigues, Tatiane** ; ARAUJO, E. ; CARRARO, D. M. ; ROSENBERG, Carla ; ANDRADE, V. P. ; Krepischi, A. C. V. . Breast Cancer DNA Copy Number Alterations profiling according to histologic grade and vascular invasion status. In: Next Frontiers to Cure Cancer - Integrating science and patient care, 2013, São Paulo. Next Frontiers to Cure Cancer, 2013. v. 2013.

CANTON, A. ; **RODRIGUES, T. C.** ; KREPISCHI, A.C.V. ; ARNHOLD, I. J. P. ; MENDONCA, B. B. ; ROSENBERG, Carla ; JORGE, A. A. L. . Pesquisa de deleções e duplicações cromossômicas submicroscópicas em pacientes dismórficos nascidos pequenos para idade gestacional. In: 10o Congresso Paulista de Endocrinologia e Metabologia (COPEM), 2013, São Paulo. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 2013. v. 57. p. 47.

VIEIRA, H. C. ; Krepischi, A. C. V. ; ARAUJO, E. ; **RODRIGUES, T.C.** ; POLPO, A. ; PEREIRA, C. ; ANDRADE, D. C. A. ; GALHARDONI, R. ; FERRAZ, T. C. ; GOUVEIA, G. R. ; BRENTANI, H. P. . Methylation analysis of Infinium HumanMethylation450 beadchip. In: X-meeting, 2013, Recife. BSB - X-meeting 2013, 2013. v. 2013.

FIDALGO, FELIPE ; **RODRIGUES, T. C.** ; ARAUJO, E. ; CARRARO, D. M. ; ROSENBERG, Carla ; Krepischi, A. C. V. . BREAST CANCER DNA COPY NUMBER ALTERATIONS PROFILING ACCORDING TO HISTOLOGIC GRADE AND VASCULAR INVASION STATUS. In: Next Frontiers to Cure Cancer - Integrating Science and Patient Care, 2013, São Paulo. Applied Cancer Research. São Paulo, 2013. v. 33. p. 90.

RODRIGUES, T. ; CARVALHO, F. F. ; Krepischi, A. C. V. ; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. ; Rosenberg, C. . Identification of CNA signatures in prostate cancer: Narrowing chromosome regions related with occurrence, prognosis and recurrence after treatment. In: AACR Annual Meeting, 2012, Chicago - IL. Proceedings of the 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. Philadelphia - PA: AACR, 2012. v. 103rd.

RODRIGUES, T. ; Krepischi, A. C. V. ; COSTA, C. M. L. ; CARRARO, D. M. ; Rosenberg, C. . Patterns of genomic imbalances in hepatoblastomas. In: EBI - Wellcome Trust Summer School in Bioinformatics, 2012, Hinxton. 2012 EBI-Wellcome Trust Summer School in Bioinformatics, 2012.

RODRIGUES, T. ; Krepischi, A. C. V. ; MASCHIETTO, M. ; COSTA, C. M. L. ; CARRARO, D. M. ; Rosenberg, C. . Patterns of genomic imbalances in liver embryonic tumors. In: Latin American School of Human and Medical Genetics, 2012, Caxias do Sul. VIII ELAG, 2012.

CANTON, A. ; **RODRIGUES, T. C.** ; Krepischi, A. C. V. ; ARNHOLD, I. J. P. ; MENDONCA, B. B. ; Rosenberg, C. ; JORGE, A. A. L. . High frequency of submicroscopic chromosomal deletions and duplications in dysmorphic patients born small for gestational age.. In: 51st Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology, 2012, Leipzig. Hormone Research in Paediatrics, 2012. v. 78. p. 98-98.

Rodrigues, Tatiane ; Krepischi, A. C. V. ; COSTA, C. M. L. ; CARRARO, D. M. ; ROSENBERG, Carla . Global profiling of DNA methylation in Hepatoblastoma. In: IV Encontro Nacional de Epigenética, 2012, São Paulo. IV Encontro Nacional de Epigenética, 2012. v. IV.

Rodrigues, Tatiane ; Krepischi, A. C. V. ; COSTA, C. M. L. ; CARRARO, D. M. ; ROSENBERG, Carla . Mining genomic imbalances in Hepatoblastoma. In: 8th International Conference of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology - X-meeting, 2012, Campinas. X-meeting 2012, 2012. v. 8th.

