DANIELLE FERREIRA E SILVA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RETROVÍRUS ENDÓGENOS HUMANOS EM
PACIENTES COM NEUROBLASTOMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2016

DANIELLE FERREIRA E SILVA

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RETROVÍRUS ENDÓGENOS HUMANOS EM
PACIENTES COM NEUROBLASTOMA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto

Versão original

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Danielle Ferreira e.

Avaliação da expressão de retrovírus endógenos humanos em
pacientes com neuroblastoma / Danielle Ferreira e Silva. -- São Paulo,
2016.

Orientador: Prof. Dr. Paolo Marinho Andrade Zanotto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração:
Microbiologia. Linha de pesquisa: Retrovírus e câncer.

Versão do título para o inglês: Human endogenous retrovirus
expression in neuroblastoma.

1. HERV 2. Biologia molecular 3. Sequenciamento de nova geração
4. Neuroblastoma 5. Virologia 6. Câncer I. Zanotto, Prof. Dr. Paolo
Marinho Andrade II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB064/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Danielle Ferreira e Silva.

Título da Tese: Avaliação da expressão de retrovírus endógenos humanos em pacientes com neuroblastoma.

Orientador(a): Prof. Dr. Paolo Marinho Andrade Zanotto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do padrão de expressão dos retrovírus endógenos de humanos em pacientes com neuroblastoma

Pesquisador: Paolo Marinho de Andrade Zanotto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 08296412.1.0000.5467

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 187.686

Data da Relatoria: 22/11/2012

Apresentação do Projeto:

Avaliação do padrão de expressão dos retrovírus endógenos humanos em pacientes com neuroblastoma

Pesquisador Responsável: Paolo Marinho de Andrade Zanotto

Instituição onde se realiza: Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Objetivo da Pesquisa:

Estudar o padrão de expressão dos retrovírus endógenos humanos (HERV-K, HERV-W e HERV-H) em pacientes diagnosticados com neuroblastoma avaliando a expressão gênica quantitativamente em fragmentos tumorais, mapear no genoma humano os "loci" específicos dos HERV expressos e avaliar a possibilidade de utiliza-los como marcadores tumorais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Amostras deverão ser obtidas dentro de procedimentos rotineiros para o quadro clínico. O projeto se propõe a determinar a presença de possíveis marcadores tumorais que podem permitir um diagnóstico precoce, reduzindo as chances do tumor evoluir para fase metastática. Para a saúde da população, o benefício é inestimável.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O neuroblastoma é um tumor comum e de elevada letalidade em crianças, podendo regredir espontaneamente ou evoluir muito rapidamente. Diversos tipos virais podem levar ao desenvolvimento de neoplasias por diferentes mecanismos. Diversas famílias de retrovírus

Endereço: Av. Profª Lineu Prestes, 2415

Bairro:

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município:

Telefone: (113)091-7733

Fax: (113)091-8405

E-mail: pzanotto@usp.br; cep@icb.usp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

endógenos (HERV) estão presentes no genoma humano e podem ser ativamente expressos em várias situações. Sua atividade é tecido-específica, fato este que os relaciona a patologias como cânceres, doenças autoimunes, etc. O projeto visa avaliar a expressão destes tipos virais em pacientes diagnosticados com neuroblastoma, mapear no genoma humano os loci específicos dos HERV expressos. Além disso, a pesquisa visa avaliar a possibilidade de determinar a presença de marcadores tumorais, uma vez que não há diagnóstico precoce, mas apenas quando o tumor encontra-se na fase tardia, metastática. A obtenção dos materiais clínicos já foi aprovada pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP sob Protocolo No. 666/01. Trata-se de tecidos tumorais excisados de um total de 15 pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de neuroblastoma. Uma alíquota de cada material será doada para realização do presente estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A responsabilidade de obtenção das amostras, bem como do contato e a obtenção de autorizações dos pacientes doadores é do Departamento de Pediatria do Hospital das Clínicas e já foi aprovada pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP sob Protocolo No. 666/01.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

22 de Janeiro de 2013

Assinador por:
Regina Scivoletto
(Coordenador)

Endereço: Av. Profª Lineu Prestes, 2415

Bairro:

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município:

Telefone: (113)091-7733

Fax: (113)091-8405

E-mail: pzanotto@usp.br, cep@icb.usp.br

FUNDAÇÃO PIO XII -
HOSPITAL DE CÂNCER DE
BARRETOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do padrão de expressão dos retrovírus endógenos humanos em pacientes com neuroblastoma

Pesquisador: Robson de Castro Coelho

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 08296412.1.2002.5437

Instituição Proponente: FUNDACAO PIO XII

Patrocinador Principal: Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 629.766

Data da Relatoria: 30/04/2014

Apresentação do Projeto:

O Neuroblastoma é um tumor sólido que afeta principalmente crianças e possui um comportamento clínico bastante heterogêneo. Os casos de maior risco podem levar ao óbito e há uma ausência de biomarcadores para esta doença que possam auxiliar na melhor caracterização da mesma. Os endoretrovírus tem sido descritos como potenciais agentes etiopatogênicos em diversos tipos de tumores sólidos e não há ainda uma associação descrita destes como o Neuroblastoma

Objetivo da Pesquisa:

- Avaliar a presença da expressão de algumas famílias de endoretrovírus em Neuroblastomas; - Identificar os locais destes expressos e definir a presença da expressão destes endoretrovírus como um possível biomarcador em Neuroblastomas.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br

FUNDAÇÃO PIO XII - HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS

Continuação do Parecer: 629.766

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não é possível identificar riscos diretos aos participantes da pesquisa, já que trata-se de estudo com de pacientes já submetidos ao tratamento da doença de base. Os potenciais riscos são inerentes à confidencialidade dos dados dos participantes de pesquisa. Também não há benefício direto aos participantes da pesquisa, pois, ainda que o estudo identifique um biomarcador, associações prognósticas e preditivas de resposta ao tratamento estará limitado pelo tamanho amostral proposto. O benefício indireto é visto pelo melhor entendimento da doença com este estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários adicionais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos referentes a Resposta das Pendências apontadas foram devidamente apresentados de forma adequada

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1. Item de Pendência:

O pesquisador refere que não solicita dispensa do TCLE, e apresenta um TCLE que será aplicado apenas para as amostras de tecido normal que não serão fornecidas por esta instituição (Hospital de Câncer de Barretos). Portanto, é necessário esclarecer que solicita a dispensa do TCLE para esta instituição ou apresentar o TCLE que será aplicado neste serviço.

Resposta:

Foi realizada a alteração na plataforma Brasil, solicitando a dispensa do TCLE. Segue a justificativa de que a dispensa só será solicitada ao HCB e ao ITACI. Em relação ao HCB a solicitação se justifica pelo projeto apresentar riscos mínimos aos sujeitos de pesquisa uma vez que as amostras serão obtidas de forma retrospectiva e já constam armazenadas no Biobanco da Instituição. Sendo assim, segue em anexo uma carta solicitando a dispensa de TCLE para os sujeitos de pesquisa para os quais as amostras serão provenientes do HCB. Em anexo ao processo, também enviamos

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331		
Bairro: Dr. Paulo Prata		CEP: 14.784-400
UF: SP	Município: BARRETOS	
Telefone: (17)3321-0347	Fax: (17)3321-6600	E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br

FUNDAÇÃO PIO XII - HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS

Continuação do Parecer: 629.766

ua carta solicitando e justificando a dispensa de TCLE para os pacientes dessa instituição. Além disso, as amostras provenientes do HCB não serão armazenadas em biorepositório no centro coordenador. Será fornecida apenas aliquota de RNA suficiente para o estudo que está sendo proposto.

Análise: Pendência Atendida.

2. Item de Pendência:

O pesquisador, no item 'Riscos', aponta a resposta 'não se aplica'. É necessário elaborar melhor este ponto.

Resposta:

O item "Riscos", na plataforma Brasil, foi alterado. Ainda, para o HCB, no tópico outras informações consta em relação aos riscos: "O projeto proposto apresenta riscos mínimos ao sujeito de pesquisa. Estes riscos dizem respeito a quebra accidental de sigilo das informações dos mesmos. Os pesquisadores garantem tomar todas as precauções necessárias para minimizar estes riscos.". Essa informação também foi incluída no texto do projeto original.

Análise: Pendência Atendida.

3. Item de Pendência:

Revisor Técnico: Em relação as amostras do HCB, no projeto o pesquisador relata (item Pacientes diagnosticados com Neuroblastoma Hospital de Câncer de Barretos) que o RNA extraído será armazenado em uma solução conservante (RNA later) e depois estocado em freezer. Além disso, é relatado que as amostras serão maceradas em nitrogênio líquido, e este não é o procedimento rotineiramente realizado pelo Biobanco do HCB para pesquisa. Sendo assim, sugiro adequação da metodologia proposta em que as amostras criopreservadas serão processadas para obtenção do RNA seguindo os procedimentos padronizados pelo Biobanco-HCB. Esta adequação é de suma importância para viabilização da etapa de processamento e fornecimento de material genético pelo Biobanco ao pesquisador, em aliquotas previamente determinadas institucionalmente.

Resposta:

As alterações solicitadas foram incorporadas ao corpo do projeto principal e na plataforma Brasil.

Análise: Pendência Atendida.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br

FUNDAÇÃO PIO XII -
HOSPITAL DE CâNCER DE
BARRETOS

Continuação do Parecer: 629.766

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital do Câncer de Barretos ANALISOU as pendências do referido projeto e decidindo que o mesmo encontra-se APROVADO.

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios semestrais, sendo o primeiro previsto para 17/10/2014.
2. Para projetos que utilizam amostras criopreservadas, procurar o Biobanco para início do processamento.
5. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.
6. Este projeto está cadastrado no CEP-HCB sob o número 762/2013.

BARRETOS, 29 de Abril de 2014

Assinador por:
Sergio Vicente Serrano
(Coordenador)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - HU/USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do padrão de expressão dos retrovírus endógenos humanos em pacientes com neuroblastoma

Pesquisador: Paolo Marinho de Andrade Zanotto

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 08296412.1.0000.5467

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

Patrocinador Principal: Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 416.025

Data da Relatoria: 27/09/2013

Apresentação do Projeto:

Avaliação do padrão de expressão dos retrovírus endógenos humanos em pacientes com neuroblastoma. Pesquisador: Paolo Marinho de Andrade Zanotto. Instituição proponente ICB/USP. Participam também o Hospital de Câncer de Barretos, o ITACI, a FMUSP e o HU.

A justificativa desta pesquisa decorre do neuroblastoma ser o tumor sólido mais comum e com maior índice de letalidade em crianças. Além disso, o neuroblastoma possui um comportamento atípico, pois pode regredir espontaneamente ou apresentar um comportamento muito agressivo, evoluindo e espalhando-se rapidamente. Os vírus também são considerados agentes etiológicos para o desenvolvimento de neoplasias, pois são capazes de induzir a imunossupressão, modificar o genoma da célula hospedeira com produção direta de oncoproteínas, inibição de genes supressores de tumor, ou alterar a expressão das proteínas das células hospedeiras no sítio de integração do DNA viral. Diversas famílias de retrovírus endógenos (HERV) estão presentes no genoma humano, em diferentes graus de integridade, e são ativamente expressos frente a distintas condições. A atividade de HERVs é geralmente tecido-específica, e tem sido cada vez mais relacionada a patologias como câncer, doenças autoimunes e até com a presença de outros vírus. Embora existam estudos da estrutura, função e impacto dos HERVs no genoma hospedeiro, os fatores que levam aos diferentes padrões de expressão dos mesmos ainda

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2565

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11-)3091-9457

Fax: (11-)3091-9452

E-mail: cep@hu.usp.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - HU/USP

Continuação do Parecer: 416.025

não são compreendidos. Fundamentalmente, este projeto tem como objetivo central avaliar o padrão de expressão de retrovírus endógenos de diferentes famílias em pacientes diagnosticados com neuroblastoma. Assim, será investigado, utilizando-se a técnica de PCR em tempo real, o padrão de expressão das famílias de retrovírus endógenos (HERV-K, HERV-W e HERV-H) em fragmentos de neuroblastoma.

Objetivo da Pesquisa:

Estudar o padrão de expressão dos retrovírus endógenos humanos (HERV-K, HERV-W e HERV-H) em pacientes diagnosticados com neuroblastoma avaliando a expressão gênica quantitativamente em fragmentos tumorais, mapear no genoma humano os "loci" específicos dos HERV expressos e avaliar a possibilidade de utiliza-los como marcadores tumorais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos dos pacientes doentes é o mesmo decorrente de seu diagnóstico. A participação específica do HU e no fornecimento de amostras para o grupo controle, estando previsto um N de 10 pacientes falecidos e submetidos a necrópsia no HU, sendo critério de exclusão serem portadores de neoplasia. Como critérios de inclusão estão a assinatura do responsável no TCLE.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Destina-se ao doutorado da aluna: Danielle Ferreira e Silva . Orientador: Paolo Marinho de Andrade Zanotto. Co-orientadora: Camila Malta Romano . Colaboradores: José Alexandre Marzagão Barbuto, Vicente Odone Filho , Maria Claudia N. Zerbini, Aloísio Souza Felipe da Silva e Robson de Castro Coelho

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Este projeto foi iniciado em 2006 como um projeto no ITACI/FMUSP para tratamento do neuroblastoma, já tendo sido aprovado no CAPPesq Nº 661/01. Esta é a fonte das amostras dos 20 doentes com neuroblastoma. OS 10 controles serão coletados aqui no HU, após assinatura do TCLE, onde é esclarecido que a amostra será guardada no biorrepositório do LEMB (Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática - LEMB do ICB II.

Recomendações:

Não existem.

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2565

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11-)3091-9457

Fax: (11-)3091-9452

E-mail: cep@hu.usp.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - HU/USP

Continuação do Parecer: 416.025

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 04 de Outubro de 2013

Assinador por:

SIMONE DOS REIS BRANDÃO DA SILVEIRA
(Coordenador)

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2565

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11-)3091-9457

Fax: (11-)3091-9452

E-mail: cep@hu.usp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do padrão de expressão dos retrovírus endógenos humanos em pacientes com neuroblastoma

Pesquisador: Paolo Marinho de Andrade Zanotto

Área Temática:

Versão: 7

CAAE: 08296412.1.0000.5467

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

Patrocinador Principal: Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 784.741

Data da Relatoria: 05/09/2014

Apresentação do Projeto:

Título da Pesquisa: Avaliação do padrão de expressão dos retrovírus endógenos humanos em pacientes com neuroblastoma

Pesquisador: Paolo Marinho de Andrade Zanotto

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

Objetivo da Pesquisa:

Trata-se de emenda na qual os Pesquisadores solicitam a inclusão de mais um centro de coleta de amostras.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem alteração em relação ao projeto inicial já aprovado e em andamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Até o presente momento, apenas uma amostra controle foi coletada. Está sendo solicitada uma nova colaboração com o Serviço de Verificação de Óbitos visando alcançar o número de casos controle proposto para o projeto. Portanto, esta emenda tem como objetivo adicionar ao projeto um novo centro de coleta de amostras controle.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sem alteração ao projeto inicial, aprovado e em andamento.

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

Fax: (11)3091-8405

E-mail: cep@icb.usp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 784.741

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 09 de Setembro de 2014

Assinado por:
Regina Scivoletto
(Coordenador)

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

Fax: (11)3091-8405

E-mail: cep@icb.usp.br

À minha mãe Maristela e meu irmão Guilherme
pelo eterno apoio e por nunca me deixarem
desistir, principalmente nos momentos em que
acreditei não ter mais forças para continuar.
Vocês são a razão da minha vida! Amo vocês!
Ao meu pai Nilton, *in memoriam*,
que até o seu último suspiro não deixou de lutar
e me ensinou a não desistir nunca!
A saudade que sinto do senhor é imensurável!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a duas pessoas igualmente essenciais em minha vida: minha mãe, Maristela, e meu irmão, Guilherme. Agradeço a vocês pelo amor incondicional, carinho, por me respeitarem, mesmo nos momentos em que cometo erros e, principalmente, por serem meu porto seguro, onde sempre posso me reconfortar. Obrigada por vocês existirem! Amo vocês infinitamente!

Ao meu namorado, Lamon, por todo carinho, companheirismo, amor, apoio e compreensão nos momentos mais difíceis e estressantes e por me dar forças para não desistir. Obrigada pela ajuda profissional com os programas e análises finais, fique tranquilo pois você será incluído nas publicações! rsrs... Brincadeiras à parte... Saiba que você se tornou parte essencial de mim e sem você eu não teria conseguido! Muito obrigada! Amo muito você!

Ao Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto, meu orientador, por confiar no meu potencial e por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar este trabalho tão importante. Agradeço pela sua atenção, orientação e por servir de incentivo para que eu superasse meus limites pessoais e acadêmicos.

Á Profa. Dra. Camila Malta Romano, minha co-orientadora, por estar sempre disposta a me ajudar, mesmo com os deadlines batendo a nossa porta, pelas dicas valiosas, pelos ensinamentos e pela orientação. Você foi extremamente fundamental para a conclusão deste trabalho, sendo que sem sua ajuda, eu não teria conseguido! Aproveito o momento para pedir desculpas pelos excessos de vírgulas, pelas trocas das preposições do HERV pelo de HERV e que você incansavelmente removeu! rsrs...

Ao Prof. Dr. Aloísio Souza Felipe da Silva, patologista extremamente competente que muito me ensinou e auxiliou durante a fase de processamento e análises histológicas e imunohistoquímicas das amostras controle. Obrigada pela atenção e por estar sempre de prontidão a me ajudar!

Aos colaboradores Prof. Dr. José Alexandre Mazargão Barbuto (ICB IV – USP), Dr. Vicente Odone Filho (ITACI), Dr. Robson de Castro Coelho (Hospital de Câncer de Barretos), Dr. Daniel Onofre Vidal (Hospital de Câncer de Barretos) e Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva (HC-USP) sem os quais a obtenção de amostras não seria possível, assim como a execução deste trabalho não teria acontecido.

Aos funcionários Patrícia Cruz Bergami Santos (ITACI), Julie Francine Cerutti Santos (Hospital de Câncer de Barretos), André Lengert (Hospital de Câncer de Barretos), Nilton Fontes Neuman (SVO), assim como todos médicos, residentes, enfermeiros e funcionários por se disponibilizarem a coletar e por ajudar no envio das amostras e informações clínicas dos pacientes. Obrigada pela dedicação e por disponibilizarem parte de seu tempo para colaborar com este estudo.

Ao meu amigo eterno Victor, pela amizade e apoio, principalmente nos momentos mais sombrios durante o desenvolvimento deste trabalho, pelas madrugadas infinitas de experimentos acompanhados de pizza, choros e risos. Enfrentamos muitas dificuldades juntos, brigamos, nos reconciliamos e, finalmente, nos tornamos cientistas. Obrigada por fazer parte desta etapa tão importante em minha vida e por não ter me deixado desistir nunca! Adoro você Vi!!

Aos ex-Lembianos Julian e Anderson pela amizade, risadas (“vamo no indiano, “mew”), trocas de experiências, ajudas com programas de bioinformática (“tem o jeito fácil e o inteligente de se fazer”), pelas planilhas excel (“Sucesso”) e pelas madrugadas de trabalho.

Vocês me ensinaram que para ser um bom profissional e fazer uma ciência de qualidade, depende única e exclusivamente de nosso próprio empenho e dedicação.

Á minha amiga, Mirian Morale, por todos os ensinamentos sobre PCR em tempo real, por estar sempre pronta a me ajudar, mesmo nos momentos em que tinha mais um milhão de coisas para fazer, por me mostrar o lado encantador da bioquímica e por fazer com que eu descobrisse uma nova paixão dentro da ciência.

Á minha nova amiga-irmã, Suellen, pela amizade, por todo o carinho, força, apoio, por participar nas elaborações das receitas do futuro restaurante “Mixturin”, pelas longas madrugadas filosóficas sobre ciência, câncer, biologia, Grécia, Asclepiades... e, principalmente, por me mostrar o que é a verdadeira paixão em se fazer ciência.

A todos os novos amigos que fiz durante esta empreitada: Cristina, Vanesca, Walason, Rafaela, Andressa, Stella, Rodrigo e Suzanne. Muito obrigada pela amizade e carinho.

À minha amiga e ex-companheira de república, Tamira, pela amizade, carinho, longas noites de conversas infinitas, por me ensinar muitas coisas sobre a cultura oriental, por ser parceira o suficiente para encarar um jantar com frango caipira e por me apoiar e ajudar em muitos momentos extremamente delicados de minha vida.

Aos meus amigos Murillo e Luiz Felipe (PA) por permitirem que eu ficasse na república durante a fase final de escrita da tese, ou seja, por meses...rsrs. Gostaria de agradecer, em especial, o Murillo por me emprestar seus computadores para rodar as análises da tese.

Á minha tia-mãe, Regina, e meu primo-irmão, Mateus, por todo o amor e carinho que sempre me deram, por sempre cuidarem, torcerem por mim e acreditarem na minha vitória. Amo vocês!

À minha amiga-irmã dos tempos de faculdade, Cristiane (Funikete), pela eterna amizade (construída na melhor época de nossas vidas em Botucatu), por estar sempre me apoiando e me dando força para superar os perrengues da vida, sabendo que posso contar sempre com você mesmo estando longe.

Á minha amiga, Heloisa (K-lúnia), pela amizade e companheirismo, pelas loucas aventuras em Botucatu, São Paulo e em Minas Gerais, por me emprestar sua família nos vários domingos em que eu estava sozinha nesta selva de pedra e por me encorajar e realizar o sonho de viajar para o exterior (nossa viagem foi demais e estará para sempre guardada em minha memória).

Às minhas amigas “das Minas Gerais”, Mirian Bueno e Tabata, pela amizade de muitos anos, carinho, pelos conselhos e apoio, por emprestarem seus ouvidos por muitas e muitas vezes para ouvir minhas lamentações e medos.

Á todos os lembianos, Suzanne, Marielton, Nicholas, Shahab, Daniel, Carla e Érica e ex-lembianos Juliana, Atila, Caio e Fernando que de alguma forma fizeram parte dessa longa jornada de mais de cinco anos.

Á todos os pacientes deste estudo, que contribuíram diretamente com este trabalho e sem os quais, nada seria possível.

Á FAPESP e CAPES, pelo financiamento e pela concessão da bolsa de Doutorado que tornaram possível a realização deste trabalho.

“... debaixo do sol, nem tudo são vaidades, como quer o Eclesiastes, nem tudo perfeições, como opina o Doutor Pangloss; entendia que há larga ponderação de males e bens, e que a arte de viver consiste em tirar o maior bem do maior mal.”

Machado de Assis

RESUMO

FERREIRA E SILVA, D. **Avaliação da expressão de retrovírus endógenos humanos em pacientes com neuroblastoma.** 2016. 170 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016

O neuroblastoma é o tumor sólido mais comum e com maior índice de letalidade em crianças. De maneira geral, aproximadamente 15 a 20 por cento de todas as neoplasias podem ser associadas às infecções virais persistentes, uma vez que os vírus são capazes de induzir a imunossupressão, modificar o genoma da célula hospedeira, bem como as vias metabólicas celulares. Diversas famílias de retrovírus endógenos humanos (HERV) estão presentes no genoma humano, em diferentes níveis de integridade, e são reativadas sob diferentes circunstâncias. A atividade de HERV é geralmente tecido-específica e tem sido cada vez mais associada a doenças como câncer, doenças autoimunes e ainda com a infecção por vírus exógenos. Embora o impacto de HERV no genoma do hospedeiro, bem como os aspectos estruturais e funcionais tenham sido explorados, as razões que levam a expressão diferencial destes ainda não são compreendidas. O principal objetivo deste projeto foi avaliar a expressão de retrovírus endógenos das famílias H (HH), W (HW) e K (HK) em pacientes diagnosticados com neuroblastoma. Dezenove amostras tumorais e vinte e duas amostras controle foram submetidas a extração de RNA total, síntese de cDNA e PCR em fase única, método validado *in house*. Como resultado, os transcritos da família HW e HH foram detectados em ambos os grupos, tumoral e controle. Curiosamente, a expressão HK foi apenas detectada nas amostras controle. Os produtos de HERV foram submetidos ao sequenciamento em larga escala para determinar a origem específica dos transcritos. No total, 43 *loci* de HH e 11 *loci* de HW foram diferencialmente expressos entre os grupos ($p < 0,05$) e 308 *loci* de HK foram detectados. As análises de expressão somadas ao contexto genético e epigenético de neuroblastoma, permitiram com que várias hipóteses fossem levantadas acerca da regulação da expressão de HERV neste tumor. A hipometilação geral do tecido tumoral pode ter um papel importante na expressão gênica e na reativação de retrotransposons, podendo ser a principal razão para a expressão de HERV neste contexto. Apesar de consistir em uma pesquisa básica, este estudo instaurou possibilidades para que estudos futuros possam validar e determinar o real papel de HERV na tumorigênese de neuroblastoma.

Palavras chave: Retrovírus Endógenos Humano. Neuroblastoma. Expressão gênica. Mapeamento. *Locus*-específico.

ABSTRACT

FERREIRA E SILVA, D. **Human endogenous retroviruses expression in neuroblastoma**. 2016. 170 p. PhD. Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Neuroblastoma represents the most common solid tumor as well as the most lethal form of tumor in children. Overall, about 15 to 20 percent of all neoplasias can be associated with persistent viral infections, since viruses have been associated with immunosuppression and also with host genome and cellular metabolic pathways modifications. Several families of human endogenous retroviruses (HERV) are present in human genome in different integrity levels, and they are reactivated under different circumstances. HERV activity is usually tissue-specific and it has been linked to diseases such as cancer, autoimmune diseases and even with the infection by exogenous viruses. Although the impact of HERVs in host genome as well as their structural and functional aspects has been explored, the reasons that lead to a differential expression are not understood. The main goal of this project was to evaluate the expression of endogenous retroviruses families H (HH), W (HW) and K (HK) in patients diagnosed with neuroblastoma. Nineteen tumor samples and twenty two control samples were subjected to RNA extraction and a single round in-house RT-PCR. As a result, transcripts of the family HW and HH were detected in both tumor and control groups. Interestingly, HK expression was only detected in the control samples. HERVs amplicons were next generation sequenced to access the specific origin of transcripts. Overall 43 HH *loci* and 14 HW *loci* were differentially expressed between groups ($p < 0,05$) and, 308 HK *loci* was detected. Taken together, HERV expression analysis and genetic and epigenetic context of neuroblastoma provided several hypotheses about regulation of HERV expression in this type of tumor. The global hypomethylation of tumoral tissue may have a role in genes expression and retrotransposons reactivation, which may be the main reason for HERV expression in this context. Despite it consisted in a basic research, we could envisage possibilities for future studies to determine the actual role of HERV in tumorigenesis of neuroblastoma.