CARVALHO, F. F. ; GONCALVES, A. ; **RODRIGUES, T.C.** ; FIORINI, A. ; CARRARO, D. M. ; ROSENBERG, Carla ; Krepischi, A. C. V. . Genome-wide profiling of copy number alterations in triple-negative breast cancer identifies a region at 19p13 associated with lymph node metastasis.. In: São Paulo Advanced School of Comparative Oncology, 2012, Aguas de São Pedro. São Paulo Advanced School of Comparative Oncology, 2012.

Rodrigues, Tatiane ; Krepischi, A. C. V. ; MASCHIETTO, M. ; COSTA, C. M. L. ; CARRARO, D. M. ; ROSENBERG, C. . Genetic and Epigenetic Alterations in the Embryonic Tumor Hepatoblastoma. In: 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 2012, Barcelona. European Journal of Cancer, 2012. v. 48. p. S25-S288.

RODRIGUES, T. C. ; CARVALHO, F. F. ; CAMPOS, A. H. J. F. M. ; Krepischi, A. C. V. ; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. ; ROSENBERG, C. . Narrowing the chromosome driver regions in prostate cancer by array-CGH. In: Global Meeting of Translational Science, 2011, São Paulo. 2nd São Paulo Global Meeting of Translational Science, 2011.

RODRIGUES, T. C. ; Krepischi, A. C. V. ; BERTOLA, D. ; KOK, F. ; ROSENBERG, C. . Array-CGH in mental retardation and congenital abnormalities. In: 2ª Reunião Brasileira de Citogenética, 2011, Águas de Lindóia. Reunião Brasileira de Citogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2011. v. 2º.

LINHARES, N. ; SVARTMAN, M. ; **RODRIGUES, T. C.** ; ROSENBERG, C. ; VALADARES, E. . Subtelomeric 6p25 Deletion Syndrome: complex rearrangement involving the FOXC1, FOXF2 and NRX1 genes. In: Encontro Internacional de Anomalias Craniofaciais, 2011, Bauru. Encontro Internacional de Anomalias Craniofaciais: Fenótipo Clínico, Genes Relacionados e Novas Perspectivas, 2011.

RODRIGUES, T. C. ; CARVALHO, F. F. ; CAMPOS, A. H. J. F. M. ; Krepischi, A. C. V. ; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. ; ROSENBERG, C. . Narrowing the chromosome driver regions in prostate cancer by array-CGH. In: 57º Congresso Brasileiro de Genética, 2011, Águas de Lindóia. 57º Congresso Brasileiro de Genética, 2011.

RODRIGUES, T. C. ; Krepischi, A. C. V. ; BERTOLA, D. ; KOK, F. ; ROSENBERG, C. . The logistics and result of array CGH diagnosis in mental retardation and congenital abnormalities in Brazil.. In: 7th International DECIPHER Symposium - Wellcome Trust Sanger Centre, 2011, Hixton, Cambridge. 7th International DECIPHER Symposium - Wellcome Trust Sanger Centre, 2011.

RIBEIRO-BICUDO, L. A. ; ZECHI-CEID, R. M. ; GUION-ALMEIDA, M. ; RICHIERI-COSTA, A. ; **RODRIGUES, T. C.** ; Krepischi, A. C. V. ; ROSENBERG, C. . Alobar holoprosencephaly in two sibs: deletion of chromosome 17. In: European Human Genetics Conference, 2011. EHSG 2011.

CANTON, A. ; **RODRIGUES, T. C.** ; Krepischi, A. C. V. ; CORREA, F. ; ARNHOLD, I. J. P. ; MENDONÇA, B. B. ; ROSENBERG, C. ; JORGE, A. A. L. . Alta frequência de deleções e duplicações cromossômicas submicroscópicas em pacientes dismórficos nascidos pequenos para a idade gestacional (PIG). In: COPEM, 2011, São Paulo. COPEM 2011, 2011.

da CUNHA, J. P. ; **RODRIGUES, T. C.** ; de SOUZA, J. E. ; GALANTE, P. A. F. ; SOUZA, S. J. . Does tumor somatic mutation affect the Splicing pattern?. In: 5th International Conference of the AB3C X-meeting, 2009, Angra dos Reis - RJ. 5th International Conference of the AB3C X-meeting, 2009. v. TP4. p. 81-81.

RODRIGUES, T. C. ; da CUNHA, J. P. ; GALANTE, P. A. F. ; de SOUZA, J. E. ; SOUZA, S. J. . New alternative splicing variants in breast cancer. In: 5th International Conference for the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology, 2009, Angra dos Reis - RJ. Fifth International Conference for the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology, 2009. v. GE35. .