Keywords: Human endogenous retroviruses. Neuroblastoma. Gene expression. Mapping. *Locus*-specific.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - INCIDÊNCIA E MORTALIDADE DE CÂNCER NO BRASIL E NO MUNDO.....	30
FIGURA 2 - INTEGRIDADE DO RNA.....	54
FIGURA 3 - QUANTIDADE DE DNA NECESSÁRIA PARA SEQUENCIAMENTO POR SANGER.....	58
FIGURA 4 - <i>PIPELINE</i> UTILIZADO PARA MONTAGEM DAS SEQUÊNCIAS.....	63
FIGURA 5 - DISSECAÇÃO AMOSTRA CONTROLE CO-05.....	67
FIGURA 6 - GLÂNDULA ADRENAL NORMAL (CONTROLE POSITIVO).....	68
FIGURA 7 - AUTÓLISE LEVE, HEMORRAGIA DISCRETA E PRESENÇA DE REGIÃO MEDULAR.....	69
FIGURA 8 - AUTÓLISE MODERADA, HEMORRAGIA DISCRETA E PRESENÇA DA REGIÃO MEDULAR.	70
FIGURA 9 - DEGRADAÇÃO LEVE, AUSÊNCIA DE HEMORRAGIA E PRESENÇA DE REGIÃO MEDULAR.	71
FIGURA 10 - DEGRADAÇÃO INTENSA, HEMORRAGIA DISCRETA E PRESENÇA DA REGIÃO MEDULAR	72
FIGURA 11 - MÉDIA DE FRAGMENTAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DAS AMOSTRAS TUMORAIS NN06, NN07 E NN08 PARA AS FAMÍLIAS H, W E K.....	79
FIGURA 12 - ANÁLISE DE <i>HEATMAP</i> DA EXPRESSÃO DE RETROVÍRUS ENDÓGENOS HUMANOS FAMÍLIA K.....	96
FIGURA 13 - ANÁLISE DE <i>HEATMAP</i> DA EXPRESSÃO DE RETROVÍRUS ENDÓGENOS HUMANOS FAMÍLIA H.	102
FIGURA 14 - ANÁLISE DE <i>HEATMAP</i> DA EXPRESSÃO DE RETROVÍRUS ENDÓGENOS HUMANOS FAMÍLIA W	103
FIGURA 15 - CARACTERÍSTICAS COMUNS DO DESENVOLVIMENTO TUMORAL.	119

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SISTEMA DE ESTADIAMENTO INTERNACIONAL PARA TUMORES PEDIÁTRICOS - VERSÃO RESUMIDA...	32
TABELA 2 - ESTRATIFICAÇÃO DOS GRUPOS DE RISCO DE NEUROBLASTOMA.	36
TABELA 3 - LISTA DE INICIADORES QUE FORAM UTILIZADOS NO ESTUDO	57
TABELA 4 - DADOS CLÍNICOS AMOSTRAS CONTROLE: SEXO	66
TABELA 5 - INTERVALO <i>POST MORTEM</i> DAS AMOSTRAS CONTROLE	66
TABELA 6 - ANÁLISES HISTOLÓGICAS E IMUNOHISTOQUÍMICAS DAS AMOSTRAS CONTROLE.....	73
TABELA 7 - CORRELAÇÃO DEGRADAÇÃO RNA E INTERVALO <i>POST MORTEM</i>	75
TABELA 8 - DADOS CLÍNICOS PACIENTES COM NEUROBLASTOMA	77
TABELA 9 - ETAPAS PARA NORMALIZAÇÃO DAS BIBLIOTECAS	79
TABELA 10 - LISTA DAS DIFERENTES <i>FLOW CELLS</i> UTILIZADAS PARA SEQUENCIAMENTO	80
TABELA 11 - CRITÉRIOS PARA SELEÇÃO DE SEQUÊNCIAS REFERÊNCIA OBTIDAS DO BANCO DE DADOS UCSC	85
TABELA 12 - PERCENTAGEM DO TOTAL DE <i>READS</i> DE HERV-H MONTADOS COM AS SEQUÊNCIAS DE REFERÊNCIA	86
TABELA 13 - PERCENTAGEM DO TOTAL DE <i>READS</i> DE HERV-W MONTADOS COM AS SEQUÊNCIAS DE REFERÊNCIA	87
TABELA 14 - PERCENTAGEM DO TOTAL DE <i>READS</i> DE HERV-K MONTADOS COM AS SEQUÊNCIAS DE REFERÊNCIA	88
TABELA 15 - DADOS DE SEQUENCIAMENTO BRUTOS E NORMALIZADOS.	89
TABELA 16 - <i>LOCi</i> DE HERV-H DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS.	105
TABELA 17 - GENES QUE FLANQUEIAM AS REGIÕES PROVIRAIS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS DE HERV-H EM NEUROBLASTOMA	107
TABELA 18 - GENES EM QUE ESTÃO INSERIDOS OS PROVÍRUS DE HERV-H DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM NEUROBLASTOMA	108
TABELA 19 - <i>LOCi</i> DE HERV-W DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS.	109
TABELA 20 - GENES QUE FLANQUEIAM AS REGIÕES PROVIRAIS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS DE HERV-W EM NEUROBLASTOMA	111
TABELA 21 - ANÁLISES DOS <i>LOCi</i> INTERGÊNICOS DE HERV-K.....	112
TABELA 22 - ANÁLISES DOS <i>LOCi</i> INTRAGÊNICOS DE HERV-K	113

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - TOTAL DE <i>READS</i> DE HERV-W SEQUENCIADOS POR AMOSTRA TUMORAL.	82
GRÁFICO 2 - TOTAL DE <i>READS</i> DE HERV-H SEQUENCIADOS POR AMOSTRA TUMORAL.	82
GRÁFICO 3 - TOTAL DE <i>READS</i> DE HERV-W SEQUENCIADOS POR AMOSTRA CONTROLE.	83
GRÁFICO 4 - TOTAL DE <i>READS</i> SEQUENCIADOS DE HERV-H POR AMOSTRA CONTROLE.....	83
GRÁFICO 5 - TOTAL DE <i>READS</i> DE HERV-K SEQUENCIADOS POR AMOSTRA CONTROLE	84
GRÁFICO 6 - ANÁLISE DE VIÉS DO PAR DE INICIADORES HE1	90
GRÁFICO 7 - ANÁLISE DE VIÉS DO PAR DE INICIADORES WE8	90
GRÁFICO 8 - ANÁLISE DE VIÉS DO PAR DE INICIADORES HK_UNIVERSAL	91
GRÁFICO 9 - COMPARAÇÃO DE EXPRESSÃO HERV-H ENTRE CASOS DE NATIMORTOS E PEDIÁTRICOS	93
GRÁFICO 10 - <i>LOCi</i> DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DE HERV-H ENTRE OS GRUPOS CONTROLE NATIMORTO E PEDIÁTRICO ($P < 0,05$).....	94
GRÁFICO 11 - COMPARAÇÃO DE EXPRESSÃO DE HERV-W ENTRE CASOS DE NATIMORTOS E PEDIÁTRICOS	95
GRÁFICO 12 - <i>LOCUS</i> DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DE HERV-W ENTRE OS GRUPOS CONTROLE NATIMORTO E PEDIÁTRICO ($P < 0,05$).....	95
GRÁFICO 13 - COMPARAÇÃO DE EXPRESSÃO DE HERV-K ENTRE CASOS DE NATIMORTOS E PEDIÁTRICOS.....	97
GRÁFICO 14 - COMPARAÇÃO DE EXPRESSÃO DE HERV-H ENTRE AS AMOSTRAS TUMORAIS	98
GRÁFICO 15 - COMPARAÇÃO DE EXPRESSÃO DE HERV-W ENTRE AS AMOSTRAS TUMORAIS	98
GRÁFICO 16 - <i>LOCi</i> DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DE HERV-H ENTRE OS GRUPOS TUMORAIS ($P < 0,05$).....	100
GRÁFICO 17 - <i>LOCUS</i> DIFERENCIALMENTE EXPRESSO DE HERV-W ENTRE OS GRUPOS TUMORAIS ($P < 0,05$) ..	101
GRÁFICO 18 - <i>LOCi</i> DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DA FAMÍLIA H	106
GRÁFICO 19 - <i>LOCi</i> DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DA FAMÍLIA W	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATL - leucemia/linfoma de células T humanas do adulto

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BLAT - *BLAST-like alignment tool*

cDNA - DNA complementar

CpG - Citosina-fosfato-Guanina

DAB - Diaminobenzidina

DMEM - Meio Eagle Modificado por Dulbecco

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

HCB – Hospital de Câncer de Barretos

HERV - retrovírus endógenos humanos

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HTLV - vírus T-linfotrópico humano

IARC - Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer*)

ICTV - Comitê Internacional de Taxonomia Viral

IL-2 - Interleucina-2

IML - Instituto Médico Legal

INCA – Instituto Nacional do Câncer

INRGSS - Sistema Internacional de Estadiamento de Grupo de Risco para Neuroblastoma (*International Neuroblastoma Risk Group Staging System*)

INSS - Sistema Internacional de Estadiamento de Neuroblastoma (*International Neuroblastoma Staging System*)

ITACI - Instituto do Tratamento de Câncer Infantil

LTR – sequência repetitiva terminadora (*Long Terminal Repeat*)

LTR5 – sequência repetitiva terminadora pertencente à família HERV-K

LTR7 – sequência repetitiva terminadora pertencente à família HERV-H

LTR17 – sequência repetitiva terminadora pertencente à família HERV-W

MMTV - vírus do tumor mamário de ratos (*Mouse Mammary Tumor Virus*)

mRNA – RNA mensageiro

MYCN - gene membro da família MYC

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

ORF – fase aberta de leitura (*Open Reading frame*)

p53 – gene supressor tumoral

pb – pares de base

PBS – sítio de ligação de iniciadores (*Primer Binding Site*)

PCR – reação em cadeia da polimerase

RNA – ácido ribonucleico

RNA^t – RNA transportador

SNP – polimorfismo de nucleotídeo único (*Single-nucleotide Polymorphism*)

SVO – Serviço de Verificação de Óbito

TAE – tampão Tris-Acetato-EDTA

TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido

T_m – temperatura de *melting*

TRIS – tris-hidroximetil-aminometano

USP – Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – graus Celsius

cm² – centímetros quadrados

g – força centrífuga relativa

mL – mililitro

mm³ – milímetro cúbico

ng – nanograma

nm - nanômetro

pmol – picomol

mg – micrograma

μL - microlitro

μm – micrômetro

μM – micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	30
1.1 Câncer: conceitos	30
1.2 Câncer Infantil	31
1.3 Vírus e Câncer	38
1.4 A família <i>Retroviridae</i> e os HERVs	39
1.5 HERV e doenças	42
1.6 HERV e câncer infantil	44
1.6.1 <i>HERV e Neuroblastoma</i>	45
2 OBJETIVO GERAL	48
2.1 Objetivos Específicos	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 Coleta de amostras tumorais	49
3.2 Coleta de amostras controle	49
3.2.1 <i>Dissecação</i>	50
3.2.2 <i>Inclusão do tecido em parafina</i>	50
3.2.3 <i>Análise Histológica</i>	51
3.2.4 <i>Imuno-histoquímica</i>	51
3.3 Cultura Celular de Neuroblastoma	52
3.3.1 <i>Extração de Ácido Desoxirribonucléico (DNA)</i>	52
3.4 Extração de Ácido Ribonucléico (RNA) total	53
3.4.1 <i>Amostras ITACI e amostras controle</i>	53
3.4.2 <i>Amostras HCB</i>	54
3.4.3 <i>Cultura Celular</i>	55
3.5 Tratamento do Ácido Ribonucléico com enzima DNase	55
3.6 Desenho de Oligonucleotídeos	56
3.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	57
3.8 Clonagem	57
3.8.1 <i>Sequenciamento dos produtos clonados</i>	58
3.9 Obtenção de cDNA e purificação dos amplicons	59
3.10 Sequenciamento Nova Geração	60

3.10.1 Plataforma Ion Torrent PGM (Life Technologies).....	60
3.10.2 Plataforma MiSeq (Illumina).....	61
3.11 Montagem do banco de dados referência.....	62
3.12 Montagem das sequências.....	62
3.13 Mapeamento e análises dos reads	63
3.13.1 Análise do perfil de expressão por Heat Map	64
3.14 Análise Estatística	64
4 RESULTADOS	66
4.1 Dados gerais amostras controle.....	66
4.1.1 Dissecção amostras controle.....	66
4.1.2 Análise histológica e imunohistoquímica	67
4.1.3 Extração de RNA total: Amostras Controle	75
4.2 Amostras Tumorais.....	76
4.3 Detecção da expressão de Retrovírus Endógenos Humanos	77
4.3.1 Otimização dos iniciadores e One Step in house	77
4.3.2 Amplificação das famílias de HERVs	77
4.4 Sequenciamento de Nova Geração.....	78
4.5 Montagem das sequências e análises.....	81
4.6 Normalização dos dados obtidos por sequenciamento	89
4.10.3 Análise de expressão de HERV-H	104
4.10.4 Análise das regiões gênicas que flanqueiam os loci expressos	107
4.11 Análise de expressão de HERV-W	108
4.11.1 Análise das regiões gênicas que flanqueiam os loci expressos	110
4.12 Análise de expressão de HERV-K.....	111
5 DISCUSSÃO.....	114
5.1 Amostras Controle.....	114
5.2 Amostras Tumorais.....	115
5.3 Detecção da expressão de Retrovírus Endógeno Humano	118
5.3.1 Análise da expressão de HERVs	118
5.3.2 Expressão de HERV-H	120
5.3.3 Expressão de HERV-W	125
5.3.4 Expressão de HERV-K.....	134
5.4 Considerações Finais	138
6 CONCLUSÕES.....	142
REFERÊNCIAS*	143

ANEXOS	166
ANEXO A - Comparação da expressão de HERV-H nas amostras controle bilaterais.....	166
ANEXO B - Comparação da expressão de HERV-W nas amostras controle bilaterais	167
ANEXO C - Comparação da expressão de HERV-K nas amostras controle bilaterais.....	168
ANEXO D - Idiograma dos <i>loci</i> de HERV diferencialmente expressos.....	170

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer: conceitos

O câncer é responsável por cerca de 14% de todas as causas de óbito no mundo, resultando em um total de mais de 8 milhões de mortes anuais. Uma em cada oito pessoas no mundo morre em decorrência da doença, sendo o número total de óbitos maior do que a soma de óbitos causados por AIDS, tuberculose e malária (Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition). Em 2014, uma previsão feita pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) mostrou que, com o aumento da expectativa de vida no mundo, em 2030, a incidência de câncer (14 milhões, atualmente) poderá ultrapassar os 21 milhões de novos casos, com aproximadamente 13 milhões de mortes decorrentes da doença (Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition). No Brasil, a estimativa de incidência e mortalidade (Figura 1) acompanha o quadro mundial, excetuando-se alguns tumores (Globocan 2012 - Home).

Figura 1 - Incidência e mortalidade de câncer no Brasil e no mundo.

O gráfico representa a taxa de incidência (azul) e de mortalidade (vermelho) para os 15 tipos de tumores mais comuns em escala mundial (esquerda) e no Brasil (direita). *Age-standardised rate* (ASR).

Fonte: <http://globocan.iarc.fr/>.

O câncer pode ser definido como um conjunto de diversas doenças que tem como característica comum a proliferação descontrolada de células anormais, podendo ocorrer em qualquer região do organismo e em qualquer fase da vida do indivíduo (WEINBERG, 2013). A maior parte dos casos de câncer tem como componente etiológico principal fatores comportamentais, como dieta e hábitos inadequados e ambientais, como exposição a poluição química (*e.g.*, contaminação por pesticidas e por poluição química de industriais, etc.), infecções por microrganismos, exposição à radiação ultravioleta, dentre outros. Em uma fração significativamente menor dos casos, o componente principal é genético, o que não deixa de tornar muito importante a identificação dos indivíduos de risco e o aconselhamento genético (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

1.2 Câncer Infantil

O câncer atinge tanto adultos quanto crianças, sendo mais raro nestas últimas. Dentre todos os tumores malignos conhecidos, apenas 2 – 3% acometem crianças e adolescentes. Entretanto, o câncer infanto-juvenil representa a primeira causa de morte por doença entre crianças e adolescentes de 1 a 19 anos de idade (Portal - Instituto Nacional de Câncer - INCA). Diversos tipos de tumores podem surgir na infância e na adolescência, sendo estes: tumores do sistema nervoso central (PFISTER et al., 2009; POMEROY et al., 2002; TAYLOR et al., 2012), leucemias (DOCKERTY et al., 1999; ESPARZA; KWAN et al., 2004; SAKAMOTO, 2005;), linfomas (CAIRO et al., 2005; EKSTRÖM-SMEDBY, 2006; REITER, 2007), neuroblastomas (COHN, 2003;HECK et al., 2009; WEINSTEIN; KATZENSTEIN), tumor de Wilms (CHU et al., 2010; DAVIDOFF, 2009; SEYED-AHADI et al., 2007), retinoblastomas (MCDAID et al., 2005), tumores germinativos (DE BACKER et al., 2006; RESCORLA, 1999), osteossarcomas (BIELACK et al., 2013; OTTAVIANI; JAFFE, 2009) e sarcomas (PIZZO; POPLACK, 2011; ROBERTS; CHOU; CHEUNG, 2015).

O câncer infanto-juvenil apresenta características clínicas e histológicas distintas do câncer no adulto. O comportamento clínico é caracterizado por períodos de latência menores, crescimento rápido e invasivo (STILLER, 2004). Todavia, estes tumores apresentam, de maneira geral, uma resposta positiva a quimioterapia. Na maioria dos casos, a histologia do tipo embrionária dos tumores pediátricos é devido a semelhança destes com tecidos fetais nos diferentes estágios de desenvolvimento. Com isso, pode haver um grau

variado de diferenciação celular, resultando em uma maior diversidade morfológica (CHEN; PAPPO; DYER, 2015).

Por essa razão, as classificações utilizadas nos tumores pediátricos são baseadas na morfologia, diferentemente das utilizadas nos adultos que levam em consideração o local primário de origem do tumor. Proposto pelo IARC, o atual sistema de classificação de tumores pediátricos foi baseado em uma série de propostas que foram modificadas no decorrer do tempo, de acordo com o avanço no diagnóstico e tratamento dos tumores. O primeiro sistema de classificação proposto por Birch e Marsden (1987) foi reformulado em 1996 por Kramarova e Stiller (KRAMÁROVÁ; STILLER, 1996). Menos de uma década depois, em 2005, novas alterações foram feitas baseadas na terceira edição da Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (STELIAROVA-FOUCHER et al., 2005). Esta última versão permanece em vigor até os dias de hoje, e permite que dados internacionais sobre os tumores pediátricos sejam disponibilizados e compreendidos.

De maneira resumida, a classificação dos tumores infantis é dividida em grupos e subgrupos como o exposto na Tabela 1. Os subgrupos ainda podem ser subdivididos através de uma combinação de códigos que avaliam topografias e comportamento do tumor.

Tabela 1 - Sistema de Estadiamento Internacional para tumores pediátricos - versão resumida

Grupo de Diagnóstico	
I. Leucemias, doenças mieloproliferativas e doenças mielodisplásicas	a. Leucemias linfóides
	b. Leucemias mielóides agudas (Leucemias não linfocíticas agudas)
	c. Doenças crônicas mieloproliferativas
	d. Síndrome mielodisplásica e outras doenças mieloproliferativas
	e. Leucemias especificadas e outras não especificadas
II. Linfomas e neoplasias reticuloendoteliais	a. Linfomas de Hodgkin (Doença de Hodgkin)
	b. Linfomas não-Hodgkin (exceto linfoma de Burkitt)
	c. Linfoma de Burkitt
	d. Miscelânea de neoplasias linforeticulares
	e. Linfomas não especificados
III. SNC e miscelânea de neoplasias intracranianas e intra-espinhais	a. Ependimomas e tumor do plexo coróide (Ependimomas)
	b. Astrocitomas
	c. Tumores embrionários intracranianos e intra-espinhais (tumores neuroectodérmicos primitivos)
	d. Outros gliomas
	e. Outras neoplasias intracranianas e intra-espinhais

	especificadas f. Neoplasias intracranianas e intra-espinhais não especificadas
IV. Neuroblastoma e outros tumores de células nervosas periféricas (Tumores do sistema nervoso simpático)	a. Neuroblastoma e ganglioneuroblastoma b. Outros tumores de células nervosas periféricas (Outros tumores do sistema nervoso simpático)
V. Retinoblastoma	
VI. Tumores renais	a. Nefroblastoma e outros tumores renais não epiteliais (Tumor de Wilms, tumor rabdóide e sarcoma de células claras) b. Carcinomas renais c. Tumores renais malignos não especificados
VII. Tumores Hepáticos	a. Hepatoblastoma b. Hepatocarcinoma c. Tumores hepáticos malignos não especificados
VIII. Tumores ósseos malignos	a. Osteossarcomas b. Condrossarcomas c. Tumor de Ewing e sarcomas ósseos relacionados (Sarcoma de Ewing) d. Outros tumores ósseos malignos especificados e. Tumores ósseos malignos não especificados
IX. Tecidos moles e outros sarcomas extra-ósseos (Sarcomas de partes moles)	a. Rbdomiosarcomas (Rbdomiossarcoma e sarcoma embrionário) b. Fibrossarcomas, tumores da bainha do nervo periférico e outras neoplasias fibromatosas (Fibrossarcomas, neurofibrossarcomas e outras neoplasias fibromatosas) c. Sarcoma de Kaposi d. Outros sarcomas de tecidos moles especificados (Outros sarcomas de partes moles especificados) e. Sarcomas de tecidos moles não especificados (Sarcomas de partes moles não especificados)
X. Tumores de células germinativas, tumores trofoblásticos, e neoplasias gonadais (Neoplasias de células germinativas, trofoblásticas, e outras gonadais)	a. Tumores de células germinativas intracranianos e intra-espinhais b. Tumores malignos de células germinativas extracranianas e extragonadais (Outros tumores de células germinativas não gonadais e tumores de células germinativas não gonadais não especificados) c. Tumores malignos de células germinativas gonadais d. Carcinomas gonadais e. Outros tumores gonadais malignos e tumores gonadais não especificados
XI. Outros neoplasmas malignos epiteliais e outros melanomas malignos (Carcinomas e outras neoplasias malignas epiteliais)	a. Carcinoma de córtex adrenal b. Carcinoma de tireóide c. Carcinoma de nasofaringe d. Melanoma maligno e. Carcinomas de pele f. Outros carcinomas e carcinomas não especificados
XII. Outras neoplasias malignas e não especificadas	a. Outros tumores malignos especificados b. Outros tumores malignos não especificados

Fonte: International Classification of Childhood Cancer, third edition, Eva Steliarova-Foucher, Charles Stiller, Brigitte Lacour and Peter Kaatsch.

Os tumores do sistema nervoso simpático são responsáveis por 7,8% dos tumores que acometem crianças e adolescentes menores de 15 anos (KAATSCH, 2010). Neste grupo, encontra-se o neuroblastoma, tumor sólido mais comum e com maior índice de letalidade em crianças. Além disso, dentre os tumores estudados atualmente, o neuroblastoma é um dos mais enigmáticos, pois pode regredir espontaneamente, especialmente em crianças menores de 12 meses de idade, ou apresentar um comportamento agressivo, evoluir e espalhar-se rapidamente (BRODEUR, 2003). A predisposição genética familiar (MOSSÉ et al., 2008) e a exposição a fatores ambientais têm sido postuladas como possíveis fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença. No entanto, por ser altamente heterogêneo, a etiologia deste tumor ainda permanece obscura.

O neuroblastoma pode se originar, principalmente, de células precursoras da medula da glândula adrenal (células cromóafins extramedulares) e de neuroblastos (células nervosas) (PIZZO; POPLACK, 2011). Os tumores primários são encontrados, na maioria das vezes, na região abdominal, principalmente na medula da glândula adrenal (60% dos casos) ou em gânglios simpáticos paraespinais. Outros locais incluem o mediastino, pescoço e pélvis. Os principais sítios de metástases são ossos, medula óssea, linfonodos e raramente atingem fígado e pele (CASTLEBERRY, 1997).

Devido ao comportamento atípico do neuroblastoma, a classificação do estadiamento dessa doença foi feita de maneira peculiar, baseada na excisão cirúrgica, envolvimento de linfonodos idade ao diagnóstico, sítios metastáticos e análise morfológica. O Sistema Internacional de Estadiamento para Neuroblastoma (International Neuroblastoma Staging System - INSS) (BRODEUR, 1993, 2003), de forma simplificada, define os estadios desse tumor da seguinte maneira:

Estadio 1 – Localizado apenas na região de origem e pode ser completamente removido cirurgicamente, podendo ou não haver doença residual microscópica. Os linfonodos não são acometidos, ou seja, estão livres de comprometimento neoplástico.

Estadio 2A – Localizado na região de origem. Contudo, pode ser removido apenas parcialmente, por cirurgia. Os linfonodos *in situ* podem conter células tumorais, mas os demais não são acometidos.

Estadio 2B – Localizado unilateralmente, pode ou não ser totalmente removido por cirurgia. Os linfonodos ipsilaterais contêm células neoplásicas, mas a doença não se disseminou para gânglios linfáticos distantes.

Estadio 3 – Nesse estadio há três situações possíveis:

- a) o tumor é unilateral e não pode ser completamente removido cirurgicamente e cruza a linha média. A linha média é definida pela coluna vertebral. Tumores originários de um lado e atravessam a linha média infiltram para o lado oposto da coluna vertebral. O tumor pode ou não se disseminar para linfonodos próximos;
- b) o tumor é unilateral com disseminação para os linfonodos contralaterais;
- c) o tumor localiza-se na linha média, invade ambos os lados e não pode ser completamente removido por cirurgia.

Estadio 4 – Tumor metastático com acometimento de linfonodos distantes, ossos, fígado, pele, medula óssea e/ou outros órgãos. Contudo, a criança não cumpre os critérios para o estadio 4S.

Estadio 4S (Também denominado neuroblastoma especial) – Acomete apenas crianças menores de 1 ano. Tumor localizado unilateralmente com disseminação restrita à linfonodos ipsilaterais. Há metástases para o fígado, pele ou medula óssea. Contudo, menos de 10% das células da medula são neoplásicas. Envolvimento mais extensivo da medula pode ser considerado como estadio 4.

Recidiva - Embora não seja formalmente parte do sistema de estadiamento, este termo é usado para descrever o retorno da doença após o tratamento. O tumor pode recidivar na área onde se iniciou ou em outra parte do corpo.

Com o avanço das tecnologias e técnicas moleculares, novas alterações e características tumorais puderam ser descritas para neuroblastoma, permitindo a estratificação da doença em três grupos de risco: baixo, intermediário e alto (Tabela 2). Este novo sistema foi adicionado ao INSS e implementado pelo Sistema Internacional de Estratificação do Grupo de Risco de Neuroblastoma (*International Neuroblastoma Risk Group Staging System* – INRGSS) (COHN et al., 2009; MONCLAIR et al., 2009). Além dos parâmetros anteriores, o INRGSS inclui a avaliação combinada de dados clínicos e de imagem. Os grupos são classificados em:

L1 – Doença localizada, sem fatores de risco visíveis ao exame de imagem.

L2 – Doença localizada, com fatores de risco visíveis ao exame de imagem.

M – Tumor metastático.

Ms – Doença metastática com metástase apenas na pele, fígado e/ou medula óssea.

Os tumores também são categorizados baseados na classificação histológica de Shimada, que considera o grau de diferenciação, conteúdo do estroma das células de Schwann, índice de correlação cariorréxis/mitose e a idade ao diagnóstico, gerando dois grupos considerados favoráveis ou desfavoráveis, ou seja, bom e mau prognóstico, respectivamente (SHIMADA et al., 1999).

A primeira associação genética ao tumor foi feita após a detecção de alteração no gene MYCN. O aumento no número de cópias deste gene resulta em mau prognóstico e passou a ser incluída nas metodologias de estratificação tumoral (MATHEW et al., 2001). Diversas outras alterações genéticas têm sido identificadas, porém permanecem inconclusivas. Por conseguinte, estas ainda não foram incluídas no sistema de estratificação atual.

Tabela 2 - Estratificação dos grupos de risco de Neuroblastoma.

Grupo de Risco	Classificação INSS	Idade	Condição MYCN	Histologia de Shimada	Sobrevida
Baixo	1	Todas	Qualquer	Qualquer	90 – 100%
	2	< 1 ano	Qualquer	Qualquer	
	2	> 1ano	Qualquer	Favorável	
	4S	< 1 ano	< 10 cópias	Favorável	
Intermediário	3	> 1 ano	< 10 cópias	Favorável	75%
	3 e 4	< 1 ano	< 10 cópias	Qualquer	
	4S	< 1 ano	< 10 cópias	Desfavorável	
Alto	3	Todas	> 10 cópias	Qualquer	20 – 60%
	4	< 1 ano	> 10 cópias	Qualquer	
	4	> 1 ano	Qualquer	Qualquer	

Fonte: STANTON F., (2009)

O regime terapêutico do neuroblastoma é definido de acordo com o estadiamento e estratificação de risco do tumor. O tratamento pode ser realizado através da ressecção cirúrgica, quimioterapia, radioterapia e bioterapia (PARK; EGGERT; CARON, 2008; PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2002; WEINSTEIN; KATZENSTEIN; COHN, 2003).

Pacientes de baixo risco (Estadio 1 ou 2), geralmente são tratados apenas cirurgicamente, com remoção completa do tumor. A quimioterapia, normalmente nesses casos, é apenas profilática ou aplicada nos raros casos de recidiva. Os pacientes de baixo

risco 4S, na maioria das vezes, possuem regressão tumoral espontânea, sendo necessário apenas acompanhamento profilático. A taxa de sobrevida (>5 anos) desse grupo é superior a 95% (ALVARADO et al., 2000; PARK; EGGERT; CARON, 2008; SIMON et al., 2004). Pacientes de alto risco (Estadio 3 e 4) são submetidos a remoção cirúrgica somente após o tratamento com quimioterapia agressiva, dado que os pacientes geralmente não respondem bem ao tratamento e tem altas taxas de recidiva (HAASE; PEREZ; ATKINSON, 1999; PARK; EGGERT; CARON, 2008). A estratégia terapêutica adotada para o grupo de risco intermediário envolve cirurgia e quimioterapia moderada. Tanto para os grupos de alto risco, quanto para o grupo intermediário, utiliza-se a radioterapia para tumores residuais.

O tratamento quimioterápico para neuroblastoma consiste na combinação de drogas como cisplatina, etoposide, doxorrubina, ciclofosfamida, topectan, ironotecan e vincristina (PARK; EGGERT; CARON, 2008; PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2002; WEINSTEIN; KATZENSTEIN; COHN, 2003). Outro agente comumente utilizado é o ácido cis-retinóico, que atua como um indutor de diferenciação. Imunoterapias que utilizam anticorpos contra antígenos tumor-específico ou vacinas antitumorais também têm sido aplicadas aos pacientes, apresentando resultados promissores e significativos (BARBUTO et al., 2004; MATTHAY et al., 1999). As novas drogas e terapias utilizadas, mesmo em tumores complicados e agressivos, tem resultado em uma remissão tumoral completa, comprovando um avanço positivo e na direção correta para a cura desta doença (PEARSON et al., 2008; ZAGE et al., 2008).

O maior desafio dentre as terapias utilizadas centraliza-se na redução da toxicidade do tratamento, estratificação tumoral mais precisa e diagnóstico precoce. Estes últimos, na maioria das vezes, são dúbios devido à complexidade da doença. A identificação de anormalidades genômicas e mudanças na expressão gênica tumoral, permitiram a expansão do conhecimento sobre a biologia molecular e características clínicas do neuroblastoma. Todavia, estudos visando identificar novos alvos terapêuticos específicos e diagnósticos precisos necessitam ser desenvolvidos. Além disso, compreender o desenvolvimento normal do sistema nervoso simpático permitirá futuros entendimentos sobre as anomalias celulares que originam o tumor.

1.3 Vírus e Câncer

Os vírus também são considerados agentes etiológicos para o desenvolvimento de neoplasias, pois são capazes de induzir a imunossupressão, modificar o genoma da célula hospedeira com produção direta de oncoproteínas, inibir genes supressores de tumor, ou alterar a expressão das proteínas das células hospedeiras no sítio de integração do DNA viral (BOUVARD et al., 2009; MOORE; CHANG, 2010; PARKIN, 2006).

A infecção viral tem sido ligada a diversas formas de câncer em humanos. Os linfomas de Hodgkin, não - Hodgkin, sarcomas e câncer de orofaringe, por exemplo, são associados a alguns vírus da família *Herpesviridae* (EKSTRÖM-SMEDBY, 2006; FERRERI; ERNBERG; COPIE-BERGMAN, 2009; FLAVELL; MURRAY, 2000; MANTINA et al., 2001; MARTIN; OSMOND, 1999). Estima-se que alguns vírus também promovam o câncer ao causar inflamação crônica, como é o caso dos vírus das famílias *Hepadnaviridae* e *Flaviviridae* associados ao hepatocarcinoma (BLOCK et al., 2003; DE OLIVERIA ANDRADE et al., 2009). Ainda neste contexto, podemos citar o papilomavírus humano, um vírus pertencente à família *Papillomaviridae* responsável por mais de 90% dos casos de câncer de colo de útero e também associado ao câncer de orofaringe (CHOW; BROKER; STEINBERG, 2010; WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007). Em 2008, o carcinoma das células de Merkel, uma neoplasia rara que acomete principalmente idosos, foi associado a infecção por poliomavírus, pertencente à família *Polyomaviridae* (FENG et al., 2008).

Outra família de vírus que também está associada à tumorigênese é a *Retroviridae*. O vírus T-linfotrópico humano (HTLV), primeiro retrovírus humano descoberto, foi associado a leucemia/linfoma de células T humanas do adulto (ATL), uma doença rara que ocorre mais frequentemente em regiões onde a infecção pelo HTLV-I é endêmica (MATSUOKA, 2005; POIESZ et al., 2001). De maneira indireta, o vírus da imunodeficiência humana (HIV) também é capaz de causar o desenvolvimento de neoplasias através do enfraquecimento do sistema imune, permitindo o estabelecimento de infecções oportunistas causadas por outros vírus (GRULICH et al., 2007). O sarcoma de Kaposi causado pelo herpesvírus-8 e linfomas causados pelo vírus *Epstein-Barr* são tumores comumente encontrados em pacientes com HIV (ARVEY et al., 2015; MARTIN; OSMOND, 1999). Outros tumores causados por vírus como linfoma não-Hodgkin, carcinoma cervical e hepatocarcinoma por exemplo, também são comuns em

pacientes imunossuprimidos, sendo considerados malignidades associadas à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (BARBARO; BARBARINI, 2007).

1.4 A família *Retroviridae* e os HERVs

A família *Retroviridae* compreende vírus que utilizam a DNA-Polimerase-RNA-dependente, ou seja, uma transcriptase reversa (BALTIMORE, 1970) como particularidade de sua estratégia replicativa no organismo hospedeiro. Os retrovírus normalmente infectam células somáticas e possuem uma fase denominada provírus, representada pela integração do genoma viral no genoma do hospedeiro (COFFIN; HUGHES; VARMUS, 1997). De acordo com a classificação do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), existem sete gêneros dentro da família *Retroviridae*: Alpharetrovírus, Betaretrovírus, Deltaretrovírus, Gammaretrovírus, Epsilonretrovírus, Spumavírus e Lentivírus. Os vírus pertencentes aos diferentes gêneros se distinguem pela organização e complexidade do seu genoma, pela presença/ausência de oncogenes e genes acessórios, forma do capsídeo e o organismo hospedeiro (ICTV Code of Virus Classification).

Dentro da família *Retroviridae* encontram-se os retrovírus endógenos humanos (HERVs), que são provírus remanescentes de infecções, ocorridas há milhões de anos nas células germinativas dos organismos ancestrais (LÖWER; LÖWER; KURTH, 1996; MAYER; MEESE, 2005; SVERDLOV, 2000). Após sua inserção no genoma, os HERVs passaram a sofrer diversas amplificações e reinserções, resultando em uma ampla distribuição de sequências retrovirais completas e/ou parciais pelo genoma do hospedeiro (DE PARSEVAL; HEIDMANN, 2005; GRIFFITHS, 2001). Com o sequenciamento do genoma humano, foi possível determinar a presença de aproximadamente 98.000 sequências (completas ou parciais) de retrovírus endógenos de diversas famílias, mostrando que cerca de 8% do genoma humano é constituído por sequências de origem retroviral (LANDER et al., 2001).

Os HERVs são divididos em famílias, cujos nomes são dados de acordo com o tipo de RNAt (*i.e.*, RNA transportador) utilizado pela região iniciadora da transcrição reversa (PBS, *Primer Binding Site*). Por exemplo, a família K recebe esse nome por utilizar lisina no PBS (BLOMBERG et al., 2009; COHEN; LARSSON, 1988). Os HERVs são agrupados em três grandes classes, de acordo com a similaridade aos retrovírus exógenos. Os HERVs da classe I estão relacionados aos gamaretrovírus, assim como o retrovírus exógeno *Murine leukemia virus*

(MLV), e incluem, entre outras, as famílias HERV-W e HERV-H. HERVs da classe II estão relacionados aos betaretrovírus, como *Mouse mammary tumor virus* (MMTV), por exemplo, e incluem a família HERV-K. A última classe, III, está relacionada aos spumaretrovírus e inclui os vírus da família HERV-L e HERV-S (TRISTEM, 2000). Nenhum lentivírus endógeno havia sido descrito até o ano de 2007, quando foi descoberto o primeiro lentivírus endógeno em coelhos (KATZOURAKIS et al., 2007). Em 2009, foi confirmada a presença de um segundo lentivírus endógeno no genoma de diferentes gêneros de lêmures. Análises filogenéticas desses vírus demonstraram uma relação muito próxima aos lentivírus modernos encontrados em símios. Esses estudos revelam que os lentivírus também são capazes de serem transmitidos de forma mendeliana após a integração, assim como os demais retrovírus endógenos, representando um passo fundamental nos estudos sobre a evolução retroviral (GILBERT et al., 2009).

Embora certos HERVs ainda retenham a capacidade de transcrição e produzam não somente RNAm, mas também proteínas (MEDSTRAND et al., 2005), a maioria deles tornou-se defectiva devido ao acúmulo de mutações, inserções e deleções (*i.e.*, indels) durante o curso da evolução. Mutações que alteram a fase de leitura (*nonsense*), como indels, implicaram na maior parte da perda da capacidade de codificação, e aparentemente, foram mais importantes do que as acumuladas nas regiões das LTRs (não codificantes), que em última análise, por conterem as regiões promotoras, também impactam no nível de atividade dos HERVs (COFFIN, 1992).

As LTRs possuem um potencial transcricional regulatório completo, ou seja, possuem elementos promotores e intensificadores, sítios de ligação de fatores de transcrição (LTR 5') e sinal de poliadenilação (LTR 3') (KOVALSKAYA et al., 2006). Durante o curso da evolução, diversas recombinações homólogas ocorreram entre LTRs completas, fazendo com que muitas se tornassem órfãs (COFFIN; HUGHES; VARMUS, 1997). Como consequência de sua capacidade promotora, algumas LTRs solitárias localizadas próximas a genes celulares são capazes de controlar e regular a expressão gênica de maneira tecido-específica. O gene que codifica para a β 1,3-galactosiltransferase 5 (β 3Gal-T5), por exemplo, é composto por uma LTR de HERV-L, que atua como promotor e apresenta alta atividade no trato gastrointestinal e na glândula mamária (DUNN; MEDSTRAND; MAGER, 2003). Outros genes importantes como receptor de IL-2 (COHEN et al., 2011), amilase salivar (TING et al., 1992), receptor de

endotelina B e apolipoproteína C1 (MEDSTRAND; LANDRY; MAGER, 2001) também possuem LTRs atuando como promotores na transcrição gênica.

Por serem compostas por regiões repetitivas, as LTRs podem ter atividade promotora bidirecional, sendo os sítios de início de transcrição localizados entre as regiões R e U5 (KOVALSKAYA et al., 2006; SCHÖN et al., 2001). Todavia, há uma predileção por determinada orientação, como por exemplo, a LTR ERV1 que pode atuar como promotor bidirecional nos genes DSCR4 e DSCR8 em pacientes com síndrome de Down, exerce sua atividade promotora preferencialmente no sentido 5'→3' (DUNN et al., 2006).

Ao contrário do que ocorre em ratos (RISSER; HOROWITZ; MCCUBREY, 1983), os retrovírus endógenos não são capazes de formar partículas virais infecciosas em humanos, dado o seu genoma defectivo. No entanto, em alguns casos, partículas virais não infecciosas foram observadas brotando de linhagens celulares de teratocarcinoma (BOLLER et al., 1993) e de placentas de primatas (SIMPSON et al., 1996), demonstrando que nem todas as fases de leitura aberta (*open reading frame* – ORF) dos genes são defectivas. Ademais, alguns genes retrovirais ainda são capazes de gerar determinadas proteínas, sendo algumas “domesticadas” e utilizadas pelo hospedeiro. A proteína sincitina-1, por exemplo, codificada pelo gene de envelope da família HERV-W, exerce um papel crucial na morfogênese, por mediar a fusão do sinciotrofoblasto e é expressa preferencialmente na placenta humana (MI et al., 2000).

A família HERV-K (HML-2) é a mais bem preservada, além de ser uma das poucas que ainda permanece ativa no genoma humano. O genoma humano é constituído por, aproximadamente, 91 provírus e 944 LTRs solitárias de HML-2. Muitos membros dessa família possuem fases de leituras abertas (ORF, *Open Reading Frames*) íntegras. Existem ainda, provírus exclusivamente humanos e polimórficos na população, estando presentes em apenas 15 a 30% dos indivíduos (ROMANO; RAMALHO; ZANOTTO, 2006; TÖNJES et al., 1996). As LTRs 5Hs, 5A/B e 5A são polimórficas e cada uma apresenta inserções em regiões específicas diferentes, indicando sua inserção recente (SUBRAMANIAN et al., 2011).

HERV-H é uma das mais abundantes famílias de HERV presentes no genoma humano, com cerca de 100 elementos completos e aproximadamente 10 mil LTRs solitárias (LINDESKOG; MAGER; BLOMBERG, 1999; SJØTTEM; ANDERSSSEN; JOHANSEN, 1996). Apesar de existirem muitos provírus inativos nessa família, transcritos de HERV-H têm sido detectados em leucócitos humanos (LINDESKOG; BLOMBERG, 1997) e em células tronco

embrionárias (human embryonic stem cells – hESCs). O RNA retroviral transcrito a partir das hESCs tem sido utilizado como marcador de pluripotência em células humanas (SANTONI; GUERRA; LUBAN, 2012).

A maioria do conhecimento sobre HERV ainda é fragmentado. Todavia, o advento de novas tecnologias, como sequenciamento de nova geração, tem ampliado o conhecimento sobre o real papel desses anciões retrovirais no genoma humano.

1.5 HERV e doenças

A expressão de HERV também pode estar envolvida na etiologia de diversas doenças humanas, como doenças autoimunes e câncer. No entanto, até o momento nenhuma conexão direta pode ser estabelecida.

Anticorpos anti-HERV e transcritos de origem retroviral têm sido frequentemente detectados em doenças autoimunes como a esclerose múltipla, lúpus eritomatoso sistêmico (PERL et al., 2010) e diabetes mellitus do tipo 1 (CONRAD et al., 1997), bem como em indivíduos soropositivos para HIV (VAN DER KUYL, 2012). Análises em amostras de pacientes diagnosticados com esclerose múltipla revelaram um alto nível de expressão do gene de envelope da família HERV-W, quando comparados ao controle (PERRON et al., 2012). Proteínas de envelope e gag também foram detectadas em níveis elevados em lesões cerebrais, indicando uma forte correlação entre estes retrovírus e a doença (PERRON et al., 2005).

Muitos trabalhos têm demonstrado uma expressão diferencial de diversas famílias de HERV em tumores (RUPRECHT et al., 2008b). Até o presente momento, os mecanismos que regulam a expressão de HERV não foram elucidados. No entanto, situações onde há desregulação celular, o nível de expressão retroviral aumenta se comparado aos tecidos normais. Estes últimos, geralmente, apresentam baixos níveis de expressão de HERV (KESSLER et al., 2014).

A associação da família HML-2 do HERV-K com doenças surgiu após partículas virais terem sido observadas brotando de tumores de células germinativas. No entanto, nenhuma partícula foi capaz de infectar as demais células. Além disso, anticorpos contra RNA, proteínas de envelope e proteínas de gag, foram detectados em 50 – 80% dos pacientes do estudo (BOLLER et al., 1993).

A proteína gag de HERV-K assim como o gene *np9* de HML-2 encontram-se altamente expressos em teratocarcinoma (HIRSCHL et al., 2007), melanoma (ARMBRUESTER et al., 2002) e diversas linhagens celulares tumorais (RUPRECHT et al., 2008b). Em determinadas condições patológicas, os HERVs são seletivamente transativados e expressos (NELLÅKER et al., 2006; VAN DER KUYL, 2012). Estudos avaliaram a expressão de HERV-K (HML-2) em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e em pacientes diagnosticados com câncer de mama. O resultado demonstrou que HERV-K do tipo 1 é mais expresso em pacientes com câncer de mama do que em pacientes portadores de HIV (CONTRERAS-GALINDO et al., 2012; ROMANO; DE MELO; DE A ZANOTTO, 2011).

Em 2002, foi evidenciado o reconhecimento específico pelos linfócitos T citolíticos de pacientes com melanoma de um antígeno codificado pelo gene *env* de HERV-K (SCHIAVETTI et al., 2002). Ainda nesse contexto, em 2015, outro trabalho demonstrou que células T expostas a antígenos de envelope de HERV-K são capazes de ativar resposta de células T citotóxicas HERV-específicas (RYCAJ et al., 2015). A ativação do sistema imune e o uso de proteínas codificadas por HERV-K como antígenos associados ao tumor também foi demonstrado em câncer de mama (WANG-JOHANNING et al., 2003).

No âmbito da possibilidade de utilização de HERVs como antígenos tumor-associados, um paciente diagnosticado com carcinoma renal metastático foi submetido a um transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas não mieloablativas. Após o transplante, células T CD8⁺ do doador mostraram-se reativas às células tumorais do hospedeiro, levando a regressão do tumor. Após análise, constatou-se que o gene responsável pela síntese do antígeno tumoral era derivado de HERV-E. Este estudo evidencia a imunogenicidade *in vivo* dos HERVs e possibilidade de utilização de seus produtos em imunoterapias tumorais (TAKAHASHI et al., 2008). Transcritos do gene de envelope de HERV-H encontrados em tumores gastrointestinais também foram capazes de induzir resposta imune, revelando mais uma família de HERV com amplo potencial imunoterapêutico (MULLINS; LINNEBACHER, 2012).

Um trabalho recente demonstrou a possibilidade da utilização dos retrovírus endógenos como marcadores prognósticos. O estudo avaliou o nível de expressão do gene de envelope das famílias de HERV-R, HERV-H, HERV-K e HERV-P no sangue de pacientes com câncer de mama. As análises feitas em pacientes virgens de tratamento mostraram alto nível de expressão dos genes de envelope de todas as famílias. Após o tratamento com

quimioterapia, os níveis de expressão reduziram a níveis equiparáveis aos pacientes controle (RHYU et al., 2014).

Os HERVs também são capazes de causar imunossupressão como os demais vírus exógenos (HARAGUCHI; GOOD; DAY-GOOD, 2008). Embora não sejam conhecidos os mecanismos e padrões de interação moleculares envolvidos na modulação da resposta imune, a disfunção dessa resposta é provavelmente mediada por proteínas de envelope retrovirais (MANGENEY; HEIDMANN, 1998a). Os trabalhos realizados por Mangeney e colaboradores demonstraram as propriedades imunossupressoras das proteínas de envelope dos retrovírus da leucemia murina de Moloney (MANGENEY; HEIDMANN, 1998b) e retrovírus símios (vírus dos macacos de Mason-Pfizer) (BLAISE; MANGENEY; HEIDMANN, 2001). Células tumorais expressando o gene de envelope dos retrovírus foram enxertadas em ratos imunocompetentes. Ao contrário do esperado, as células foram capazes de evadir da resposta imune e proliferaram. O mesmo grupo, em um segundo trabalho, obteve o mesmo resultado em experimentos feitos com retrovírus endógenos humanos da família H. Ambos os resultados denotam uma importante correlação entre retrovírus endógenos e exógenos, iniciando uma nova vertente para futuras análises associadas ao processo de tumorigênese causada por vírus (MANGENEY et al., 2001).

1.6 HERV e câncer infantil

Há apenas dois trabalhos na literatura referentes a atividade de HERV em tumores que acometem crianças e adolescente. O primeiro trabalho descreveu um aumento na expressão de HERV em pacientes com leucemia linfoblástica resistentes à terapia, quando comparado às células da medula óssea em remissão. Além disso, foram avaliadas as células do sangue periférico de amostras controle e célula da medula óssea de pacientes livres da doença, onde o retrovírus não foi expresso (IWABUCHI et al., 2004). O segundo estudo avaliou a expressão do gene de envelope das famílias K e W em crianças com leucemia linfoblástica aguda e leucemia mielóide aguda. A família K foi a única que apresentou aumento de expressão, mas apenas para os pacientes com leucemia mielóide aguda, apresentando uma expressão específica para este tumor (JANUSZKIEWICZ-LEWANDOWSKA et al., 2013).

1.6.1 HERV e Neuroblastoma

O neuroblastoma ainda persiste como um grande desafio para os oncologistas pediátricos, apesar dos grandes avanços terapêuticos e em técnicas de diagnóstico. Tumores de risco elevado, diferentemente dos demais, apresentam sucesso reduzido no tratamento das crianças portadoras, provocando uma taxa de mortalidade muito elevada. Outro grave problema é a inexistência de um método de diagnóstico eficaz em fase precoce, sendo a maioria feita na fase tardia, onde o tumor já se encontra em estadió metastático. Tendo tudo isso como premissa, o neuroblastoma passou a ser classificado como doença heterogênea do ponto de vista de seus aspectos biológicos, genéticos e morfológicos com comportamento clínico diferente. Isso faz dele um importante alvo para a pesquisa de marcadores moleculares que possam auxiliar o diagnóstico, bem como melhorar a estratificação tumoral.

Diversas famílias de retrovírus endógenos estão presentes no genoma humano, em diferentes graus de integridade, e são ativamente expressas frente a distintas condições. A atividade de HERVs é geralmente tecido-específica, e tem sido cada vez mais relacionada a patologias como câncer, doenças autoimunes e até com a presença de outros vírus. Entretanto, os fatores que levam aos diferentes padrões de expressão dos mesmos ainda não são compreendidos.

Atualmente, o conhecimento existente ainda é limitado para avaliar o real papel dos HERVs na etiologia dos diferentes tipos de câncer. Além disso, por ser uma doença multifatorial, o câncer possui mais de um agente causador, que varia desde fatores genéticos, comportamentais e ambientais, até agentes infecciosos. Isso dificulta ainda mais a determinação de uma correlação direta entre HERVs e a tumorigênese.

Uma característica relativamente comum apresentada por diversos estudos que avaliaram a atividade de HERVs em diferentes tipos de tumores, foi o aumento na expressão desses retrovírus quando comparados a tecidos normais. Independente dos fatores que levam a esse aumento de expressão, esta particularidade abre precedentes para a possibilidade de uso dos retrovírus endógenos como uma ferramenta para o

acompanhamento de progressão da doença. Apesar de diversos estudos mostrarem uma diferença na expressão de HERVs em diversas patologias, há poucas informações relacionadas aos *loci* específicos de HERV que contribuem para o *pool* de RNA celular em diferentes tecidos, e também como a de expressão de *loci* individuais de HERV variam, por exemplo, entre as condições de saúde e doença.

Tendo em vista a importância de se dar continuidade à investigação da relação entre a expressão das diversas famílias de HERVs e o hospedeiro em condições patológicas, este trabalho consistiu em determinar a expressão dos retrovírus endógenos humano das famílias K, W e H em pacientes com diagnóstico de neuroblastoma. Nossos resultados apontam para alteração significativa nos níveis de expressão de alguns *loci* específicos de HERV no tumor, quando comparado aos controles. A relevância desse estudo justificou-se não só enquanto pesquisa básica, mas também por sugerir uma possível associação entre a expressão de HERV e o diagnóstico clínico do neuroblastoma. Além disso, nosso estudo abre precedentes para que novos estudos validem a possibilidade de uso desses retrovírus como um marcador eficiente para a detecção mais precoce desta patologia. Dessa forma, um panorama da atividade de HERVs não apenas em neuroblastoma, mas em uma gama de tumores dos mais diversos tipos e origens pode ser fundamental não somente para o estabelecimento de marcadores, mas também para o entendimento do transcriptoma de HERVs que é tão variável.

2 OBJETIVO GERAL

Este projeto teve como objetivo central estudar a expressão de retrovírus endógenos de diferentes famílias em pacientes diagnosticados com neuroblastoma. Para tal, foi investigada a expressão das famílias de retrovírus endógenos (HERV-K, HERV-W e HERV-H) em fragmentos de neuroblastoma coletados no Instituto de Tratamento de Câncer Infantil (ITACI) e Hospital de Câncer de Barretos (HCB).

2.1 Objetivos Específicos

- A** - Avaliar a expressão de HERVs em fragmentos derivados do tumor excisado de pacientes diagnosticados com neuroblastoma;
- B** - Mapear no genoma humano os *loci* específicos dos HERVs que foram expressos, através de sequenciamento de nova geração;
- C** - Comparar os *loci* expressos nas amostras tumorais com amostras controle;
- D** - Correlacionar os dados encontrados com o contexto genético da integração do provírus.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de amostras tumorais

Durante o desenvolvimento do estudo foram coletadas 19 amostras de crianças com diagnóstico clínico e histopatológico de neuroblastoma, provenientes de dois centros colaboradores: Instituto de Tratamento de Câncer Infantil e Hospital de Câncer de Barretos. Todas as amostras foram encaminhadas de maneira codificada e apenas informações de idade, sexo, diagnóstico, estadiamento, tratamento, evolução do quadro clínico, recidiva e data da coleta foram fornecidas, não havendo aplicação de TCLE.

As amostras provenientes do biobanco do HCB (n=13), foram fornecidas na forma de RNA total extraído, dado que este biobanco não fornece fragmentos de tecidos em projetos de colaboração. As demais amostras provenientes do ITACI (n=8) foram coletadas durante a cirurgia para remoção do tumor ou durante a realização da biópsia para diagnóstico, realizadas no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O fragmento excisado, tamanho médio de 1 cm³, foi acondicionado em tubo de 2 mL contendo a solução RNA *Stabilization Reagent later*TM (QIAGEN, Alemanha), visando garantir a integridade do RNA e estocado em freezer a -80 °C.

3.2 Coleta de amostras controle

Como amostras controle, foram coletadas 34 autópsias de glândulas adrenais (16 fetais, 14 pediátricas, 4 desconhecidas), sendo apenas uma amostra fetal advinda do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP) e as demais do Serviço de Verificação de Óbito da Capital de São Paulo (SVO). Todas as amostras foram encaminhadas de maneira codificada e apenas informações de idade, sexo, causa da morte, peso, doença principal e intervalo de tempo *post mortem* foram fornecidos, não havendo aplicação de TCLE. Em ambos os centros de coleta, as amostras foram coletadas no momento da necropsia, sendo incluídas amostras de natimortos, recém-nascidos e crianças com idade entre 0 – 18 anos. Foram excluídas do estudo amostras que se apresentaram maceradas ao exame de necropsia ou cuja a causa da morte tenha afetado as glândulas adrenais.

Durante a necropsia, as glândulas adrenais dos pacientes foram removidas e acondicionadas em tubo tipo Falcon estéril e imediatamente estocadas em geladeira (+4 °C). As amostras foram transportadas em gelo até o Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática, onde foram lavadas com solução PBS estéril pH 7.4, armazenadas em novos tubos tipo Falcon estéreis contendo a solução estabilizadora de RNA – *Stabilization Reagent later*TM (QIAGEN) e estocadas a -80 °C.

3.2.1 Dissecação

Posto que o neuroblastoma desenvolve-se, na maioria dos casos, na região medular da glândula adrenal, as amostras controle foram submetidas a dissecação e análise macroscópica, utilizando-se bisturi e lâmina estéril. Um corte coronal foi feito na glândula e em seguida a região medular foi separada do córtex por raspagem. As amostras foram divididas em cortes espelhados (duas partes iguais) e estocadas novamente em RNA *Later*. A primeira parte foi utilizada para extração de RNA total e a segunda para análise histopatológica convencional e imuno-histoquímica.

3.2.2 Inclusão do tecido em parafina

Os fragmentos de adrenal foram fixados em formalina a 10%, com pH entre 7.2 - 7.4 (LS Chemicals, Índia) em um período de 24 horas. Em seguida, o material foi submetido ao histoprocessador para desidratação por etanol (Merck Millipore Corporation - Alemanha) e diafanização por xilol (Merck), sendo este processo feito de maneira sequencial por imersões em diferentes cubas contendo as seguintes soluções: formalina (1 hora), etanol 95% (1 hora), etanol absoluto (4 banhos de 1 hora cada), xilol (3 banhos de 1 hora cada). Por fim, os fragmentos foram acondicionados em cassetes histológicos, incluídos em parafina a 62 °C por 2 horas, resfriados para solidificação e levados ao freezer.

Cortes histológicos de 3 micrômetros foram realizados no micrótomo (Easy Path, São Paulo, SP, Brasil), colocados em banho-maria à temperatura de 45 °C e aderidos a lâmina. Em seguida, foram levados a estufa a 60 °C para fixação na lâmina, por aproximadamente 10 minutos. A coloração foi feita em corador e montador automático (Leica, Alemanha), seguindo o seguinte protocolo: xilol – 2 banhos de 5 minutos para remover a parafina do

corde, etanol absoluto – 2 banhos de 1 minuto cada, etanol 95% – 2 banhos de 1 minuto cada, água corrente – 15 segundos, água destilada – 15 segundos, Hematoxilina (Merck) – 1 minuto, água corrente – 5 minutos, Eosina (Merck) – 3 minutos, etanol 70% – 1 minuto, etanol 95% – 2 banhos de 1 minuto, etanol absoluto – 2 banhos de 1 minuto, xilol – 2 banhos de 1 minuto. A lâmina final foi montada com o equipamento Entellan® (Merck).

3.2.3 Análise Histológica

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, aumento de 100X e avaliadas de acordo com o percentual de região medular presente, autólise, hemorragia e necrose. A determinação do percentual foi calculada através da proporção entre a região contendo tecido medular e o campo total visualizado. Embora esta forma de seleção fique sujeita às variações do observador, esta análise contou com a orientação e experiência do doutor Aloísio Souza Felipe da Silva – patologista e colaborador deste estudo.

3.2.4 Imuno-histoquímica

Procedeu-se a análise de imuno-histoquímica a partir de um segundo corte feito no bloco de parafina, utilizando-se o anticorpo monoclonal de coelho anti-Sinaptofisina – clone YE269 (Biogen, EUA), marcador neuroendócrino para região medular da glândula adrenal. O intuito deste procedimento foi validar a percentagem de região medular presente na amostra pós-dissecação. Os tecidos incluídos em parafina foram cortados em aparelho micrótomo, em cortes de 3 micrômetros de espessura e colocados em lâminas para microscopia. Dentro da Câmara de Pressão Microprocessada Pascal foram colocadas 2 cubas com solução *Trilogy* (Sigma-Aldrich, EUA) diluído 1:100. Em uma das cubas, adicionou-se o cesto com as lâminas em estudo. As cubas foram incubadas na câmara a 121 °C por 5 minutos e transferidas para a seguinte contendo a solução de *Trilogy* quente por mais 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada.

Foram feitos 4 bloqueios de peroxidase endógena utilizando-se água oxigenada 20 volumes. Cada bloqueio foi feito por 5 minutos a temperatura ambiente. Por fim, as lâminas foram lavadas em água destilada e tampão de lavagem TRIS.

As lâminas foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário em geladeira. No dia seguinte, foram lavadas com tampão TRIS. Após a adição do polímero *Reveal complement*, as lâminas foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Após retirar os excessos, o *Reveal HRP Conjugate* foi adicionado e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Mais uma vez, as lâminas foram lavadas com tampão de lavagem TRIS.

A revelação foi feita com o cromógeno DAB líquido (Spring – Biogen, EUA), preparado a partir da adição de 1 gota do Substrato Cromógeno em 1 ml do Tampão Diluente de DAB (Spring – Biogen) e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente.

Após lavagem em água corrente e destilada, foi feita uma contra-coloração com Hematoxilina de Mayer (Merck, Alemanha) por 1 minuto e lavagem em água corrente. Rapidamente, as lâminas foram lavadas em água amoniacal 1%, água corrente, desidratadas em álcool absoluto e imersas em xilol. Por fim, a lâmina foi montada com o equipamento Entellan® (Merck).

3.3 Cultura Celular de Neuroblastoma

Originada a partir da biópsia de medula óssea de uma criança de 4 anos do sexo feminino, a linhagem celular SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) foi estabelecida em garrafas para cultura celular a partir de 1×10^5 contendo meio DMEM High Glucose (Gibco, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco) e 2 mM de L-Glutamina (Gibco) a 37 °C com 2 repiques semanais.

3.3.1 Extração de Ácido Desoxirribonucléico (DNA)

Como controle positivo para as reações, o DNA da linhagem celular SH-SY5Y foi extraído a partir da cultura celular de uma garrafa de 25 cm². As células foram dissociadas após a adição de 1 mL de tripsina-EDTA e contadas em câmara de *Newbauer*. Em seguida, alíquotas contendo 1×10^7 células foram utilizadas para a extração de DNA total. O DNA foi extraído com o kit *Blood & Cell Culture DNA Mini Kit* (QIAGEN, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante, eluído em 30 µL de tampão de eluição e armazenado em freezer – 40 °C.

3.4 Extração de Ácido Ribonucléico (RNA) total

3.4.1 Amostras ITACI e amostras controle

As 8 amostras tumorais e as 34 amostras controle foram maceradas em nitrogênio líquido e submetidas à extração do RNA total. Para tal, foi empregado 1 mL do reagente Trizol (Ambion®, USA) em aproximadamente 3 mm³ de tecido macerado. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 25 °C, para a completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Em seguida, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol (Ambion®) utilizado na primeira etapa, homogeneizado e incubado por 3 minutos a 25 °C.

As amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 minutos a 4 °C. Nesta etapa, a mistura é separada em três fases distintas: fase fenol-clorofórmio (fase vermelha), uma interfase opaca contendo DNA e proteínas e, por fim, uma fase aquosa incolor mais acima, onde se encontra o RNA. A fase aquosa, contendo o RNA, foi transferida para um tubo limpo livre de DNase e RNase. A recuperação do RNA foi feita por precipitação, adicionando-se 0,5 mL de álcool isopropílico para cada 1 mL de Trizol utilizado na primeira etapa. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 4 °C e centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a mesma temperatura de incubação.

O sobrenadante foi removido e o *pellet* lavado 2 vezes com etanol 75% (diluído em água livre de RNase). Entre as lavagens, ocorreu uma centrifugação a 7500 g por 5 minutos a 4 °C. Após a remoção do sobrenadante, o *pellet* contendo o RNA foi seco a temperatura ambiente por 15 minutos. Por fim, o RNA total extraído foi eluído em 30 µL de água ultrapura (livre de RNase e DNase). Em seguida, foi adicionado 1 µL (1U) de inibidor de RNase (Roche Applied Science, Alemanha) ao RNA total extraído para evitar degradação do ácido ribonucleico.

O RNA extraído foi quantificado pela leitura em aparelho NanoDrop (Eppendorf), na absorbância de 260 nm (A_{260}). A pureza do RNA obtido foi determinada pela razão da absorbância de 260 nm pela absorbância de 280nm (A_{260}/A_{280}). Para avaliar a integridade do RNA, em um microtubo de 0,2 mL foram adicionados 5 µL de tampão de uréia 2X, 1 µg de RNA e água (livre de RNase) q.s.p. 10 µL. As amostras foram incubadas a 65 °C por 10 minutos e resfriadas a 4 °C por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% e submetidas à eletroforese, 80 V por 40 minutos. Os RNAs foram

visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta. As imagens foram feitas em aparelho fotodocumentador MultiDoc-It™ 120 Imaging System (UVP, Canadá). A integridade do RNA foi baseada na presença das bandas do RNA ribossomal, 28S, 18S e 5S (Figura 2). As amostras íntegras foram armazenadas em freezer – 80 °C e as demais foram descartadas.

Figura 2 - Integridade do RNA

RNA íntegro - Gel de agarose 1% desnaturante. A integridade das amostras foi avaliada pela presença das bandas 28S, 18S e 5S do RNA ribossomal. Amostras tumorais NN01 e NN02.

3.4.2 Amostras HCB

Uma vez que a regulamentação do biobanco do HCB não permite fornecer fragmentos de biópsias e peças removidas cirurgicamente, a extração do RNAs total das 13 amostras tumorais provenientes do HCB foram feitas pelos técnicos responsáveis pelo mesmo. O RNA foi extraído utilizando-se o kit QIAasympphony RNA Kit (QIAGEN, Alemanha) e o equipamento QIAasympphony (QIAGEN, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, a qualidade do RNA foi avaliada com o kit Agilent RNA 6000 Nano (Agilent Technologies, USA) em equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). O resultado foi avaliado com auxílio do software Agilent 2100 Expert (Agilent Technologies, USA). O software gera uma pontuação após a avaliação de integridade do RNA (RIN - RNA Integrity Number score) que pode variar de 1 a 10, sendo 1 a mais baixa e 10 a mais alta. Valores de 6 a 10 indicam um RNA de boa qualidade para uso em biologia molecular. Por fim, o material que apresentou um RIN dentro do esperado foi estocado em freezer –80 °C e os demais descartados.

3.4.3 Cultura Celular

A extração de RNA da cultura da linhagem celular SH-SY5Y foi feita a partir de 1×10^7 células pelo método de Trizol (Ambion®, USA), como descrito no item 3.9.1. O RNA total extraído foi eluído em 30 μ L de água ultrapura (livre de RNase e DNase). Assim como nas demais amostras, foi adicionado 1 μ L (1U) de inibidor de RNase (Roche Applied Science) ao RNA total extraído para evitar degradação do ácido ribonucleico. O RNA extraído foi quantificado pela leitura em aparelho NanoDrop (Eppendorf), na absorbância de 260 nm (A_{260}). A pureza do RNA obtido foi determinada pela razão da absorbância de 260 nm pela absorbância de 280 nm (A_{260}/A_{280}). A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1% desnaturante (3.4.1). Em seguida o material íntegro foi armazenado em freezer -80°C .

3.5 Tratamento do Ácido Ribonucléico com enzima DNase

Com objetivo de eliminar qualquer contaminação com DNA genômico residual, os RNAs extraídos foram tratados com o kit turbo DNA-free (Ambion®, USA). Aos 30 μ L de RNA extraídos foram acrescentados 0,1 volume do tampão turbo DNase 10X e 2 μ L de TURBO DNase, seguido por incubação a 37°C por 30 minutos. Para inativar a enzima e retirar os sais, 0,1 volume do tampão de inativação foi adicionado e incubado em temperatura ambiente por 2 minutos, com homogeneização em *vortex* a cada 30 segundos. A amostra tratada foi centrifugada a 10.000 g por 3 minutos e o sobrenadante de RNA purificado foi transferido para um novo tubo 1,5 ml.

A eficácia do tratamento com a enzima DNase foi verificada por PCR direta sem transcrição reversa do gene constitutivo RPL-27 (Tabela 3). Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% e submetidas à eletroforese, 80 V por 40 minutos. Os produtos gerados foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta. As imagens foram feitas em aparelho fotodocumentador MultiDoc-It™ 120 Imaging System (UVP, UK). O RNA devidamente purificado foi quantificado pela leitura em aparelho NanoDrop (Eppendorf, Alemanha), na absorbância de 260 nm (A_{260}). A pureza do RNA obtido foi determinada pela razão da absorbância de 260 nm pela absorbância de 280 nm (A_{260}/A_{280}).

3.6 Desenho de Oligonucleotídeos

A partir de sequências obtidas dos bancos de dados públicos GenBank e UCSC, três bancos de dados para o gene de envelope de HERV, contendo em média 100 sequências cada, foram construídos para as três famílias de HERV abordadas neste estudo: H, W e K. As sequências de cada banco foram alinhadas no programa muscle v3.8.31. As sequências alinhadas foram analisadas no programa MEGA v5.1 e BioEdit v7.2.5 e as regiões conservadas foram selecionados para desenhos dos iniciadores. Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram desenhados com o programa Primer3web v4.0. Temperaturas de desnaturação (T_m) similares foram selecionadas para facilitar as padronizações das reações de One Step PCR *in house* (FERREIRA et al., 2012). Para cada família de HERV, foram desenhados um par de oligonucleotídeo. As otimizações das reações de PCR foram realizadas com DNA de cultura celular de neuroblastoma (SH-SY5Y). Os iniciadores que não apresentaram especificidade ou eficiência desejada foram redesenhados.

Como controle endógeno um par de oligonucleotídeo específico foi utilizado para o gene RPL-27, dado que a expressão deste gene não mostrou variação quando analisados em diferentes tecidos e condições de saúde e doença (DE JONGE et al., 2007). Todos os iniciadores (Tabela 3) foram sintetizados pela empresa IDT Síntese Biotecnologia (IDT – Integrated DNA Technologies, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) na concentração de 25 mM.

Tabela 3 - Lista de iniciadores que foram utilizados no estudo

Nome do Iniciador	Sequência (5' - 3')	Tamanho do fragmento (pb)
WE8_F	CCCATACCTCAAACCTCACC	750
WE8_R	ACAGGGTCCAAAGAGGAGTA	
HE1_F	GCTATCTCCACCACACTATCAAC	950
HE1_R	CCACAGAGGAAGAAGAGACC	
HK_univ_F	TGATCTGAGCATCACTGGGA	1100
HK_univ_R	GCTTACCGTAAGGCTGACTGT	
RPL-27	TCTGGTGGCTGGAATTGACC	232
RPL-27	AAACTTGACCTTGGCCTCCC	

3.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Cada par de iniciadores sintetizado foi testado para verificar a sua especificidade e temperatura de anelamento ideal, utilizando como molde o DNA da linhagem celular SH-SY5Y. Cada reação foi realizada em volume final de 25 µl utilizando-se de 1 µl de DNA (~15 nanogramas), 10 pmol de cada iniciador, 0,4 mM de dNTP, 2,0 mM de MgCl₂, tampão 1X e 1,5 U de Taq polimerase (Invitrogen, USA). Durante a etapa de padronização da PCR, três temperaturas de hibridização dos iniciadores foram testadas. Para tal, foi utilizado um ciclo inicial de 95 °C por 2min e 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C / 58 °C / 60 °C por 30s e 72 °C por 1 minuto, com uma extensão final de 72 °C por 10min. As amostras foram então verificadas em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (0,1 µg/ml). Os fragmentos de DNA foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta. As imagens foram feitas em aparelho fotodocumentador MultiDoc-It™ 120 Imaging System (UVP).

3.8 Clonagem

Para validar a variabilidade de *loci* amplificados pelos iniciadores das famílias de HERV, os produtos de PCR gerados (*amplicons*) a partir do DNA extraído da linhagem celular SH-SY5Y foram clonados utilizando o kit TOPO TA (Invitrogen, USA), seguindo as instruções do fabricante. Após a ligação, 1 µl de cada ligação foi transformado em bactérias quimiocompetentes Qiagen EZ (QIAGEN, Alemanha) por choque térmico (42 °C, 30 segundos). Em seguida, adicionou-se 250 µl de meio SOC e incubou-se a 37 °C por 1 hora. Após este período, 50 µl de cada transformação foi plaqueado em meio LB sólido com Kanamicina [50 µg/µl] (Sigma Aldrich) e incubado a 37 °C por 16 horas. As colônias de cada placa foram inoculadas em meio LB-Kanamicina líquido [50 µg/µl] e incubadas a 37 °C por 16 horas. Para a extração dos plasmídios utilizou-se o Plasmid Mini kit (QIAGEN, Alemanha), seguindo estritamente as instruções do fabricante.

3.8.1 Sequenciamento dos produtos clonados

Para verificar se as regiões amplificadas correspondiam à HERV e também verificar a variabilidade de *loci* amplificados, cada clone foi sequenciado através do método de terminação de cadeia de Sanger, em sequenciador automático ABI-PRISM 3100 (Applied Biosystems, USA). Para a reação de sequenciamento, a quantidade de DNA utilizada variou de 20 – 50 ng, devido a diferença no tamanho dos fragmentos entre as famílias de HERV (Figura 3).

Figura 3 - Quantidade de DNA necessária para sequenciamento por Sanger

Fonte: <http://genoma.ib.usp.br/pt-br/servicos/sequenciamento/produto-de-pcr-qualidade-e-quantificacao>

Foram adicionados ao DNA, 0,8 µl de Big Dye (Big Dye v.3.0 - Applied Biosystems, USA), 3 µl de tampão de sequenciamento (5X) (Applied Biosystems, USA), 2,4 pmol de iniciador e água ultrapura para completar o volume final para 10 µl. A ciclagem em termociclador foi de 96 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 96 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg e 60 °C por 4 min. Para a remoção de dideoxynucleotídeos não incorporados, foi realizada uma precipitação com o kit BigDyeXTerminator (Applied Biosystems, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, a placa foi levada ao sequenciador e as sequências geradas foram analisadas através do programa *Sequencing Analysis* v3.7 (Applied Biosystems, USA). Cada clone foi sequenciado com ambos os iniciadores correspondentes a cada família de HERV. As sequências consenso foram geradas através do programa CodonCode Aligner v 1.2.1 (CodonCode Corporation, Dedham, MA, US). Com o intuito de avaliar a especificidade do produto sequenciado e a variabilidade de *loci* encontrados, todas as sequências consenso obtidas foram comparadas com os bancos de dados gerados a partir do UCSC – BLAT.

3.9 Obtenção de cDNA e purificação dos amplicons

O DNA complementar (cDNA) foi gerado a partir do protocolo validado em nosso laboratório, denominado *One Step in house*, adaptado do protocolo desenvolvido por Ferreira et al. (2012). Este protocolo consiste na mistura de dois kits: One Step SuperScript III (Invitrogen, Thermofisher, EUA) e Taq Platinum High Fidelity (Invitrogen). Cada reação foi realizada em volume final de 25 µl e os iniciadores utilizados foram: WE8, HE1, HK_univ e RPL27. O MasterMix foi preparado a partir de 2,5 µl de tampão 10XPCR High Fidelity, 0,5 µl de dNTPs (10mM), 1,25 µl de DTT (0.1mM), 1 µl de MgSO₄ (50mM), 0,25 µl de Inibidor Rnase (40 U/µL), 0,1 µl de RT Superscript III, 0,125 µl de Taq Platinum High Fidelity (5 U/µL), 0,5 µL de iniciador senso (10pmol), 0,5 µL de iniciador antisenso (10pmol), 2,5 µl de RNA (400ng) e 15,775 µl de água livre de DNase/RNase. A ciclagem em termociclador foi de 50 °C por 30 minutos, 94 °C por 2 minutos e 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 58 °C por 30 segundos, 68 °C por 2,5 minutos e 68 °C por 10 minutos.

Uma das vantagens deste protocolo é que as duas reações que normalmente ocorrem em etapas separadas, passam a ocorrer no mesmo tubo, ou seja, após a etapa de retrotranscrição, ocorre a PCR para amplificação dos cDNAs específicos utilizando os

mesmos pares de iniciadores da etapa anterior. Além disso, como a retrotranscrição do RNA ocorre por meio de iniciadores específicos o rendimento final da reação é aumentado.

Os produtos amplificados (*amplicons*) gerados na PCR One Step *in house* foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo [0,1µg/ml] e visualizados em transluminador de luz ultravioleta. As imagens foram feitas em fotodocumentador MultiDoc-ItTM 120 Imaging System (UVP).

As bandas positivas para a região de interesse foram cortadas do gel utilizando-se bisturi estéril e colocadas em tubo de 1,5 mL. Em seguida, as bandas foram purificadas a partir do gel com o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, Alemanha) e armazenadas a – 20 °C.

3.10 Sequenciamento Nova Geração

Duas plataformas de sequenciamento de nova geração foram utilizadas neste estudo para detectar e validar a diversidade dos loci gênicos expressos: Ion Torrent PGM (Life Technologies, USA) e MiSeq Illumina (Illumina, CA, USA).

3.10.1 Plataforma Ion Torrent PGM (Life Technologies)

Inicialmente, a plataforma Ion Torrent (Life Technologies) foi utilizada devido a sua disponibilidade, sendo o sequenciamento feito através do método de *amplicon*.

Os *amplicons* das amostras tumorais NN01 e NN02 para as famílias HERV-W e HERV-H foram quantificados com o kit Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, USA) no equipamento Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Em um microtubo Costar® de 0,65 mL (Covaris Inc., Woburn, MA, USA) contendo 50 µL de tampão Low TE, pH 8,0 (Life Technologies) foi adicionado 1 µg de DNA. O material foi conduzido para o equipamento Covaris®S2 (Covaris Inc.), por 5 ciclos de 90 segundos cada. Em seguida, foi novamente quantificado por Qubit. O tamanho dos fragmentos obtidos foi confirmado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (0,1 µg/mL), a partir de uma alíquota de 1 µL. O gel foi visualizado em transluminador de luz ultravioleta. As imagens foram feitas em fotodocumentador MultiDoc-ItTM 120 Imaging System (UVP).

A construção das bibliotecas foi feita com o kit Ion Fragment Library (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. A PCR em emulsão e o enriquecimento da amostra foram feitos com o kit Ion ExpressTM Template v2.0 (Life Technologies, EUA). Por fim, as bibliotecas prontas foram sequenciadas em equipamento Ion Torrent de acordo com as especificações do fabricante. O sequenciamento ocorreu em um chip de 314 (capacidade de 5 milhões de *reads*) de acordo com as instruções do fabricante.

3.10.2 Plataforma MiSeq (Illumina)

No decorrer deste estudo, as amostras passaram a ser sequenciadas pela plataforma Illumina devido a disponibilidade do equipamento MiSeq no Centro de Facilidade de Apoio à Pesquisa (CEFAP) no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Além disso, quando comparada aos demais sequenciadores de nova geração, esta plataforma apresenta um custo por base muito inferior e menores taxas de erro.

Assim como foi feito para a plataforma Ion Torrent, os *amplicons* de cada amostra tumoral e controle (HERV-W, HERV-H e HERV-K) foram quantificados com o kit *Qubit® dsDNA HS Assay* (Molecular Probes, Life Technologies, EUA) no equipamento Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. A fragmentação dos *amplicons* a partir de 1ng de amostra, foi feita utilizando o kit de preparação de biblioteca Nextera XT (Illumina), sendo o volume final de 5 µL, de acordo com a recomendação do fabricante. Este kit utiliza um método enzimático, denominado “tagmentação”, onde um transposon, simultaneamente, fragmenta e liga o adaptador às extremidades do fragmento.

Na sequência, foi realizada uma PCR de 12 ciclos contendo a combinação ideal entre index, sequências de nucleotídeos específicas que se ligam às regiões dos adaptadores e permitem que posteriormente, as amostras sejam separadas por bioinformática.

Após a PCR, o DNA amplificado foi purificado utilizando o kit Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, CA, EUA), no intuito de eliminar fragmentos muito curtos da biblioteca e além de sobras de iniciadores, dNTPs e excesso de sais. Em seguida, as bibliotecas foram quantificadas e normalizadas por PCR quantitativa, utilizando o kit SYBR Fast Illumina Library Quantification (KAPA Biosystems, EUA) segundo as instruções do fabricante, em equipamento Rotor-Gene (QIAGEN, Alemanha). O tamanho médio das

bibliotecas foi analisado em equipamento 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Os resultados obtidos na PCR quantitativa somado aos resultados do Bioanalyzer, permitiram com que fosse feita a normalização equimolar entre as amostras para posterior sequenciamento. Ao final do procedimento, foram adicionados 2 nM do *pool* (mistura equimolar de todas as amostras) em tampão HT1, sendo o volume final de 600 µL, e levado ao equipamento Illumina MiSeq para sequenciamento.

3.11 Montagem do banco de dados referência

As sequências referências utilizadas para montar os *reads* sequenciados, foram obtidas do banco de dados UCSC e por montagem *de novo* das amostras de DNA e RNA da linhagem celular SH-SY5Y sequenciadas. As montagens de novo foram feitas através do software Geneious V7.1.5 com estringência de 99,9%. As sequências do banco de dados UCSC foram obtidas a partir de uma PCR *in silico* realizada no site <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>, utilizando os pares de iniciadores desenhados para este estudo e o genoma humano hg19 utilizado como molde. Os resultados obtidos foram utilizados de “iscas” para busca de sequências similares no banco de dados do NCBI através da ferramenta BLAST, sendo que apenas sequências que apresentaram 95 – 100% de identidade foram selecionadas.

3.12 Montagem das sequências

Os programas CLC Genomics Workbench v5.5 e Geneious v7.1.5 foram utilizados na montagem das sequências de HERV. Inicialmente, um relatório geral completo foi emitido para todas as amostras contendo as seguintes informações sobre os reads gerados: número total, comprimento (pb), qualidade (média PHRED score), cobertura por base (%), bases contendo ambiguidade (%), conteúdo GC (%) e nível de duplicação das sequências. A partir dessas informações, todas as sequências que apresentaram os seguintes parâmetros foram removidas (trimadas): regiões de baixa qualidade ($Q < 30$), regiões que contenham adaptadores e iniciadores, sequências ambíguas, sequências menores do que 40 pb e maiores do que o limite de cada *flow cell*. Artefatos como adaptadores, por exemplo, são indesejados por causarem de erros nas análises posteriores dos dados.

Após esta etapa, as montagens dos *clusters* foram feitas utilizando-se 91, 36 e 338 sequências referência específicas para as famílias H, W e K de HERV, respectivamente. Adotou-se uma estringência mínima de 99% de similaridade durante as montagens. Os *reads* que não se encaixaram nos parâmetros estabelecidos foram montados *de novo* e os contigs gerados contrastados com o banco de dados NCBI através da ferramenta BLAST, para detecção de possíveis contaminantes e determinação da origem destes. O mesmo *pipeline* (Figura 4) foi utilizado para ambos os programas.

Figura 4 - *Pipeline* utilizado para montagem das sequências

3.13 Mapeamento e análises dos reads

As sequências montadas foram mapeadas no genoma humano através da ferramenta BLAT. Foi estabelecido um valor limite de divergência aceito para cada *match* de 1%, que levou em conta os polimorfismos de HERVs existentes inter-população (DEB et al., 1998; ZHAO et al., 2000). Após a determinação dos prováveis *loci* de origem, as LTRs dos respectivos provírus foram avaliadas através das ferramentas HERV pparser (HERV genome

browser) e BLAT (UCSC Genome Bioinformatics: FAQ) e Repeat Masker (<http://www.repeatmasker.org/>). Além disso, uma avaliação do contexto genético do hospedeiro onde o HERV foi localizado também foi feita.

3.13.1 *Análise do perfil de expressão por Heat Map*

A visualização do perfil de expressão dos dados obtidos foi feita pela técnica de Heat Map, que consiste na apresentação de uma matriz de dados com uma escala de cores representando os valores dos dados. O gráfico foi construído e gerado através do site <http://discover.nci.nih.gov/cimminer/home.do>

3.14 *Análise Estatística*

A comparação entre os *loci* expressos das amostras tumorais e controle e entre amostras de natimortos e pediátricas foram feitas através do teste não paramétrico de Mann-Whitney (U). Ademais, análises de variância (*One-way ANOVA*) e o teste de Kruskal-Wallis foram feitos para comparar a diferença de expressão entre os diferentes estádios tumorais. Ambos os testes foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism 6 (Prism - graphpad.com) e QTIplot.

4 RESULTADOS

4.1 Dados gerais amostras controle

Foram coletadas 34 autópsias, totalizando 54 amostras controle (20 bilaterais, 14 unilaterais). Quatro amostras foram classificadas como desconhecidas, pois não possuíam nenhuma informação no momento da coleta. Dados clínicos foram obtidos em 27/34 das autópsias. Dentre as 34 autópsias, 16 foram de natimortos, cuja a idade gestacional variou de 20 a 40 semanas (mediana = 32, média = 30) sendo, 7 femininas, 8 masculinas e 1 não informado. Entre as autópsias pediátricas, a idade variou de 5 min a 13 anos (4 casos <24h); sendo, 4 femininos e 8 masculinos (Tabela 4).

Tabela 4 - Dados clínicos amostras controle: sexo

Amostras	Feminino	Masculino	Não informado	Total
Natimortos	7	8	1	16
Pediátricos	4	8	2	14
Total	11	16	3	30

Anóxia intra-uterina e broncopneumonia foram as principais causas de óbito entre os natimortos e os casos pediátricos, respectivamente. Dentre as 34 autópsias, 13 foram indeterminadas, ou seja, não tiveram a causa do óbito identificada. O intervalo *post mortem* das amostras controle variou de 0 a 81 horas (Tabela 5), sendo que durante este intervalo os indivíduos foram mantidos a 4 °C.

Tabela 5 - Intervalo *Post mortem* das amostras controle

Amostras	Média (horas)	Mediana (horas)	Mínimo (horas)	Máximo (horas)
Natimortos	22,3	17,9	0	60,3
Pediátricos	25,6	20,25	12	80,96

4.1.1 Dissecção amostras controle

O tamanho das glândulas adrenais coletadas variou de acordo com a idade de cada indivíduo. A região medular de glândulas adrenais menores de 1 cm³ foram imperceptíveis a

análise macroscópica e de difícil dissecação (Figura 5). Nestes casos, não houve separação de região medular e cortical, apenas um corte coronal foi feito no tecido e o material dividido em duas partes para análises de histologia/imunohistoquímica e extração de RNA. Do total de amostras coletadas (54), 6 apresentaram-se maceradas ao momento da dissecação e foram descartadas.

Figura 5 - Dissecação amostra controle CO-05

4.1.2 *Análise histológica e imunohistoquímica*

Os critérios adotados para análises histológicas e imunohistoquímicas foram: identificação de tecido, grau de autólise, hemorragia, presença/ausência e estimativa da porcentagem de região medular (Figura 6 – 10).

Figura 6 - Glândula Adrenal Normal (controle positivo)

Glândula Adrenal Normal (controle positivo). Coloração HE (coluna esquerda). Imuno-histoquímica: anticorpo anti-sinaptofisina (coluna esquerda). A e B: Aumento de 25 X. C e D: Aumento de 100 X. E e F: Aumento de 200 X. G e H: Aumento de 400 X.

Figura 7 - Autólise Leve, hemorragia discreta e presença de região medular

Autólise Leve, hemorragia discreta e presença de região medular. Amostra CO_26B. Coloração HE (A, B, C e E). Imuno-histoquímica: anticorpo anti-sinaptofisina (coluna esquerda). C e D: Aumento de 100 X. A: Aumento de 200 X. B, E e F: Aumento de 400 X.

Figura 8 - Autólise moderada, hemorragia discreta e presença da região medular.

Autólise moderada, hemorragia discreta e presença da região medular. Amostra CO_27B. Coloração HE (A, B, C, E e G). Imuno-histoquímica: anticorpo anti-sinaptofisina (D, F e H). C e D: Aumento de 100 X. A, E e F: Aumento de 200 X. B, G e H Aumento de 400 X.

Figura 9 - Degradação leve, ausência de hemorragia e presença de região medular.

Degradação leve, ausência de hemorragia e presença de região medular. Amostra CO_28. Coloração HE (coluna esquerda). Imuno-histoquímica: anticorpo anti-sinaptofisina (coluna esquerda). A e B: Aumento de 100 X. C e D: Aumento de 200 X. E e F: Aumento de 400 X.

Figura 10 - Degradação Intensa, hemorragia discreta e presença da região medular

Degradação Intensa, hemorragia discreta e presença da região medular. Amostra CO_20A (A, B, C e D). Amostra CO_20B (E e F). Coloração HE (coluna esquerda). Imuno-histoquímica: anticorpo anti-sinaptofisina (coluna esquerda). A e B: Aumento de 100 X. C e D: Aumento de 200 X. E e F: Aumento de 400 X.

Das 48 amostras analisadas (Tabela 6), 7 não eram provenientes das glândulas adrenais e foram descartadas. Além disso, outras 5 amostras não apresentaram material suficiente para estas análises e foram avaliadas apenas macroscopicamente. No total, 36 amostras controle, advindas de 20 pacientes foram incluídas nas análises histológicas e de imunohistoquímica.

Tabela 6 - Análises histológicas e imunohistoquímicas das amostras controle

Amostra	Tecido	Autólise	Hemorragia	Região Medular	Porcentagem	Status
CO_01A	Adrenal	*	*	*	*	Incluída
CO_01B	Adrenal	*	*	*	*	Incluída
CO_03	Adrenal	Moderada	Discreta	Positivo	> 1%	Incluída
CO_04	Adrenal	Moderada	Discreta	Positivo	> 1%	Incluída
CO_05	Adrenal	Leve	Moderada/Intensa	Positivo	> 1%	Incluída
CO_06A	Rim	**	**	**	**	Excluída
CO_06B	Rim	**	**	**	**	Excluída
CO_07A	Tecido Adiposo	**	**	**	**	Excluída
CO_07B	Tecido Adiposo	**	**	**	**	Excluída
CO_08A	Provável Rim	**	**	**	**	Excluída
CO_08B	Rim ou Pâncreas imaturo	**	**	**	**	Excluída
CO_09A	Adrenal	Moderada	Discreta	Positivo	0,01	Incluída
CO_09B	Adrenal	Moderada	Discreta	Negativo	0	Excluída
CO_10A	Adrenal + Tecido Muscular + Adiposo	Severa	Discreta	-	-	Excluída
CO_10B	Adrenal + Tecido Muscular + Adiposo	Severa	Discreta	-	-	Excluída
CO_11A	Adrenal	Moderada/Intensa	Discreta	Positivo	> 1%	Excluída
CO_11B	Adrenal	Moderada/Intensa	Discreta	Negativo	0	Excluída
CO_13A	Adrenal	Moderada/Intensa	Discreta	Positivo		Incluída
CO_13B	Adrenal	Moderada	Discreta	Positivo	> 1%	Incluída
CO_14A1	Adrenal	Moderada	Discreta	Negativo	0	Excluída
CO_14A2	Adrenal	Moderada/Intensa	Discreta	-	-	Excluída
CO_14B1	Tecido Adiposo	**	**	**	**	Excluída
CO_14B2	Adrenal	Moderada/	Discreta	Positivo		Excluída

Intensa						
CO_16A	Adrenal	Intensa	Discreta	Positivo	> 1%	Excluída
CO_19A	Adrenal	Moderada/ Intensa	Discreta	Positivo	> 1%	Incluída
CO_19B	Adrenal	Moderada	Moderada	Negativo	0	Incluída
CO_20A	Adrenal	Intensa	Discreta	Positivo	0,01	Excluída
CO_20B	Adrenal	Intensa	Discreta	Positivo	0,01	Excluída
CO_21A	Adrenal	Moderada	Discreta	Positivo	> 1%	Incluída
CO_21B	Adrenal	Intensa	Discreta	Negativo	0	Incluída
CO_22A	Adrenal	Moderada	Moderada	Positivo	> 1%	Excluída
CO_22B	Adrenal	Moderada/ Intensa	Moderada	Positivo	> 1%	Excluída
CO_23	Adrenal	Moderada/ Intensa	Discreta	Positivo	0,01	Incluída
CO_24A	Adrenal	Intensa	Moderada	Positivo	> 1%	Excluída
CO_24B	Adrenal	Intensa	Moderada	Positivo	> 1%	Excluída
CO_25A	Adrenal	Intensa	Moderada	Positivo	> 1%	Excluída
CO_26A	Adrenal	Moderada	Discreta	Negativo	0	Excluída
CO_26B	Adrenal	Leve/Moderada	Discreta	Positivo		Excluída
CO_27A	Adrenal	Moderada	Discreta	Positivo	>1%	Incluída
CO_27B	Adrenal	Moderada	Discreta	Positivo	0,01	Incluída
CO_28A	Adrenal	Leve/Moderada	Ausente	Positivo	0,1	Incluída
CO_28B	Adrenal	Leve/Moderada	Ausente	Positivo	0,01	Excluída
CO_29A	Adrenal	Moderada	Discreta	Positivo	0,01	Incluída
CO_30A	Adrenal	Necrose (50%)	Ausente	Rara	> 0,01%	Incluída
CO_30B	Adrenal	Necrose (50%)	Ausente	Rara	> 0,1%	Incluída
CO_31A	Adrenal	*	*	*	*	Incluída
CO_31B	Adrenal	*	*	*	*	Incluída
CO_34	Adrenal	*	*	*	*	Incluída

*amostra insuficiente para análise

** amostra não proveniente de glândula adrenal

A análise histológica permitiu identificar o tecido e as possíveis áreas compostas por células neuroendócrinas da medula adrenal, além de determinar o grau de autólise e hemorragia. As avaliações feitas por imunohistoquímica permitiram confirmar a presença de células neuroendócrinas na área delimitada na análise histológica. No total, 26 dos 36 casos analisados foram positivos na imunohistoquímica, sendo que as amostras negativas foram descartadas. Dentre as amostras descartadas (total=10), metade foi proveniente de natimortos.

Em ambas as análises, pôde-se constatar que o grau de autólise foi maior nas amostras de natimortos do que nas amostras pediátricas. Contudo, uma inversão pode ser observada em relação ao grau de hemorragia, onde as amostras pediátricas mostraram um

nível moderado a intenso, enquanto as amostras de natimortos mostraram-se ausentes ou discretas.

4.1.3 Extração de RNA total: Amostras Controle

Em paralelo às análises histológicas e imunohistoquímicas, foram feitas as extrações de RNA total das amostras controle. Apenas 6 amostras foram descartadas inicialmente, pois já se encontravam maceradas no momento da dissecação. Após a extração, a integridade do RNA foi verificada por eletroforese, sendo que 25/48 RNAs mostraram-se íntegros.

No entanto, nem todos os RNAs puderam ser utilizados, dado que algumas dessas amostras não foram provenientes de glândula adrenal e/ou não apresentaram região medular evidente durante a análise de imunohistoquímica. Ao final das análises, apenas 22 amostras controle (45,83%) com RNAs de qualidade, sendo 9 natimortos e 13 pediátricos, provenientes de glândulas adrenais e com presença de região medular foram utilizadas neste estudo.

Dentre as 40 amostras bilaterais totais provenientes de 20 indivíduos, 16 mostraram RNA íntegro em ambas as glândulas coletadas. Contudo, a amostra CO-06 foi descartada após a análise histológica, por não se tratar de glândula adrenal. Em síntese, 14 amostras bilaterais provenientes de 7 indivíduos revelaram-se adequadas aos critérios de inclusão no estudo. As amostras bilaterais provenientes dos indivíduos CO-09 e CO-28 apresentaram o RNA íntegro em apenas uma das glândulas coletadas. O restante das amostras bilaterais apresentou RNA degradado, independente da análise histológica.

Do total de amostras unilaterais (14), 6 apresentaram RNA íntegro e foram incluídas no estudo.

Associações entre a integridade do RNA e as variáveis analisadas (grau de autólise, grau de hemorragia, intervalo *Post mortem*) também foram avaliadas. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose e baseada na presença das bandas do RNA ribossomal, 28S, 18S e 5S. Ao todo 23 amostras pediátricas e 25 natimortos foram avaliados. Houve apenas associação significativa entre degradação de RNA e intervalo *Post mortem* (teste t student, $p=0,045$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Correlação degradação RNA e intervalo *Post mortem*.

RNA	Intervalo Post	Desvio padrão	Intervalo de	Total de
-----	----------------	---------------	--------------	----------

	mortem (média em horas)		confiança 95%	amostras
Íntegro	18,0	9,95	1,37	25
Degradado	24,0	13,10	1,80	21
Total Geral	20,63	-	-	46

O grau de hemorragia e a positividade para sinaptofisina não foram correlacionadas à preservação do RNA. A autólise foi maior nas amostras fetais (n=22) ($p<0,01$, teste Mann-Whitney) e nas amostras com RNA degradado (n=15) ($p<0,01$, teste Mann-Whitney). O RNA íntegro não se correlacionou com a idade dos indivíduos, hemorragia ou imunohistoquímica.

De maneira geral, o RNA íntegro pode ser extraído de glândulas adrenais tanto em autópsias pediátricas, quanto fetais, sendo o intervalo *post mortem* o fator mais relacionado à degradação molecular.

4.2 Amostras Tumorais

Um total de 27 amostras tumorais foram coletadas, sendo que 19 destas apresentaram o RNA íntegro e foram utilizadas neste estudo. Do total de amostras, 16 eram de neuroblastoma, 2 de ganglioneuroblastoma e 1 de sarcoma de Ewing, que foi utilizado como controle tumoral negativo.

Excluindo-se a amostra de sarcoma de Ewing, 12/18 amostras foram de pacientes do sexo masculino (Tabela 8). A mediana das idades para ambos os sexos foi de 28 meses e a média de 64,67 meses ($\sigma=101,49$), sendo a média por sexo de 73,67 ($\sigma=46,25$) e 60,17 ($\sigma=125,12$), para o sexo feminino e masculino, respectivamente.

Quanto ao estadiamento dos tumores, incluindo apenas neuroblastomas e ganglioneuroblastomas, 4 amostras foram de estadio I (22%), 7 estadio III (38,89%) e 7 estadio IV (38,89%). Nenhuma amostra de estadio II foi coletada (Tabela 8). O total de número de óbitos foi 7, sendo 4 pacientes de estadio III e 3 pacientes estadio IV.

Dentre os tratamentos, 77,8% dos pacientes (14/18) fizeram uso quimioterapia como tratamento principal ou auxiliar. Quase a totalidade das amostras foram coletadas antes do início da terapia, sendo que apenas 1 amostra (NN02) foi coletada após tratamento quimioterápico. O tumor do paciente NN03, após tratamento quimioterápico, evoluiu para

ganglioneuroblastoma e finalmente ganglioneuroma, neste último caso, um tumor benigno de fácil remoção.

Tabela 8 - Dados clínicos pacientes com neuroblastoma

Variáveis		Estadio I (n=4)	Estadio III (n=7)	Estadio IV (n=7)
Sexo	Feminino	2 (50%)	2 (28,6%)	2 (28.6%)
	Masculino	2 (50%)	5 (71.4%)	5 (71,4%)
Idade (meses)*		28 (5, 58)	48 (7, 108)	102 (6, 441)
Óbito		0	4 (57,1%)	3 (48.5%)

*são indicados mediana, valor mínimo e máximo, respectivamente

4.3 Detecção da expressão de Retrovírus Endógenos Humanos

4.3.1 Otimização dos iniciadores e One Step in house

Todos os iniciadores foram analisados quanto à temperatura de denaturação (*melting* - T_m), complementaridade entre os pares, formação de *hairpins* e falsos sítios de pareamento em outras regiões do genoma humano. Os produtos resultantes da PCR foram clonados e validados por sequenciamento, comprovando a especificidade dos iniciadores, bem como a variabilidade de *loci* amplificados.

4.3.2 Amplificação das famílias de HERVs

Apesar dos RNAs terem sido extraídos com kit específico para eliminar contaminação por DNA (amostras de Barretos) e com Trizol (demais amostras), todas as amostras foram submetidas ao tratamento com DNase, no intuito de eliminar quaisquer resquícios de DNA genômico. Após cada tratamento foi realizado uma PCR nas amostras para verificar a presença de possíveis DNA contaminantes.

O iniciador selecionado para a PCR, RPL-27, gera bandas de tamanhos distintos na presença de DNA e cDNA. Quando se utiliza DNA genômico na PCR, o resultado apresenta 4 bandas distintas no gel de agarose de 2300 pb, 630 pb, 340 pb e 232 pb. Quando a molécula alvo é o cDNA, apenas uma única banda de 232 pb pode ser visualizada no gel. Isso se deve

ao fato de que o gene RPL-27 codifica uma proteína ribossomal, pertencente à família L27E, que compõe a subunidade 60S do ribossomo. Por tratar-se de um típico gene que codifica para proteínas ribossomais, diversos pseudogenes são encontrados dispersos no genoma humano, resultando em múltiplas bandas na PCR.

Quando verificada amplificação na amostra, a mesma era submetida a um novo tratamento, sendo que em 4 amostras (21,05%), foram realizados dois tratamentos com DNase. Apesar de possíveis perdas de RNA em cada etapa, estes passos foram fundamentais para assegurar que todos os dados obtidos foram provenientes de RNA.

Confirmada a pureza das amostras, as mesmas foram quantificadas em espectrofotômetro. Em seguida, a reação de One Step *in house* foi realizada tanto para o gene de envelope das famílias W, K e H de HERV, quanto para o gene RPL-27 utilizado como controle endógeno, partindo da mesma quantidade inicial de RNA (400 ng). Os resultados das reações foram verificados qualitativamente em gel de agarose 1%, sendo o tamanho dos produtos de 232 pb, 750 pb, 950 pb, 1100 pb para controle endógeno e para as famílias W, H e K, respectivamente.

Todas as amostras tumorais e controle foram positivas para o controle endógeno RPL27 e para as famílias W e H de HERV. No entanto, apenas as amostras controle (10/22) foram positivas para a família K. Este resultado não implica em ausência de expressão desta família, posto que o iniciador utilizado foi específico para a região de envelope de HERV-K (HML-2), podendo haver expressão de outros membros da família K.

4.4 Sequenciamento de Nova Geração

O sequenciamento das amostras positivas foi feito a partir dos amplicons gerados na reação de One Step *in house*. Houve uma perda de aproximadamente 30% na quantidade final das amostras, após a extração e purificação das bandas do gel de agarose. O material foi quantificado em Qubit para início do preparo das bibliotecas. Contudo, devido à perda na purificação dos produtos de PCR, algumas amostras controle não puderam ser utilizadas na fase seguinte.

As bibliotecas preparadas com o kit Nextera XT (Illumina), foram quantificadas por PCR em tempo real com o kit comercial KAPA (KAPA Biosystems). Para cada amostra, a qualidade e a média do tamanho dos fragmentos das bibliotecas foram analisadas e

calculadas através do software 2100 Expert Software (Agilent Technologies, California, EUA). Foram obtidos fragmentos com média de 500, 400 e 800 pb para HERV-H, HERV-W e HERV-K, respectivamente, como ilustrado na Figura 11.

Figura 11 - Média de fragmentação das bibliotecas das amostras tumorais NN06, NN07 e NN08 para as famílias H, W e K

O eixo Y (FU) representa a intensidade de fluorescência e o eixo X o tamanho dos fragmentos (bp) gerados durante o preparo das bibliotecas. Os picos em ambas as extremidades são os marcadores moleculares padrão utilizados para calcular os dados.

Os valores médios dos fragmentos de cada biblioteca foram utilizados para normalizar a primeira quantificação feita por PCR em tempo real. A normalização foi feita como descrito na Tabela 9:

Tabela 9 - Etapas para normalização das bibliotecas

Amostra	Concentração calculada em pM pelo instrumento (triplicatas)	Média da concentração (pM)	Concentração ajustada por tamanho (pM)	Concentração da biblioteca não diluída (estoque)
---------	---	----------------------------	--	--

Biblioteca 1:1000	A1	A2	A3	A	A x	452	= W	W x 1000
Média do comprimento do fragmento								

Como as amostras foram coletadas ao longo do desenvolvimento do trabalho, o preparo das bibliotecas foi feito parcialmente de acordo com o número de amostras coletadas. As amostras foram sequenciadas em diferentes *flow cells*, MiSeq Reagent v2 (300 cycles), MiSeq Reagent v2 (500 cycles) e MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles), resultando em uma variabilidade no tamanho máximo dos *reads* de 150 pb, 250 pb e 300 pb, respectivamente. As amostras sequenciadas em cada *flow cell* estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10 - Lista das diferentes *flow cells* utilizadas para sequenciamento

Flow Cell	Amostras Sequenciadas
MiSeq Reagent v2 (300 cycle)	WCO-01A, WCCN-RNA, WNN04
MiSeq Reagent v2 (500 cycle)	HCO-01A, HCO-01B, HNN03, HNN04, HNN05, KCO-01A, KCO_03, WCO-01A, WCO-01B, WNN03, WNN04, WNN05
MiSeq Reagent v2 (500 cycle)	KCO-34, HCO-34, WCO-34

MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle)

HNN06, HNN07, HNN08, HNN09, HNN10, HNN11, HNN12,
HNN13, HNN14, HNN15, HNN16, HNN17, HNN18

MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle)

HCCN-DNA, HCO-03, HCO-04, HCO-05, HCO-09A, HCO-13A,
HCO-13B, HCO-19A, HCO-19B, HCO-21A, HCO-21B, HCO-23,
HCO-27A, HCO-27B, HCO-28, HCO-29, HCO-30A, HCO-30B,
HCO-31A, HCO-31B, HNN13, HN19, KCCN-DNA, KCO-03, KCO-
04, KCO-05, KCO-09A, KCO-13A, KCO-13B, KCO-19A, KCO-19B,
KCO-23, KCO-27A, WCCN-DNA, WCO-03, WCO-04, WCO-05,
WCO-09A, WCO-13B, WCO-19A, WCO-19B, WCO-21B, WCO-
27B, WCO-28, WNN06, WNN07, WNN08, WNN09, WNN10,
WNN11, WNN12, WNN13, WNN14, WNN15, WNN16, WNN17,
WNN18, WNN19

HCO: amostras controle amplificadas para HERV-H. WCO: amostras controle amplificadas para HERV-W. KCO: amostras controle amplificadas para HERV-K. HNN: amostra tumoral amplificada para HERV-H. WNN: amostra tumoral amplificada para HERV-W. HCCN-DNA: DNA da linhagem celular SH-SY5Y amplificado para HERV-H. WCCN-DNA: DNA da linhagem celular SH-SY5Y amplificado para HERV-W. KCCN-DNA: DNA da linhagem celular SH-SY5Y amplificado para HERV-K. HCCN-RNA: cDNA da linhagem celular SH-SY5Y amplificado para HERV-H. WCCN-RNA: cDNA da linhagem celular SH-SY5Y amplificado para HERV-W.

4.5 Montagem das sequências e análises

Como as amostras foram sequenciadas em diferentes *flow cells* e, estas possuem diferentes capacidades, o número total de *reads* gerados variou de poucos milhares a quase 1 milhão por amostra (Gráficos 1 – 5).

Gráfico 1 - Total de *reads* de HERV-W sequenciados por amostra tumoral. **Gráfico 2** - Total de *reads* de HERV-H sequenciados por amostra tumoral.

Gráfico 3 - Total de *reads* de HERV-W secuenciados por amostra controle. **Gráfico 4** - Total de *reads* secuenciados de HERV-H por amostra controle

Gráfico 5 - Total de *reads* de HERV-K sequenciados por amostra controle

As sequências referências utilizadas para montar os *reads* sequenciados, foram obtidas em duas etapas: PCR *in silico* e montagem *de novo*. A partir dos pares de iniciadores desenhados para este estudo, foi realizada uma PCR *in silico* no site <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>, sendo o genoma humano hg19 utilizado como molde. Os resultados desta PCR virtual mostram a localização exata de todas as regiões do genoma humano possivelmente amplificadas pelos iniciadores utilizados. No total, 31 *loci* de HERV-H, 11 *loci* de HERV-W e 2 *loci* de HERV-K foram identificados. Com isso, através da ferramenta BLAT e BLAST, novas buscas por sequências similares foram efetuadas utilizando as sequências obtidas destes *loci* como “iscas”. Apenas sequências que apresentaram identidade entre 95 – 100% foram adicionadas ao banco de referências de HERV.

Sabemos que *mismatches* podem ocorrer entre regiões de ancoragem de iniciadores e seus respectivos oligos. Mesmo assim, estas regiões podem ser amplificadas, embora com menor eficiência. Posto que *mismatches* não são identificados na PCR *in silico* e as buscas por Blast são limitadas aos hits de acordo com o grau de identidade entre a *query* e os achados, esperava-se que parte dos *amplicons* fossem provenientes de provírus que não foram incluídos no banco de dados de referência. Portanto, na segunda etapa, os *reads* das amostras de DNA e RNA da linhagem celular SH-SY5Y foram montados *de novo* através do software Geneious com estringência de 99%. Em seguida, todos os *contigs* gerados foram contrastados com o banco de dados BLAST para identificação da sequência obtida. Um

tamanho mínimo dos contigs foi estabelecido como *cut-off* durante a busca, sendo estes 400 pb de HERV-W, 500 pb de HERV-H e 600 pb de HERV-K. Todos os *contigs* pertencentes à HERV foram contrastados com o banco de dados UCSC, sendo os resultados selecionados de acordo com o número mínimo e máximo de nucleotídeos correspondentes entre a sequência alvo e a sequência referência do banco de dados e com a identidade mínima e máxima (Tabela 11).

Tabela 11 - Critérios para seleção de sequências referência obtidas do banco de dados UCSC

Família	Score	Identidade
HERV-H	500 – 1100	78,5% – 100%
HERV-W	350 – 900	88,9 – 100%
HERV-K	500 – 1500	89,7% – 100%

Por fim, foram identificados 91, 36 e 338 *loci* de HERV-H, HERV-W e HERV-K, respectivamente, capazes de serem amplificados com os iniciadores desenhados e utilizados como referência para a montagem dos *reads*. Através dos softwares CLC e Geneious todas as amostras sequenciadas foram avaliadas quanto à qualidade (Q30), tamanho dos fragmentos sequenciados, presença de sequências ambíguas e adaptadores. Regiões 5' e/ou 3' contendo ambiguidade ou adaptadores, baixa qualidade (Q<30) e tamanho menor do que 40 pb foram removidas. Em seguida, a montagem dos *reads* foi efetuada com as sequências referência de cada família de HERV, com uma estringência de 99%. O total de *reads* montados com as sequências referência de cada amostra está descrito nas tabelas 12 – 14.

Tabela 12 - Percentagem do total de *reads* de HERV-H montados com as sequências de referência

Amostra	<i>Assembled</i>	<i>Unassembled</i>
CCN_RNA	82,10	11,94
CO01A	80,97	12,69
CO01B	82,19	11,87
CO03	92,44	5,04
CO04	88,38	7,75
CO05	83,12	11,25
CO09A	83,34	11,11
CO13A	86,89	8,74
CO13B	85,07	9,95
CO19A	88,13	7,91
CO19B	84,73	10,18
CO21A	80,20	13,20
CO21B	88,39	7,74
CO23	84,28	10,48
CO27A	90,18	6,54
CO27B	79,45	13,70
CO28	79,20	13,87
CO29	76,94	15,37
CO30A	72,65	18,23
CO30B	75,52	16,32
CO31A	76,06	15,96
CO31B	70,96	19,36
CO34	86,21	9,19
NN01	75,97	16,02
NN02	76,43	15,71
NN03	80,43	13,05
NN04	78,33	14,45
NN05	83,62	10,92
NN06	89,88	6,75
NN07	88,74	7,51
NN08	89,57	6,95
NN09	91,64	5,57
NN10	90,65	6,23
NN11	90,44	6,37
NN12	86,96	8,69
NN13	91,52	5,66
NN14	91,18	5,88
NN15	91,14	5,91
NN16	90,89	6,07
NN17	89,08	7,28
NN18	91,02	5,99
NN19	85,84	9,44

Tabela 13 - Percentagem do total de *reads* de HERV-W montados com as sequências de referência

Amostras	Assembled	Unassembled
CCN_RNA	84,00	10,67
CO01A	84,12	10,59
CO01B	87,73	8,18
CO03	94,59	3,61
CO04	46,17	35,88
CO05	95,45	3,03
CO09A	69,31	20,46
CO13A	93,05	4,63
CO13B	69,05	20,63
CO19A	94,70	3,53
CO19B	94,89	3,41
CO21B	78,97	14,02
CO27B	82,10	11,93
CO28	79,67	13,55
CO34	87,90	8,06
NN01	77,03	15,31
NN02	79,65	13,57
NN03	78,05	14,63
NN04	80,77	12,82
NN05	86,28	9,15
NN06	94,37	3,75
NN07	94,63	3,58
NN08	94,43	3,72
NN09	91,04	5,97
NN10	95,59	2,94
NN11	94,17	3,88
NN12	95,15	3,23
NN13	95,59	2,94
NN14	95,27	3,15
NN15	96,02	2,66
NN16	95,70	2,87
NN17	94,73	3,51
NN18	94,93	3,38
NN19	77,29	15,14

Tabela 14 - Percentagem do total de *reads* de HERV-K montados com as sequências de referência

Amostras	Assembled	Unassembled
CO01A	52,32	47,68
CO04	34,14	65,86
CO05	43,04	56,96
CO09A	63,90	36,10
CO13A	63,94	36,06
CO13B	73,77	26,23
CO19A	64,27	35,73
CO19B	67,76	32,24
CO23	92,07	7,93
CO27A	64,25	35,75

Os *unassembled reads* das famílias H e W foram montados *de novo* com uma estringência de 95% e todos os *contigs* gerados contrastados com o banco de dados do NCBI, através da ferramenta BLAST. Destes, foram identificados alguns contaminantes como *Escherichia coli* (~5 – 10% dos *reads*) e *Saccharomyces cerevisiae* (1 – 5% dos *reads*), sendo os demais *contigs* correspondentes a HERV. Os *contigs* de HERV foram contrastados com o banco de dados UCSC para determinação de seu locus de origem e identificação de possíveis novos *loci* não incluídos no banco de dados de referência. Os *contigs* foram mapeados apenas aos mesmos *loci* de referência utilizados, porém com uma identidade inferior a 75%, sendo que nenhum novo *locus* foi identificado. A variabilidade encontrada, pode resultar tanto de erro de sequenciamento (SCHIRMER et al., 2015), quanto de formação de quimeras durante a etapa de PCR (BRADLEY; HILLIS, 1997; MEYERHANS; VARTANIAN; WAIN-HOBSON, 1990; SMYTH et al., 2010). Portanto, resolvemos limitar nossas análises apenas aos *reads* que apresentaram 99% de identidade à referência.

O *unassembled reads* da família K também foram montados *de novo* com uma estringência de 95%, assim como foi feito para a família W e H. Também foram identificados contaminantes como *Escherichia coli* (~5 – 10% dos *reads*) e *Saccharomyces cerevisiae* (1 – 5% dos *reads*). No entanto, os demais *contigs* foram provenientes de diversas origens como HERV-L, *Long Interspersed Element* (LINE) e pseudogene *EEF1A1P5*. Este resultado mostrou uma inespecificidade dos iniciadores utilizados para esta família, o que resultou na variação do número total de *reads* mapeados as referências de HERV-K por amostra.

No total, 85 das 91 referências de HERV-H, 32 das 36 de HERV-W e 308 das 338 de HERV-K tiveram ao menos 1 *read* mapeado nestas referências.

4.6 Normalização dos dados obtidos por sequenciamento

Todas as amostras utilizadas no sequenciamento foram previamente normalizadas. A mesma concentração de ácidos nucleicos foi utilizada nas reações de transcrição reversa, PCRs e de preparo de bibliotecas para todas as amostras.

Por outro lado, a diferença entre a capacidade de cada *flow cell*, os kits de preparo de bibliotecas e a eficiência de sequenciamento resultaram em uma variação acentuada no número total de *reads* por amostra. Com isso, todos os dados foram normalizados por frequência relativa. Para tal, foi realizada a seguinte operação:

$$Fr_{chr Z} = \frac{\text{total de } reads \text{ montados no chr Z}}{\text{total bruto de } reads}$$

Onde: Fr = frequência relativa de *reads*

chr Z = cromossomo analisado.

Esta normalização permitiu uma real comparação entre os resultados, como exemplificado na Tabela 15, onde duas amostras com números brutos de *reads* bastante discrepantes, após a normalização apresentaram uma frequência de *reads* similar para o cromossomo 5q21.3.

Tabela 15 - Dados de sequenciamento brutos e normalizados.

Amostra	Nº de <i>reads</i> <i>locus</i> 5q21.3	Nº total de <i>reads</i> gerados	Frequência de <i>reads</i>
H_NN03	1054	148296	0,71
H_NN08	7831	1144752	0,68

4.7 Teste de viés dos iniciadores de HERV

O produto da PCR de DNA da linhagem celular SH-SY5Y também foi sequenciado pela plataforma Illumina objetivando verificar o viés dos iniciadores de HERV. Os produtos de HERV-H sequenciados (Gráfico 6) e de HERV-K (Gráfico 8) mostraram um perfil semelhante e com um menor viés dos iniciadores, quando comparados ao HERV-W (Gráfico 7). Os pares de iniciadores HE1, WE8 e HKuniv foram capazes de amplificar 86, 277 e 32 dos *loci* utilizados como referência neste estudo.

Gráfico 6 - Análise de viés do par de iniciadores HE1

Mapeamento dos reads de HERV-H obtidos por sequenciamento na plataforma Illumina. Os produtos de PCR utilizados para a construção da biblioteca foram obtidos a partir do DNA da linhagem celular SH-SY5Y.

Gráfico 7 - Análise de viés do par de iniciadores WE8

Mapeamento dos reads de HERV-W obtidos por sequenciamento na plataforma Illumina. Os produtos de PCR utilizados para a construção da biblioteca foram obtidos a partir do DNA da linhagem celular SH-SY5Y.

Gráfico 8 - Análise de viés do par de iniciadores HK_universal

Mapeamento dos reads de HERV-H obtidos por sequenciamento na plataforma Illumina. Os produtos de PCR utilizados para a construção da biblioteca foram obtidos a partir do DNA da linhagem celular SH-SY5Y.

Analisando o perfil exposto nos gráficos, a possibilidade de viés dos iniciadores foi considerada. No entanto, os *loci* com menores chances de amplificação como 9q31.3 de HERV-W e 1p21.1 de HERV-H, foram detectados em uma frequência relativa alta nas amostras tumorais. De maneira oposta, *loci* com maiores chances de amplificação como 1p34.2 de HERV-W e 10p12.1 de HERV-H foram detectados em uma frequência relativa baixa. Estes resultados sugerem que apesar do pequeno viés, os iniciadores utilizados foram capazes de amplificar regiões distintas de maneira eficaz.

Por outro lado, a inespecificidade do par de iniciadores HK_univ revelada durante o mapeamento dos *reads*, bem como a ausência de expressão desta família nos tumores, impediu uma análise fidedigna do viés destes iniciadores. No entanto, todas as limitações relacionadas à família K foram consideradas nas análises posteriores.

4.8 Análise de expressão das amostras controle

Antes de iniciar as comparações entre amostras tumorais e controle, uma análise descritiva sobre os *loci* expressos de HERV-H, HERV-W e HERV-K das amostras controle foi feita. A princípio, as amostras bilaterais foram comparadas entre si quanto ao nível de expressão das famílias H, W e K (Anexo E, F e G). Todos os *loci* de HERV-W e a maioria de HERV-H apresentaram a mesma frequência de transcritos. Apenas as amostras bilaterais CO30 e CO31 apresentaram uma discrepância entre o nível de expressão de HERV-H por *loci* (Anexo E). Ambas amostras são provenientes de pacientes pediátricos do sexo feminino com idade de 9 e 12 meses, respectivamente, sendo broncopneumonia bilateral diagnosticada como a causa do óbito. Apesar das análises, nenhuma das informações obtidas permitiu determinar a causa da diferença nos níveis de expressão encontrados. Todavia, ambas as amostras permaneceram no estudo e foram utilizadas na comparação com as amostras tumorais. A frequência relativa dos transcritos da família K das amostras CO13 e CO19 teve uma variabilidade alta entre as amostras bilaterais. A amostra CO13 é proveniente de um paciente pediátrico do sexo masculino com idade 12 meses, sendo edema cerebral diagnosticado como causa da morte. A amostra CO19 é proveniente de natimorto do sexo masculino, cujo tempo de gestação foi de 37 semanas e anóxia intrauterina diagnosticada como causa do óbito. Assim como as amostras CO30 e CO31 de HERV-H, a causa da variabilidade encontrada para as amostras bilaterais da família K não pode ser determinada apenas com as informações obtidas e análises efetuadas.

Em uma segunda análise, o grupo controle das famílias H, W e K foi subdividido em dois subgrupos, sendo o primeiro composto por amostras provenientes de natimortos e o segundo por amostras pediátricas.

Do total de amostras controle de HERV-H sequenciadas (22), nove eram provenientes de natimortos e treze de crianças. Os testes de normalidade Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov foram utilizados para determinar o formato da distribuição dos dados dos dois grupos. Ambos os testes rejeitaram a hipótese nula de distribuição normal dos dados. A partir deste resultado, a primeira comparação entre os grupos foi feita baseada na mediana da frequência relativa de cada *locus* (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Comparação de expressão HERV-H entre casos de natimortos e pediátricos

Mediana da frequência relativa de transcritos de HERV-H por *locus*. Linha vermelha amostras controle pediátricas. Linha preta amostras controle natimortos.

Por se tratar de variáveis aleatórias não-paramétricas independentes, a comparação entre o nível de expressão de HERV *loci*-específico foi feita através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon (U). Este teste permitiu comparar a expressão de HERV nos grupos natimorto e pediátrico, onde a hipótese alternativa buscou evidências de que os valores do grupo natimorto fossem diferentes dos valores do grupo pediátrico. Após a ordenação e determinação da mediana, os valores de U calculados pelo teste avaliaram o grau de entrelaçamento dos dados dos dois grupos. Quanto maior a distância entre os dados, maior é o suporte para rejeitar a hipótese nula (de igualdade das medianas) e indicar que as amostras são distintas.

Dentre os 85 loci avaliados, apenas os *loci* 6p21.32 (chr6:33317004-33317907), 12p13.31 (chr12:9987836-9988759), 18q12.2 (chr18:32800314-32801243) e 19p12 (chr19:20199836-20200742) apresentaram uma diferença significativa ($p < 0,05$) (Gráfico 10).

Gráfico 10 - *Loci* diferencialmente expressos de HERV-H entre os grupos controle natimorto e pediátrico ($p < 0,05$)

O grupo controle de HERV-H foi subdividido entre natimortos ($n=9$) e pediátrico ($n=13$). A comparação entre os níveis de expressão foi feita através do teste de Mann-Whitney, sendo que apenas estão representados os *loci* cujo $p\text{-value} < 0,05$. A) *Locus* 6p21.32 (chr6:33317004-33317907). B) *Locus* 12p13.31 (chr12:9987836-9988759), C) *Locus* 18q12.2 (chr18:32800314-32801243). D) *Locus* 19p12 (chr19:20199836-20200742).

As mesmas análises e testes foram feitas para os transcritos de HERV-W sequenciados. Do total de 14 amostras sequenciadas, metade era proveniente de natimortos e a outra metade de crianças. Os testes de normalidade também rejeitaram a hipótese nula e os dados foram comparados a partir da mediana dos grupos (Gráfico 11):

Gráfico 11 - Comparação de expressão de HERV-W entre casos de natimortos e pediátricos

Mediana da frequência relativa de transcritos de HERV-H por *locus*. Linha vermelha amostras controle pediátricas. Linha preta amostras controle natimortos.

Dentre os 32 *loci* avaliados, apenas o *locus* 4q31.1 (chr4:139543936-139544723) apresentou uma diferença significativa entre os grupos (Gráfico 12).

Gráfico 12 - *Locus* diferencialmente expressos de HERV-W entre os grupos controle natimorto e pediátrico ($p < 0,05$)

O grupo controle de HERV-W foi subdividido entre natimortos ($n=7$) e pediátrico ($n=7$). A comparação entre os níveis de expressão foi feita através do teste de Mann-Whitney, sendo que apenas estão representados os *locus* 4q31.1 (chr4:139543936-139544723), cujo $p\text{-value} < 0,05$.

Para os transcritos de HERV-K, foram sequenciadas 10 amostras, sendo cinco de natimortos e cinco de casos pediátricos. Como apenas as amostras controle foram positivas para a família K, foi realizado inicialmente uma análise para avaliar o padrão de expressão entre estas amostras. Através da representação da expressão por mosaico colorido

(*heatmap*), onde cada coluna representa uma amostra e cada linha um *locus*, pode-se notar a ausência de expressão em quase a totalidade de algumas amostras (Figura 12), dado a prevalência da coloração vermelha, que indica menor ou ausência de expressão.

Figura 12 - Análise de *heatmap* da expressão de retrovírus endógenos humanos família K

Nesta análise, a escala de cores indica os diferentes níveis de expressão, onde vermelho indica ausência ou baixa expressão, preta expressão intermediária e verde alta expressão. Ao lado direito estão numerados os 308 *loci* avaliados e abaixo estão nomeadas as amostras controle. Amostras controle natimortos: NM_CO01A, NM_CO04, NM_CO19A, NM_CO19B e NM_CO23. Amostras controle pediátricas: PED_CO05, PED_CO09A, PED_CO13A, PED_CO13B e PED_CO27A.

A partir dos resultados obtidos pela análise de heatmap, os *loci* que apresentaram uma frequência relativa inferior a 0,001 foram excluídos das análises posteriores.

Dentre os 308 *loci* identificados, apenas 212 foram selecionados para análise de comparação de expressão entre os grupos natimorto e pediátrico da família K. A comparação de medianas revelou uma alta variabilidade na frequência relativa dos *reads* (Gráfico 13).

Gráfico 13 - Comparação de expressão de HERV-K entre casos de natimortos e pediátricos

Mediana da frequência relativa de transcritos de HERV-K por *locus*. Linha vermelha amostras controle pediátricas. Linha preta amostras controle natimortos.

Devido a variabilidade encontrada e a inespecificidade do par de iniciadores de HERV-K, nenhum teste estatístico foi aplicado, pois quaisquer diferenças encontradas entre os grupos, poderia ser resultante apenas da deficiência do par de iniciadores e não de uma real diferença na expressão.

4.9 Análise de expressão entre as amostras tumorais

A heterogeneidade do grupo tumoral permitiu a subdivisão inicial deste em 6 subgrupos: tumor de Ewing (1), Ganglioneuroblastoma estadio I (1), Ganglioneuroblastoma estadio III (1), Neuroblastoma estadio I (3), Neuroblastoma estadio III (6), Neuroblastoma estadio IV (7). Apesar de não se tratar de neuroblastoma, o tumor de Ewing, inicialmente diagnosticado como neuroblastoma, também foi incluído nesta análise no intuito de

fornecer mais um parâmetro de comparação. Devido ao número reduzido de amostras nos grupos, nenhum teste estatístico pode ser aplicado, sendo apenas realizada uma análise descritiva. A mediana da frequência relativa dos grupos contendo mais de duas amostras foram utilizadas como medida de comparação. A frequência relativa da maioria dos *loci* das amostras de ganglioneuroblastoma e neuroblastoma apresentaram-se muito semelhantes tanto nas análises de HERV-H (Gráfico 10), quanto nas de HERV-W (Gráfico 11).

Gráfico 14 - Comparação de expressão de HERV-H entre as amostras tumorais

Nível de expressão de HERV-H entre as amostras tumorais. Linha vermelha: Tumor de Ewing. Linhas azuis: Ganglioneuroblastoma. Linha verde escuro: Neuroblastoma estadio I. Linha verde-lima: Neuroblastoma estadio III. Linha verde clara: Neuroblastoma estadio IV.

Gráfico 15 - Comparação de expressão de HERV-W entre as amostras tumorais

Nível de expressão de HERV-W entre as amostras tumorais. Linha vermelha: Tumor de Ewing. Linhas azuis: Ganglioneuroblastoma. Linha verde escura: Neuroblastoma estadio I. Linha verde-lima: Neuroblastoma estadio III. Linha verde clara: Neuroblastoma estadio IV.

De maneira geral, o tumor de Ewing apresentou um perfil de expressão muito semelhante aos demais tumores. No entanto, algumas peculiaridades como o aumento na frequência dos transcritos dos *loci* 1q41 (chr1:216323754-216324661) e 19p12 (chr19:20199836-20200742) de HERV-H e 1p34.2 (chr1:42414600-42415467) de HERV-W, foram identificadas.

Para a segunda análise, as amostras tumorais foram divididas em 3 grupos, sendo o primeiro composto pelas amostras de ganglioneuroblastoma e neuroblastoma estadio I, o segundo pelas amostras de neuroblastoma estadio III e o último pelas amostras de neuroblastoma estadio IV. O agrupamento das amostras de gânglio e neuroblastoma para a composição do grupo I foi baseado em algumas das características comuns entre estes tumores. Ademais, este se fez necessário para que fosse possível obter um número mínimo de amostras por grupo para a realização do teste estatístico. Assim como foi feito para as amostras controle, foram aplicados os testes de normalidade Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov para determinar o formato da distribuição dos dados dos dois grupos. O resultado deste teste variou de *locus* para *locus*, sendo que alguns grupos rejeitaram a hipótese nula e outros não. Portanto, dois testes estatísticos foram utilizados na etapa seguinte, teste de análise de variância (ANOVA) e teste de Kruskal-Wallis, de acordo com a distribuição dos dados para cada *locus*.

Dentre os 85 *loci* de HERV-H analisados, apenas o *locus* 7p14.3 (chr7:29829908-29831032) e 14q24.2 (chr14:70760399-70762395) mostraram-se diferencialmente expressos (Gráfico 16).

Gráfico 16 - *Loci* diferencialmente expressos de HERV-H entre os grupos tumorais ($p < 0,05$)

O grupo tumoral de HERV-H foi subdividido 3 grupos: Ganglio/Neuro I (n=5), Neuro III (n=6) e Neuro IV (n=7). A) *Locus* 7p14.3 (chr7:29829908-29831032): todos os grupos foram diferencialmente expressos entre si. B) *Locus* 14q24.2 (chr14:70760399-70762395): apenas o grupo Neuro III foi diferencialmente expresso quando comparado ao grupo IV. A comparação entre os níveis de expressão para ambos os *loci* foi feita através do teste de *One-way* ANOVA, sendo que apenas estão representados os *loci* cujo *p-value* < 0,05.

Dentre os 32 *loci* de HERV-W analisados, apenas os *loci* 7q21.2 (chr7:92098255-92099046) e Xq27.1 (chrX:139161594-139162410) mostraram-se diferencialmente expressos entre o grupo de tumores (Gráfico 17).

Gráfico 17 - *Locus* diferencialmente expresso de HERV-W entre os grupos tumorais ($n < 0.05$)

O grupo tumoral de HERV-W foi subdividido 3 grupos: Ganglio/Neuro I ($n=5$), Neuro III ($n=6$) e Neuro IV ($n=7$). A) *Locus* 7q21.2 (chr7:92098255-92099046): todos os grupos foram diferencialmente expressos entre si. B) *Locus* Xq27.1 (chrX:139161594-139162410): o grupo Ganglio/Neuro I foi diferencialmente expresso quando comparado ao grupo Neuro III e quando comparado ao grupo Neuro IV. As comparações entre os níveis de expressão foram feitas através do teste de *One-way* ANOVA, onde $p\text{-value} < 0,05$.

4.10 Análise de expressão entre amostras tumorais e controle

4.10.1 Análise de Heatmap

Análises de *heatmap* foram realizadas visando de identificar possíveis padrões de alterações dos *loci* de HERV-H e HERV-W expressos. Através da representação da expressão por mosaico colorido (*heatmap*), onde cada coluna representa uma amostra e cada linha um *locus*, não foi possível identificar alterações, fato que pode ser observado pela ausência de prevalência das cores verde, que indica maior a expressão e/ou cor vermelha, que indica menor entre as amostras. Os mapas formados se encontram nas figuras 13 e 14.

Figura 13 - Análise de *heatmap* da expressão de retrovírus endógenos humanos família H.

Nesta análise, a escala de cores indica os diferentes níveis de expressão, onde vermelho indica baixa expressão, preta expressão intermediária e verde alta expressão. Ao lado direito da figura estão nomeados os *loci* e abaixo as amostras controle e tumoral. Amostras controle natimortos: NM_CO01A, NM_CO01B, NM_CO03,

NM_CO04, NM_CO19A, NM_CO19B, NM_CO21A, NM_CO21B e NM_CO23. Amostras controle pediátricas: PED_CO05, PED_CO09A, PED_CO13A, PED_CO13B, PED_CO27A, PED_CO27B, PED_CO28, PED_CO29, PED_CO31A e PED_CO34. Amostra tumoral cultura celular: CCN_RNA. Amostra tumoral ganglioneuroblastoma estadios I: G1_NN15. Amostra tumoral ganglioneuroblastoma estadios II: G2_NN08. Amostra tumoral neuroblastoma estadios I: N1_NN05, N1_NN16 e N1_NN18. Amostra tumoral neuroblastoma estadios III: N3_NN02, N3_NN06, N3_NN07, N3_NN12, N3_NN13 e N3_NN19. Amostra tumoral neuroblastoma estadios IV: N4_NN01, N4_NN03, N4_NN04, N4_NN10, N4_NN11, N4_NN14 e N4_NN17.

Figura 14 - Análise de *heatmap* da expressão de retrovírus endógenos humanos família W

Nesta análise, a escala de cores indica os diferentes níveis de expressão, onde vermelho indica baixa expressão, preta expressão intermediária e verde alta expressão. Ao lado direito da coluna estão nomeados os *loci* e abaixo as amostras controle e tumoral. Amostras controle natimortos: NM_CO01A, NM_CO01B, NM_CO03, NM_CO04, NM_CO19A, NM_CO19B e NM_CO21B. Amostras controle pediátricas: PED_CO05, PED_CO09A, PED_CO13A, PED_CO13B, PED_CO27B, PED_CO28 e PED_CO34. Amostra tumoral cultura celular: CCN_RNA. Amostra tumoral ganglioneuroblastoma estadios I: G1_NN15. Amostra tumoral ganglioneuroblastoma estadios II: G2_NN08. Amostra tumoral neuroblastoma estadios I: N1_NN05, N1_NN16 e N1_NN18. Amostra tumoral

neuroblastoma estadio III: N3_NN02, N3_NN06, N3_NN07, N3_NN12, N3_NN13 e N3_NN19. Amostra tumoral neuroblastoma estadio IV: N4_NN01, N4_NN03, N4_NN04, N4_NN10, N4_NN11, N4_NN14 e N4_NN17.

4.10.2 Análise estatística

As amostras foram divididas em dois grupos, controle e tumoral, e submetidas ao teste de aderência à distribuição normal Shapiro-Wilk. Os *loci* 6p21.32, 7p14.3, 12p13.31, 14q24.2, 18q21.1 e 19p12, de HERV-H e 4q31.1 e 7q21.2 de HERV-W foram divididos em mais de dois grupos, posto que apresentaram diferenças de expressão entre o grupo de natimortos e pediátricos ou entre os grupos tumorais. Todos os testes rejeitaram a hipótese nula de distribuição normal dos dados. Por se tratar de variáveis aleatórias não-paramétricas independentes, a comparação entre o nível de expressão de HERV *loci*-específico entre o grupo controle e tumoral foi feita através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon (U). Os *loci* que foram subdivididos em mais de dois grupos foram comparados através do teste de Kruskal-Wallis, sendo que apenas o locus 7p14.3 de HERV-H não apresentou diferença estatística entre os grupos. No total 43 *loci* de HERV-H e 14 *loci* de HERV-W apresentaram diferenças de expressão estatisticamente significativas (Anexo E).

4.10.3 Análise de expressão de HERV-H

Dentre os 85 *loci* estudados, 43 apresentaram uma diferença de expressão significativa ($p < 0,05$) entre os grupos (Tabela 16). Ademais, uma busca *in silico* por LTRs e genes provirais gag e pol foi feita nos entornos dos *loci* diferencialmente expressos. Para tal, utilizou-se as ferramentas *online* BLAT (BLAST-like alignment tool, UCSC Genome Browser, California, EUA) e Repeat Masker 4.0 (RepeatMasker Home Page, Washigton, EUA) (Tabela 17).

Tabela 16 - Loci de HERV-H diferencialmente expressos.

<i>Locus</i>	<i>p-value</i>	5'LTR	3'LTR	Nível de expressão no tumor	Genoma Provírus
1p21.2	0,0004*	LTR7C	LTR7C	Aumento	env
1p36.32	0,0025*	-	LTR7A	Aumento	env
1p31.1	0,0002*	LTR7B	LTR7B	Aumento	env
2q32.1	<0,0001*	LTR7	LTR7	Aumento	env
2p22.3	0,0077*	LTR7	LTR7	Aumento	env
2p16.1	0,0189*	L1PA5	LTR7	Aumento	env
2p11.2	0,0028*	LTR2B	LTR7C	Aumento	gag-pol-env
2p11.2	0,0097*	LTR7C	LTR2B	Aumento	gag-pol-env
3q23	<0,0001*	LTR7	LTR7	Aumento	gag-pol-env
3q24	0,003*	LTR7	LTR7	Aumento	gag-pol-env
3q23	0,0149*	LTR7B	LTR7B	Aumento	gag-pol-env
3q26.31	0,002*	LTR7	LTR7	Aumento	gag-pol-env
3q26.32	0,0255*	LTR7	LTR7	Aumento	gag-pol-env
3p24.3	0,0008*	LTR7B	LTR7B	Aumento	gag-pol-env
3p14.3	0,0236*	-	LTR7B	Aumento	gag-pol-env
4q34.2	0,0117*	LTR7	LTR7	Aumento	gag-pol-env
5q21.3	<0,0001*	LTR7	LTR7	Aumento	gag-pol-env
6q24.1	0,0002*	LTR7	LTR7	Aumento	gag-pol-env
6p21.32	0,0023**	AluSX1	LTR7B	Aumento	gag-pol-env
6p21.1	0,0237*	LTR7	LTR7	Aumento	gag-pol-env
6p12.1	0,0005*	-	LTR7	Aumento	pol-env/gag-env
6q11.1-q11.2	0,0054*	LTR7	LTR7	Aumento	env
7q22.3	0,0043*	LTR7C	LTR7C	Aumento	gag-pol-env
9q21.13	0,0002*	LTR7	LTR7	Aumento	env
10q25.1	0,0175*	LTR7	LTR7	Aumento	env
10p15.3	0,0204*	LTR7	LTR7	Aumento	env
10p12.1	0,0127*	LTR7	LTR7	Aumento	env
11q13.2	0,0011*	LTR7-L1PA4	LTR7	Diminuição	env
11q14.1	0,0025*	LTR7	LTR7	Aumento	env
12p12.1	0,0083*	LTR7	LTR7	Diminuição	env
12p11.21	<0,0001*	LTR7	LTR7	Aumento	env
12p12.1	0,0091*	LTR7	L1MB7	Aumento	env
12p13.31	0,01111**	LTR7	-	Diminuição	env
14q24.2	0,0041**	LTR7	LTR7	Aumento	gag-pol-env
14q32.12	<0,0001*	LTR7-AluY	LTR7B	Aumento	env
14q24.2	0,0002*	LTR7	LTR7	Aumento	env
18q12.2	0,0005**	LTR7	LTR7	Aumento	gag-pol-env
18q12.3	0,0059*	LTR7B	LTR7B	Aumento	gag-pol-env
19p12	0,0237**	LTR7	LTR7	Diminuição	gag-pol-env
19p13.2	0,0003*	-	-	Aumento	env
19p13.2	0,0015*	AluY	LTR12C(ERV1)-LTR7C	Aumento	gag-pol-env
Xp21.3	0,0091*	LTR7C	LTR7C	Aumento	env
Xq11.2	0,0059*	-	LTR7	Aumento	env

*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney ($p < 0.05$)

** Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis

As amostras dos *loci* 6p21.32, 12p13.31, 18q12.2 e 19p12 foram divididas em 3 grupos: Natimorto, Pediátrico e Tumor. As amostras do *locus* 14q24.2 foi dividida em 4 grupos: Controle, Ganglio/Neuro I, Neuro III e Neuro IV. Todos estes *loci* apresentaram uma diferença significativa entre pelo menos dois desses grupos (Gráfico 18).

Gráfico 18 - *Loci* diferencialmente expressos da família H

Os *loci* 6p21.32 (A), 12p13.31 (B), 18q12.2 (C) e 19p12 (D) foram divididos em três grupos: Natimorto, Pediátrico e Tumor. O grupo pediátrico foi diferencialmente expresso quando comparado aos demais, tanto

para o *locus* 6p21.32, quanto para 18q12.1. O grupo natimorto foi diferencialmente expresso quando comparado aos demais, tanto para o *locus* 12p13.31, quanto para 19p12. O *locus* 14q24.2 foi dividido em 4 grupos: Controle, Ganglio/Neuro I, Neuro III e Neuro IV, sendo que apenas o grupo controle foi diferencialmente expresso quando comparado ao grupo Neuro III e quando comparado ao grupo Neuro IV. As comparações entre os níveis de expressão foram feitas através do teste de Kruskal-Wallis, onde *p-value* < 0,05.

4.10.4 Análise das regiões gênicas que flanqueiam os loci expressos

Uma busca acurada por genes *in silico* foi feita nos entornos dos *loci* diferencialmente expressos, sendo estabelecido um limite de 500 kb a jusante e a montante dos mesmos. Para tal, utilizou-se de ferramentas *online* e de bancos de dados variados, dentre eles: BLAT (BLAST-like alignment tool, UCSC Genome Browser, California, EUA); NCBI Sequence Viewer 3.10.5 (National Center for Biotechnology Information, EUA); Ensembl Genome Browser (Cambridge, Reino Unido); OMIM® (Online Mendelian Inheritance in Man®); GenAtlas (Descartes University, Paris, França); GeneCards®: The Human Gene Database (Weizmann Institute of Science, Israel); Wikigenes e Cosmic (Catalogue of somatic mutations in cancer, Trust Sanger Institute, Londres). Dentre os 43 *loci* diferencialmente expressos, 30 localizam-se em regiões intergênicas. Dentre estes, 15 HERV-H dos *loci* 1p21.12, 1p36.32, 2p11.2 (chr2:89354232-89355136), 2p11.2 (chr2:90183782-90184686), 2p16.1, 3p24.3, 3q23, 3q26.32, 5q21.3, 6q11.1-q11.2, 6q24.1, 9q21.13, 10q25.1, 11q14.1 e Xq11.2 não são flanqueados por nenhum gene do hospedeiro, no raio de 500 kb estabelecido como limite para as análises. Os quinze *loci* intergênicos restantes possuem ao menos um gene a jusante e/ou a montante, como descrito na tabela 17:

Tabela 17 - Genes que flanqueiam as regiões provirais diferencialmente expressas de HERV-H em neuroblastoma

Locus	Gene a jusante	Gene a montante
1p31.1	IFI44L	ELTD1
3q23	SPSB4	ACPL2
3q26.31	NAALADL2	-
4q34.2	ASB5	SPCS3
6p21.32	DAXX	KIFC1
6p21.1	LRFN2	TSPO2
6p12.1	-	COL21A1
7q22.3	AF086203	PIK3CG
10p12.1	PTCHD3	RAB18
11q13.2	PPP6R3	GAL
12p11.21	PKP2	SYT10
12p12.1	SLC38A1	SLC38A2
14q24.2	-	COX16-SYNJ2BP
18q12.2	-	ZNF397

Apenas 13 HERV-H dos *loci* 2q32.1, 2p22.3, 3q24, 3p14.3, 10p15.3, 12p12.1, 12p13.31, 14q32.12, 14q24.2, 18q12.3, 19p12, 19p13.2 e Xp21.3 encontram-se em regiões intragênicas. Os genes em que estes provírus encontram-se inseridos estão descritos na tabela 18:

Tabela 18 - Genes em que estão inseridos os provírus de HERV-H diferencialmente expressos em neuroblastoma

<i>Locus</i>	<i>Gene</i>
2q32.1	TFPI
2p22.3	LINC01320
3q24	SLC9A9
3p14.3	FAM107A
10p15.3	ADARB2
12p12.1	CASC1
12p13.31	KLRF1
14q32.12	TRIP11
14q24.2	UNC79
18q12.3	LINC00907
19p12	ZNF90
19p13.2	ZNF177
Xp21.3	RP11-268G12/SMEK3P

4.11 Análise de expressão de HERV-W

Da mesma forma como foi feito para HERV-H, uma busca *in silico* por LTRs e genes provirais gag e pol foi feita nos entornos dos *loci* diferencialmente expressos da família W. Dentre os 32 *loci* estudados, 14 apresentaram uma diferença de expressão significativa ($p < 0,05$) quando comparados aos controles, representados na Tabela 19:

Tabela 19 - *Loci* de HERV-W diferencialmente expressos.

Locus	p-value	5'LTR	3'LTR	Nível de expressão no tumor	Genoma provírus
1p34.2	0,0031*	LTR90A	LTR17	Diminuição	gag-pol-env
1q32.3	0,0371*	-	-	Aumento	env
3q23	0,0128*	AluSX	LTR17	Aumento	env
3q11.2	0,0054*	LTR17	LTR17	Aumento	gag-pol-env
4q31.1	0,0196**	LTR17	LTR17-LTR8	Diminuição	env
5p12	0,0223*	LTR7	LTR17	Aumento	gag-pol-env
5q11.2	0,0247*	LTR17	-	Aumento	env
6q21	<0,0001*	LTR17	LTR17	Diminuição	gag-pol-env
7q21.2	p<0,0001**	LTR17	LTR17	Aumento	sincitina
9q31.3	0,0001*	Alu	LTR17	Aumento	env
12q12	0,0041*	LTR17	-	Aumento	gag-pol-env
12q13.2	0,007*	LTR17	LTR17	Aumento	gag-pol-env
14q21.2	0,0007*	LTR17	LTR17	Diminuição	gag-pol-env
Xq27.1	0,0105**	-	LIMD1	Diminuição	env

*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney ($p < 0.05$)

** Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis

A amostra dos *locus* 4q31.1 foi dividida em 3 grupos: Natimorto, Pediátrico e Tumor. As amostras do *loci* 7q21.2 e Xq27.1 foram divididas em 4 grupos: Controle, Ganglio/Neuro I, Neuro III e Neuro IV. Todos estes *loci* apresentaram uma diferença significativa entre pelo menos dois desses grupos (Gráfico 19).

Gráfico 19 - *Loci* diferencialmente expressos da família W

Os *locus* 4q31.1 (A) foi dividido em três grupos: Natimorto, Pediátrico e Tumor. O grupo natimorto foi diferencialmente expresso quando comparado aos demais. O *loci* 7q21.2 (B) e Xq27.1 (C) foram dividido em 4 grupos: Controle, Ganglio/Neuro I, Neuro III e Neuro IV. B) o grupo controle foi diferencialmente expresso quando comparado aos demais grupos. C) A única diferença de expressão foi entre o grupo controle e o grupo Neuro IV. As comparações entre os níveis de expressão foram feitas através do teste de Kruskal-Wallis, onde *p-value* < 0,05.

4.11.1 Análise das regiões gênicas que flanqueiam os *loci* expressos

A mesma metodologia de análise aplicada à família H também foi aplicada à família W. Dentre os 14 *loci* diferencialmente expressos, 11 localizam-se em regiões intergênicas. Dentre estes, quatro HERV-W dos *loci* 4q31.1, 7q21.2, 12q12 e Xq27.1 não são flanqueados por nenhum gene do hospedeiro, no raio de 500 kb estabelecido como limite para as análises. Os seis *loci* intergênicos restantes possuem ao menos um gene a jusante e/ou a montante, como descrito na tabela 20:

Tabela 20 - Genes que flanqueiam as regiões provirais diferencialmente expressas de HERV-W em neuroblastoma

Locus	Gene a jusante	Gene a montante
1q32.3	LPGAT1	INTS7
3q23	GRK7	ATP1B3
3q11.2	-	EPHA6
5p12	-	FGF10
9q31.3	OR2K2	KIAA0368
12q13.2	TMPRSS12	METTL7A

Apenas 4 HERV-W dos *loci* 1p34.2, 5q11.2, 6q21 e 14q21.2 encontram-se na região intrônica dos genes HIVPE3, ACTBL2, ATG5 e FAM179B, respectivamente.

4.12 Análise de expressão de HERV-K

Devido a variabilidade da frequência relativa de HERV-K intra-*locus* entre as amostras controle, apenas os *loci* mais expressos encontrados na maioria das amostras foram selecionados para análise das regiões que flanqueiam os mesmos. Cinquenta *loci* foram selecionados para as análises e, assim como foi feito para as demais famílias, também foram realizadas buscas por LTRs, genes provirais e genes que flanqueiam ou em que o provírus esteja inserido.

Dentre os 50 *loci* avaliados, 26 pertencem a regiões intergênicas, sendo que os *loci* 4q32.1, 5p13.3, 5p13.3, 12q14.1 e 19q11 não são flanqueados por nenhum gene do hospedeiro, no raio de 500 kb estabelecido como limite para as análises. Os demais *loci* intragênicos possuem ao menos um gene a jusante ou a montante (Tabela 21). Todos os demais *loci* são provenientes de regiões intragênicas (Tabela 22).

Tabela 21 - Análises dos *loci* intergênicos de HERV-K

Locus	5'LTR	3'LTR	Gene a jusante	Gene a montante	Genoma provírus
1q21.3	LTR5	LTR5	ENSA	GOLPH3L	env
1q22	LTR5	-	ASH1L	MSTO1	env
1q22	LTR5		SEMA4A	-	env
1p34.3	LTR5	AluSq2	CSF3R	-	env
2q21.1	LTR5	-	-	RAB6C-AS1	env
22q11.21	LTR5	LTR5	PRODH	DGCR5	env
22q11.21	LTR5	LTR5	PRODH	DGCR2	env
3q12.3	LTR5	LTR5	RPL24	CEP97	gag-pol-env
3q12.3	LTR5	LTR5	RPL24	CEP97	gag-pol-env
3q27.2	LTR5	LTR5	LIPH	SENP2	env
4q32.1	LTR5	LTR5	-	-	env
4q32.3	LTR5	LTR5	TRIM61	TRIM60	env
5p13.3	LTR5	LTR5	-	-	gag-pol-env
5p13.3	LTR5	LTR5	-	-	gag-pol-env
6p22.2	LTR5	LTR5	TRIM38	-	env
6p22.1	LTR5B	LTR5	LINC00533	-	env
7p22.1	LTR5	LTR5	-	FOXK1	env
7p22.1	LTR5	LTR5	-	FOXK1	gag-pol-env
8q24.3	LTR5	-	-	KCNK9	env
11q23.3	LTR5	LTR5	TREH	DDX6	env
12q14.1	LTR5	LTR5	-	-	env
16p11.2	L1P1	LTR5	-	UBE2MP1	env
19p12	AluSp	LTR5B	ZNF90	ZNF826P	env
19p12	LTR5	LTR5	ZNF98	ZF492	env
19q11	LTR5	AluYa5	-	-	env
19p13.3	-	LTR5	THEG	C2CD4C	env

Tabela 22 - Análises dos *loci* intragênicos de HERV-K

Locus	5'LTR	3'LTR	Introgene	Genoma proviral
1q22	LTR5	LTR5	MSTO1	env
1q23.3	LTR5	LTR5	CD48	gag-pol-env
1q23.3	LTR5	LTR5	CD48	gag-pol-env
1q32.2	LTR5	-	CR1	env
1p31.1	LTR5	LTR5	SLC44A5	env
1p31.1	LTR5	LTR5	SLC44A5	env
21q21.1	LTR5	LTR5	MIR548XHG	env
3q13.2	LTR5	LTR5	RP11-572M11.4	env
3q21.2	LTR5	LTR5	RP11-379B18.5	gag-pol-env
3q21.2	LTR5	LTR5	RP11-379B18.4	env
3p25.3	LTR5	LTR5	ARPC4-TTLL3	env
3p25.3	LTR5	LTR5	ARPC4-TTLL3	env
5q33.3	LTR5	LTR5	SGCD	gag-pol-env
6q14.1	LTR5	LTR5	MEI4	gag-pol-env
7q22.2	LTR5	-	LHFPL3	env
7p21.2	LTR5	-	ISPD	env
8p23.1	LTR5	LTR5	DEFB107A	env
10q24.2	LTR5	-	ABCC2	env
10p14	LTR5	LTR5	LINC00707	env
10p14	LTR5	LTR5	LINC00707	env
11q22.1	LTR5	LTR5	TRPC6	env
11q12.3	LTR5	-	ASRGL1	env
12q24.11	LTR5	-	PPTC7	env
19q13.12	LTR5	LTR5	ZNF420	env

5 DISCUSSÃO

5.1 Amostras Controle

A escolha de um grupo controle adequado consiste em uma etapa complexa e de suma importância para estudos de doenças, uma vez que todas as análises são realizadas por comparação entre este grupo e o grupo composto pelos indivíduos afetados pela doença. O desenho inicial deste estudo almejou obter amostras controle de crianças saudáveis que foram a óbito vítimas de acidentes ou livre de doenças e neoplasias. Amostras com esses critérios de inclusão, obtidas geralmente em Institutos Médicos Legais (IML), são extremamente difíceis de conseguir, por se tratar de crianças e adolescentes menores de 18 anos e, frequentemente vinculadas a processos de investigação criminal.

Desse modo, as amostras controle deste estudo foram obtidas a partir da glândula adrenal de natimortos e crianças que foram a óbito por quaisquer doenças não tumorais ou que afetassem a glândula adrenal. A maior desvantagem da utilização deste grupo controle consiste no fato de que os *loci* expressos das famílias de HERV encontrados podem não representar fidedignamente a variabilidade e os níveis de expressão que seriam encontrados nas amostras provenientes de indivíduos saudáveis. Por outro lado, essas características permitiram uma subdivisão do grupo controle, proporcionando melhores parâmetros de comparação e análise do perfil de expressão entre as amostras.

A análise entre os grupos natimorto e pediátrico revelou uma diferença de expressão significativa em apenas quatro loci de HERV-H e um de HERV-W. Em todos estes casos, o grupo natimorto apresentou-se mais expresso do que o grupo pediátrico. As amostras provenientes dos natimortos ainda contêm células tronco fetais (CTF) em fase de maturação (O'DONOGHUE; FISK, 2004), diferentemente das amostras controle pediátricas que se encontram totalmente diferenciadas. O início do desenvolvimento embrionário é caracterizado por um estado geral de hipometilação (DANSRANJAVIN et al., 2009; JACKSON et al., 2004), sendo que muitos retroelementos, normalmente silenciados por metilação, tornam-se ativos nesta etapa (KANG et al., 2007; ROBBEZ-MASSON; ROWE, 2015; SANTONI; GUERRA; LUBAN, 2012). Ademais, durante o desenvolvimento embrionário da glândula adrenal, uma intensa alteração no padrão de metilação permite com que genes envolvidos em processos gerais de desenvolvimento se tornem metilados, enquanto aqueles com

função tecido-específica tornem-se hipometilados (SLIEKER et al., 2015). Em virtude do exposto, a diferença de expressão de HERV encontrada nas amostras controle, possivelmente correlaciona-se com a presença de células tronco remanescentes em diferenciação nas amostras de natimortos.

Análises histológicas e imunohistoquímicas permitiram selecionar as amostras mais adequadas ao estudo, tanto no que tange a integridade do material, quanto à presença da região medular. As amostras ideais deveriam ser compostas de região medular em quase sua totalidade, posto que o neuroblastoma se desenvolve apenas nesta região da glândula adrenal. No entanto, fatores como grau de autólise, hemorragia e intervalo *post mortem* somados dificultaram a dissecação das amostras e a obtenção de um material mais puro ideal. Desta forma, a possibilidade de um grau mínimo de contaminação do material macro-dissecado manteve-se aberta, por questões técnicas limitantes.

Quanto maior o intervalo *post mortem*, mais intensos são os fenômenos hipóxico-isquêmicos e autólise que afetam diretamente o pH celular, aumentam a produção de radicais livres e a ativação e liberação de enzimas celulares (KALOGERIS et al., 2012; MONORANU et al., 2009). Moléculas como o ácido ribonucleico (RNA), sensíveis a essas variações, são facilmente clivadas e degradadas. As análises realizadas mostraram que o intervalo *post mortem* foi o fator mais relacionado à degradação molecular nas amostras controle. Apesar disso, o RNA íntegro pode ser extraído das glândulas adrenais tanto das autópsias pediátricas, quanto das fetais.

Além desses parâmetros, diferenças entre indivíduos como idade e sexo, além de causas e circunstâncias da morte podem influenciar nos níveis de transcrição do tecido. Todas estas minúcias foram cautelosamente consideradas durante as interpretações dos dados de expressão gênica e serão discutidas mais adiante.

5.2 Amostras Tumorais

Apesar de ser o tumor sólido mais comum, a taxa de incidência do neuroblastoma no Brasil é baixa (aproximadamente, 7,3 casos/milhão) (CARTUM, 2011), o que torna a disponibilidade de amostras para pesquisa extremamente limitada. Diante desta realidade como premissa, este estudo dispôs de apenas 19 amostras, sendo 1 de Sarcoma de Ewing, e ateu-se principalmente a análises descritivas e exploratórias.

Apesar dos tumores pediátricos como neuroblastoma, sarcoma de Ewing, rabdossarcoma e linfoma apresentarem características morfológicas comuns, estes podem ser diferenciados por técnicas mais sensíveis e específicas, tais como: imunohistoquímica, citogenética e biologia molecular. Todavia, devido ao alto custo destas técnicas, na grande maioria das vezes, apenas a anamnese, exames de imagem e histológicos são realizados.

Todas as amostras incluídas no estudo foram histologicamente analisadas sob auxílio de um patologista e identificadas como sendo neuroblastomas ou ganglioneuroblastoma. No entanto, uma das amostras foi reclassificada como sarcoma de Ewing pelos especialistas do Hospital de Câncer de Barretos. O sarcoma de Ewing, assim como o neuroblastoma, origina-se a partir de células embrionárias que migram da crista neural e também pode acometer tecidos moles. Esta semelhança fez com que o diagnóstico inicial fosse equivocado, mas permitiu que esta amostra também fosse utilizada como parâmetro de comparação. Ainda dentro deste contexto, esta amostra em particular foi analisada de forma isolada para os parâmetros aplicados às demais amostras, visando determinar quaisquer peculiaridades descritas. De maneira geral, o tumor de Ewing, apresentou um perfil de expressão semelhante ao neuroblastoma. A similaridade na expressão da maioria destes *loci* possivelmente pode estar correlacionada a vias de regulação gênica comuns nestes tumores, dado que ambos se originam de células da crista neural. No entanto, o aumento na frequência dos transcritos dos *loci* 1q41 e 19p12 de HERV-H e 1p34.2 de HERV-W, encontrados apenas no Sarcoma de Ewing, apontam para regiões cuja a expressão pode ser específica do tumor. Todavia, estudos futuros devem ser realizados para validar as especulações aqui levantadas, posto que este trabalho contou uma única amostra de Sarcoma de Ewing.

A análise histológica das amostras permitiu ainda a subdivisão destas em três grupos: Ganglio/Neuro I, Neuro III e Neuro IV, sendo estes compostos por amostras de ganglioneuroblastoma e neuroblastoma estadio I, neuroblastoma estadio III e neuroblastoma estadio IV, respectivamente. A união das amostras de ganglioneuroblastoma e neuroblastoma estadio I em um único grupo, apesar de não ser ideal, foi baseada nas similaridades histopatológicas entre estes tumores e se fez necessária para atingir um número mínimo de amostras por grupo e aplicação de testes estatísticos. A comparação entre os três grupos revelou dois *loci* de HERV-H e dois *loci* de HERV-W diferencialmente expressos. Tanto o *locus* 7p14.3 de HERV-H, quanto os *loci* 7q21.2 e Xq27.1 de HERV-W

apresentaram uma maior expressão no grupo Ganglio/Neuro I e uma menor expressão no grupo Neuro IV, sendo a expressão do grupo Neuro III intermediária aos demais. Neuroblastomas possuem uma notável capacidade de regredir espontaneamente, principalmente em tumores de estadios I e 4S (HERO et al., 2008). Os mecanismos envolvidos na regressão destes tumores ainda são obscuros. No entanto, uma das teorias aceitáveis fundamenta-se na eliminação das células tumorais mediada pelo próprio sistema imune do hospedeiro. Neuroblastomas de alto risco, estadios III e IV, assim como diversas outras neoplasias ((HANAHAN; WEINBERG, 2011)), são capazes de evadir da resposta imune através da regulação negativa da expressão de moléculas de antígenos leucocitários (*Human Leucocyte Antigen* – HLA) de classe I (BRODEUR; BAGATELL, 2014). Por outro lado, os níveis de expressão de HLA de classe I em neuroblastoma de estadios 4S normalmente encontram-se normais, tornando as células deste tumor susceptíveis a eliminação pelo sistema imune (BRODEUR; BAGATELL, 2014; SQUIRE et al., 1990). Ainda dentro deste contexto, diversas famílias de retrovírus endógenos normalmente não expressas em células saudáveis, mostram uma expressão substancial em vários tipos de câncer (DOWNEY et al., 2015; RUPRECHT et al., 2008b). Consequentemente, os epítomos provenientes destes provírus podem induzir resposta imune adaptativa com uma potente atividade antitumor (CHERKASOVA; WEISMAN; CHILDS, 2013; SCHIAVETTI et al., 2002; TAKAHASHI et al., 2008). Tendo todas estas observações como premissa, a possibilidade de HERV induzir a resposta imune somada ao aumento de expressão de HERV encontrada no grupo Ganglio/Neuro I deste estudo, inaugura mais hipótese sobre um possível mecanismo que pode estar envolvido na regressão espontânea de neuroblastoma.

O *locus* 14q24.2 de HERV-H apresentou um resultado atípico, onde o grupo Neuro III apresentou uma expressão maior do que os demais grupos tumorais. Os genes SYNJ2BP e COX16 localizados a montante deste *locus* encontram-se hipometilados em neuroblastoma e estão envolvidos na fosforilação oxidativa celular (NEMOTO; DE CAMILLI, 1999; TAY et al., 2004).. As proteínas geradas por ambos genes interagem com a proteína codificada com o gene DCL, atuam na formação do fuso mitótico e regulam a atividade mitocondrial favorecendo o crescimento tumoral do neuroblastoma (VERISSIMO et al., 2013). Esta mesma função também foi descrita em câncer de mama (LI et al., 2009b). No entanto, esse processo é comum a todos os estádios de neuroblastoma, não justificando o aumento de expressão encontrado. Ademais, a expressão de HERV-H do *locus* 14q24.2 não foi relatada

em nenhum trabalho disponível na literatura. Todavia, apesar da ausência de dados que corroborem este resultado, a expressão diferencial no grupo Neuro III pode ser reflexo de uma alteração característica e exclusiva deste estadió em neuroblastoma. Em contrapartida, uma análise envolvendo uma maior quantidade de amostras se faz necessária para comprovar e validar esta especulação.

5.3 Detecção da expressão de Retrovírus Endógeno Humano

5.3.1 Análise da expressão de HERVs

A atividade transcricional de diversas famílias de HERV vem sendo amplamente estudada ao longo de décadas. No entanto, pouco se sabe sobre quais *loci* específicos deram origem a esses transcritos, tanto em tecidos saudáveis, quanto em tecidos malignos.

Uma estratégia empregada neste estudo, visando detectar uma maior variabilidade de loci das famílias H, W e K, foi a PCR One Step *in house*. A retrotranscrição de apenas cDNAs HERV-específicos permitiu a detecção tanto de *loci* altamente expressos, quanto *loci* raros. Além disso, o sequenciamento de DNA, utilizando os mesmos iniciadores da reação de One Step *in house*, revelou uma boa sensibilidade e especificidade, substanciando os resultados. De maneira geral, a estratégia utilizada comprovou ser adequada para a geração de um panorama de alta resolução da transcrição de HERV neste e, possivelmente, em outros estudos que pretendam avaliar sua expressão *loci*-específica.

Todos os tumores, incluindo neuroblastoma, de maneira geral, compartilham características essenciais para sua evolução: manutenção da sinalização proliferativa, evasão dos supressores de crescimento, resistência à morte celular (imortalidade), neoangiogênese, invasão ativa e metástase, reprogramação do metabolismo energético e evasão da eliminação pelo sistema imune (Figura15).

Figura 15 - Características comuns do desenvolvimento tumoral.

Adaptado de Hallmarks of Cancer: The Next Generation, (2011)

Todas estas características são adquiridas por mudanças genéticas ou epigenéticas nas células tumorais, através de um processo sequencial dependente de múltiplas divisões celulares. Muitos desses eventos genéticos afetam os níveis de expressão celular e, conseqüentemente, o processo de reparo de DNA ou sistemas de controle da divisão celular, levando a instabilidade genômica.

Alterações epigenéticas foram detectadas em todos os cromossomos das células tumorais de neuroblastoma, afetando não somente promotores, mas também regiões intragênicas e intergênicas (GÓMEZ et al., 2015). Em decorrência de diversos eventos de metilação, aproximadamente 10.881 genes mostraram-se alterados nesta neoplasia, sendo que 9.749 genes (89,59%) tornaram-se hipometilados e 1.132 genes (10,4%) hipermetilados (GÓMEZ et al., 2015). Todas essas mudanças, direta ou indiretamente, podem afetar HERV, posto que a maioria das ORFs e diversas LTRs desses provírus são silenciadas principalmente por meio de histonas, metilação, fosforilação e acetilação do DNA (STOYE, 2012; STRISSEL et al., 2012). De maneira geral, somente 4 dentre os 43 *loci* de HERV-H e 5 dentre os 32 *loci* de HERV-W diferencialmente expressos apresentaram uma redução na expressão quando

comparados a amostras controle, resultados estes compatíveis com o estado geral hipometilado do neuroblastoma.

Os *loci* diferencialmente expressos encontrados neste estudo são compostos por pseudogenes gag, pol, env ou apenas env de HERV. A maioria destes *loci* possuem ao menos uma LTR a jusante ou a montante dos genes provirais, sugerindo uma transcrição LTR mediada. No entanto, todas estas suposições necessitam de mais validações experimentais e uma maior casuística.

5.3.2 Expressão de HERV-H

Dentre os 43 *loci* diferencialmente expressos para a família H, foram selecionados os *loci* 1p36.32, 3q23, 6p21.32, 7p14.3, 11q13.2, 12p13.31, 12p12.1 (chr12:46716356-46717225), 14q32.12, 18q12.2 e 19p12, pois foram considerados os mais relevantes para esta discussão.

O HERV-H do *locus* 1p36.32 encontra-se em uma região intergênica e possui uma LTR7 incompleta a montante. Atualmente, nenhum estudo envolvendo expressão de HERV, relatou a atividade deste *locus*, tornando-o um importante alvo para futuras pesquisas. Diversos tumores, incluindo neuroblastoma, apresentam aberrações cromossômicas não-randômicas e de extensões variáveis na região do *locus* 1p36.31 (SCHWAB; PRAML; AMLER, 1996) que repercutem diretamente na agressividade do tumor. Acredita-se que mais de 20 genes supressores tumorais possam estar contidos nessa região (16). No entanto, apenas 5 genes (CHD5, CAMTA1, KIF1B, CASZ1 e miR-34A) foram identificados (HENRICH; SCHWAB; WESTERMANN, 2012; LI et al., 2016) e correlacionados à tumorigênese do neuroblastoma, até o presente momento. Além disso, não somente as deleções, mas também mutações e metilações CpG aberrantes em promotores podem ocasionar a redução na expressão desses genes (BAYLIN; JONES, 2011). Devido à proximidade entre os *loci* 1p36.31 e 1p36.32 e a possibilidade de deleção do *locus* retroviral, a estimativa de redução no nível de expressão de HERV seria esperada. No entanto, apesar da proximidade física de ambas regiões, as possíveis deleções ocorridas não afetaram o *loci* de HERV, resultando no aumento da expressão retroviral. O escopo deste estudo não incluiu análises de aberrações cromossômicas e moleculares de neuroblastoma. No entanto, essas informações seriam de extrema relevância para corroborar as suposições aqui levantadas.

O HERV-H intergênico do *locus* 3q23 (chr3:140928365-140929319) é composto por pseudogenes gag-pol-env e flanqueado por LTR7. A jusante deste, encontra-se o gene SPSB4 pertencente à família de supressores de sinalização por citocina, cuja a função ainda permanece desconhecida (KLEIBER; SINGH, 2009). A montante de HERV-H, encontra-se o gene ACPL2 que codifica para uma fosfatase envolvida na síntese de glicosaminoglicanos (KOIKE et al., 2014). Até o presente momento, nenhuma alteração na expressão de ambos os genes em tumores, bem como nenhum transcrito de HERV-H provenientes deste locus foram relatados na literatura. No entanto, independente dos genes próximos a HERV, o aumento de expressão detectado neste *locus*, pode ter resultado de uma atividade mediada pela LTR proviral.

O HERV-H do *locus* 6p21.32 é composto por pseudogenes gag-pol-env e flanqueado por um elemento Alu a jusante e uma LTR7 a montante. Elementos Alu são sequências curtas (300 pb) e repetitivas de nucleotídeos pertencente ao grupo SINE (do inglês – Short Intersperced elements) que constituem, aproximadamente, 11% do genoma humano (DEININGER, 2011). Muitos destes elementos Alu têm um importante papel na expressão gênica, podendo atuar como promotores, *enhancers*, além de influenciarem a poliadenilação e *splicing* dos RNAs (HÄSLER; STRUB, 2006). Por outro lado, o conhecimento sobre envolvimento dos elementos Alu na tumorigênese de neuroblastoma e outros tumores ainda é extremamente escasso. O gene DAXX, localizado a jusante do HERV do *locus* 6p21.32, codifica uma proteína multifuncional que interage com uma ampla variedade de proteínas envolvidas em diversos processos celulares, tais como morte celular, regulação gênica, fosforilação e poli-ubiquitinação. Mutações e alterações no nível de expressão do gene DAXX tem sido descritas em muitos tumores (BRAZINA et al., 2015; KIVIPÖLD et al., 2015; PIPINIKAS et al., 2015; PUTO; BROGNARD; HUNTER, 2015; TANG et al., 2015). Em neuroblastoma, alterações neste gene tem sido responsáveis pelo alongamento de telômeros em pacientes com recidivas (KURIHARA et al., 2014). O gene KIFC1 localizado a montante do HERV, codifica para uma proteína motora não-essencial responsável pelo agrupamento do centrôssoma. Esta proteína encontra-se altamente expressa em células tumorais e, geralmente, tem sido correlacionada a um mal prognóstico (LI et al., 2015b; MITTAL et al., 2016; PAWAR et al., 2014). Tanto o gene DAXX, quanto KIFC1 encontram-se hipometilados em neuroblastoma (GÓMEZ et al., 2015). Baseado no exposto, o aumento de

expressão de HERV-H do *locus* 6p21.32 possivelmente também pode ser produto de hipometilação desta região.

O *locus* 14q32.12 abriga o gene TRIP11, também denominado TRIP-230, responsável por codificar uma proteína envolvida na montagem e manutenção da estrutura de ligação entre o Complexo de Golgi e o centrôssomo (CHEN et al., 1999). Ademais, esta proteína também está envolvida na regulação de resposta a hipóxia, sendo sua função reprimida pela proteína retinoblastoma (Rb) (DENGLER; GALBRAITH; ESPINOSA, 2014). Em tumores, a depleção de Rb resulta em mudanças bioquímicas em resposta a hipóxia e ativa a transcrição gênica induzida por TRIP11 e que promovem a transformação metastática das células. (LABRECQUE et al., 2014). Todavia, nenhum trabalho descreveu a atividade deste gene em neuroblastoma. Na região intrônica do gene TRIP11, encontra-se o gene de envelope de HERV-H flanqueado por LTR7. Nenhuma atividade deste provírus havia sido descrita até o presente estudo, sendo que o aumento de expressão de HERV encontrado pode ser resultado tanto de uma transcrição conjunta com gene TRIP11, quanto mediada apenas pela LTR.

Mais de 700 genes do genoma humano codificam proteínas com domínio dedos de zinco (*zinc finger*) (VENTER et al., 2001). Proteínas com este domínio estão envolvidas em uma série de funções, incluindo ativação e repressão gênica (KLUG, 2010; LAITY; LEE; WRIGHT, 2001). O *locus* 18q12.2 abriga o gene ZNF397, um membro da família dedos de zinco. A função da proteína gerada por ZNF397 ainda não foi validada, mas acredita-se que esta seja uma proteína não-essencial e atue como um regulador transcricional durante a interfase e prófase do ciclo celular (BAILEY et al., 2008; WU et al., 2003). Este gene encontra-se a montante do provírus de HERV-H composto por pseudogenes gag-pol-env e flanqueado por LTR7. Não há relatos na literatura referente a expressão e função de ZNF397 em tumores, bem como a atividade de HERV neste *locus*. Por conseguinte, o aumento de expressão de HERV encontrado em neuroblastoma, assim como descrito nos demais *locus* até o presente momento, são inéditos.

Dentre todos os *loci* de HERV-H estudados, apenas os *loci* 11q13.2, 12p12.1, 12p13.31 e 19p12 apresentaram uma diminuição no nível de expressão. O HERV-H do *locus* 11q13.2 encontra-se em uma região intergênica e também é flanqueado por um elemento Alu (a montante) e uma LTR7 (a jusante). Adicionalmente, este *locus* possui mais uma LTR7 e parte do gene de envelope de HERV-H na região montante ao elemento Alu. Contudo, esta

parte do gene de envelope não possui a região alvo deste estudo (950 bp), não havendo nenhuma possibilidade dos transcritos pertencerem a esta região. A região que antecede o *locus* 11q13.2 abriga o gene PPP6R3 que codifica uma fosfatase-6 envolvida na via de reparo de quebra da fita dupla do DNA (DOUGLAS et al., 2010; STEFANSSON et al., 2008). Aberrações gênicas e diminuição da atividade desta enzima foram descritas em alguns tipos tumorais sendo que sua expressão encontra-se reduzida em tumores (HAMMOND et al., 2013; KATO et al., 2015; ZHONG et al., 2011). Em torno de 50 kb a jusante do *locus* 11q13.2 localiza-se o gene GAL. Este origina peptídeos neuroendócrinos amplamente expressos no sistema nervoso central e periférico, cujas diversas funções estão envolvidas na transmissão de estímulos nervosos, homeostase energética e regulação osmótica (BAUER et al., 2008; MERCHENTHALER, 2010). Enquanto a expressão deste gene apresenta-se elevada em neoplasias que acometem adultos (NAGAYOSHI et al., 2015), o oposto é encontrado em neuroblastoma. Experimentos *in vitro* mostraram que o restabelecimento da expressão de GAL em linhagens celulares de neuroblastoma foi capaz de induzir as células à apoptose (BERGER et al., 2004; TOFIGHI et al., 2008). Além disso, aberrações cromossômicas também têm sido encontradas no braço longo do cromossomo 11. A duplicação da região contendo o *locus* 11q13.3 foi comprovada após o aumento de expressão do gene MYEOV contido no mesmo ser detectado (TAKITA et al., 2011). Dado que o gene GAL se encontra hipermetilado em neuroblastoma (GÓMEZ et al., 2015), a redução da expressão de HERV no *locus* 11q13.2 talvez se justifique da mesma forma. No entanto, os dados e as informações obtidas nesta análise, não permitem estabelecer qualquer correlação entre nossos resultados e a integridade cromossômica das células tumorais desses pacientes.

A redução na expressão de HERV-H dos *loci* 12p12.1 e 12p13.31 foi extremamente significativa, sendo que algumas amostras apresentaram uma frequência relativa de *reads* oriundos deste *locus* próxima de zero. O HERV-H do *locus* 12p12.1 é composto apenas pelo gene de envelope e flanqueado por LTR7s. Além disso, este encontra-se na região intragênica do gene CASC1, cuja a função é desconhecida. O HERV-H do *locus* 12p13.31, também composto apenas pelo gene de envelope, encontra-se na região intragênica do gene KLRP1. Este gene, normalmente expresso em células *natural killers*, codifica um receptor de lectina do tipo c (*C-type lectin-like receptor*) que tem como função estimular a citotoxicidade e liberação de citocinas destas células (KELLEY; WALTER; TROWSDALE, 2005; RODA-NAVARRO et al., 2000, 2001). Células natural killers são linfócitos que compõem o

sistema imune inato capazes de eliminar células tumorais ou infectadas por vírus por citotoxicidade direta (VIVIER et al., 2008). Não há relatos na literatura sobre a expressão tanto do gene CASC1, quanto KLRF1 em tumores. Este resultado aponta para lacunas tanto no conhecimento sobre a expressão gênica em neuroblastoma, quanto sobre a atividade de HERV tanto em tecidos saudáveis, quanto em tumorais. Por outro lado, permite com que estudos futuros explorem ambas as áreas.

Flanqueado por LTRs7, o HERV do *locus* 19p12 encontra-se na região intragênica do gene ZNF90. Descoberto em 1991, o gene ZNF90 foi classificado como membro da subfamília KRAB (*Kruppel-associated box*) que codifica proteínas dedos de zinco (*zinc finger*). Mesmo muito tempo após sua descoberta, a função deste ainda permanece obscura (BELLEFROID et al., 1991). Por fazer parte da subfamília KRAB, acredita-se que sua função também possa estar relacionada a supressão da expressão gênica por meio de ligações ao DNA (LANGE et al., 1995). Um trabalho recente desenvolvido por Leo Hata e colaboradores (HATA et al., 2011) revelou que ZNF90 é capaz de inibir a atividade supressora de NRSF (*Neuron-Restrictive Silencer Factor*). NRSF é um repressor de transcrição que se liga a sequências conservadas de DNA e contribui para a regulação de diversos processos biológicos, dentre eles: diferenciação neuronal e carcinogênese (MORI et al., 1992). Assim como a ausência de expressão de NRSF induz a diferenciação de células neuronais (YANG et al., 2008), a reativação da expressão de NRSF em células diferenciadas resulta em anormalidades e distúrbios gênicos (HATA et al., 2011; PAQUETTE; PEREZ; ANDERSON, 2000). Uma vez que as células tumorais de neuroblastoma expressam altos níveis de NRSF (NISHIMURA et al., 1996), uma correlação inversa com os níveis de expressão de ZNF90 pode ser conjecturada. Assumindo-se tal suposição como verdadeira e supondo que a transcrição de HERV tenha sido mediada pelo gene em que se encontra inserido, a redução de expressão de HERV encontrada neste estudo corrobora com tal hipótese. No entanto, outros estudos se fazem necessários para avaliar o nível de expressão de ZNF90, bem como o estado epigenético em que esta região se encontra.

A análise de expressão de HERV-H do *locus* 7p14.3 revelou apenas diferenças entre os grupos tumorais, sendo que o grupo Ganglio/Neuro I apresentou uma maior expressão e o grupo Neuro IV uma menor expressão. No entanto, quando comparado as amostras controle, não houve diferença de expressão significativa. A principal justificativa para esta ausência de diferença baseia-se na alta variância do grupo controle, cuja as frequências

relativas variaram de 0,049 (mínimo) a 2,364 (máximo). Novas análises envolvendo um número maior de amostras se fazem necessárias para averiguar se há realmente uma ampla variabilidade na expressão de HERV nas amostras controle. Principalmente, um número amostral maior permitirá validar as diferenças encontradas entre as amostras tumorais, posto que, fundamentado nos resultados obtidos por este estudo, aparentemente há uma possível regulação negativa da expressão de HERV-H em tumores de alto risco.

A expressão desregulada de sequências retrovirais endógenas em neoplasias tem sido principalmente vinculada ao aumento da instabilidade cromossômica e celular (KATOH, 2014). De maneira geral, todas as hipóteses levantadas neste estudo em relação as diferenças de expressão encontradas nos 43 *loci* de HERV-H podem ser correlacionadas, principalmente, com alterações genéticas e epigenéticas no tumor. Do ponto de vista de expressão *loci*-específico, todos os transcritos observados são inéditos na literatura. Estes resultados, formam um novo clado no conhecimento de expressão retroviral e abrem uma nova frente para estudos futuros.

Por outro lado, a possibilidade dos transcritos de HERV promoverem ou inibirem o desenvolvimento tumoral não deve ser descartada. Diversos ensaios envolvendo o gene de envelope de HERV-H apontam este como protagonista na imunossupressão ou ativação da resposta imune celular e humoral em algumas neoplasias (JERN et al., 2005; KERSHAW et al., 2001; MANGENEY et al., 2001).

5.3.3 Expressão de HERV-W

Os HERV-W localizados nos *loci* 1q32.3, 3q23, 3q11.2, 5p12, 5q11.2, 7q21.2, 9q31.3, 12q12 e 12q13.2, dentre os quatorze diferencialmente expressos, apresentaram aumento de expressão quando comparados aos controles.

O HERV-W do locus 1q32.3 é composto apenas pelo gene de envelope e uma LTR17 a jusante. Este provírus encontra-se uma região intergênica e é flanqueado pelos genes LPGAT1 a jusante e INTS7 a montante. O gene LPGAT1 é responsável pela síntese de uma acetiltransferase 1 (Lysophosphatidylglycerol Acyltransferase 1) responsável pela reacetilação de um fosfolípido de membrana utilizado como precursor na síntese de cardiolipina, um importante componente da membrana interna da mitocôndria (YANG; CAO; SHI, 2004). O gene INTS7 compõe o complexo de processamento de pequenos RNAs

nucleares e exerce um papel de sinalização em resposta ao dano de DNA durante a fase S do ciclo celular (BAILLAT et al., 2005). Todavia, nenhuma correlação entre a expressão destes genes e tumores foi estabelecida até o momento. Ademais, nenhum outro trabalho disponível na literatura descreveu a expressão de HERV-W proveniente do locus 1q32.3. Dado a proximidade de HERV-W com o gene INST7 e sabendo-se que este encontra-se hipometilado em neuroblastoma (GÓMEZ et al., 2015), pode-se inferir que a região que abriga o provírus possivelmente também se encontra hipometilada, permitindo a transcrição proviral. No entanto, mais estudos se fazem necessários para comprovar tal especulação.

Transcritos de HERV-W provenientes do *locus* 3q23 detectados neste estudo, também foram detectados em pacientes com esclerose múltipla (ANTONY et al., 2011; LAUFER et al., 2009; PERRON et al., 2005; SCHMITT et al., 2013b). O gene GRK7, localizado a ~5kb a jusante de HERV-W, codifica uma proteína quinase pertencente à família de quinases reguladoras de receptores acoplados a proteína G (HORNER et al., 2005), e é especificamente expresso na retina (CHEN et al., 2001; CIDECIYAN et al., 2003). Até o presente momento, a expressão alterada deste gene foi encontrada apenas em tumor de Wilms, cujo nível de expressão apresentou-se extremamente elevado, quando comparado aos controles (MASCHIETTO et al., 2011). Em neuroblastoma, o gene GRK7 encontra-se hipometilado, porém os níveis de expressão deste não foram de fato avaliados (GÓMEZ et al., 2015). No entanto, a atividade aumentada de HERV-W do locus 3q23 encontrada em nosso estudo, pode ser decorrente desta hipometilação. O gene ATP1B3, localizado a ~50 kb a montante do HERV-W do *locus* 3q23, codifica uma proteína envolvida na manutenção do gradiente eletroquímico dos íons de sódio e potássio através da membrana celular (MALIK et al., 1996, 1998). Este gene também encontra-se superexpresso em alguns tumores (LAWSON et al., 2015; MESRI et al., 2013; YAN et al., 2007), porém sua função na tumorigênese permanece obscura. Não há relatos da atividade de ATP1B3 em neuroblastoma. Ademais, o provírus intergênico deste *locus* é flaqueado por um elemento AluSX a jusante e uma LTR17 a montante. Algumas LTRs possuem um promotor bidirecional, podendo promover a transcrição de genes a montante ou a jusante destas (HUH et al., 2008), inclusive dos próprios genes retrovirais. Com isso, a ausência de uma 5'LTR de neste *locus*, sugere uma transcrição proviral possivelmente mediada pela 3'LTR ou pelo promotor dos genes nos entornos deste provírus.

O HERV-W intergênico do *locus* 3q11.2 é composto por pseudogenes gag-pol-env flanqueado por LTR17s. Raros transcritos de HERV provenientes deste *locus* também foram detectados em amostras de pacientes com esclerose múltipla (ANTONY et al., 2011; LAUFER et al., 2009; PERRON et al., 2005; SCHMITT et al., 2013b). A montante de HERV-W, aproximadamente a 150kb, encontra-se o gene EPHA6 normalmente expresso em testículos e cérebro (HAFNER et al., 2004). Este gene é membro da família Eph que codifica para receptores de tirosina quinase e interagem com um ligante denominado efrina (BRÜCKNER; KLEIN, 1998). Muitos dos membros desta família gênica têm se mostrado diferencialmente expressos em diversos tumores (BRANTLEY-SIEDERS et al., 2011; EASTY et al., 1999; HAFNER et al., 2004; SUGIMURA et al., 2010). Em neuroblastoma, altos níveis de expressão destes genes correlacionam-se a um melhor prognóstico (TANG et al., 1999, 2000a, 2000b). No entanto, não há relatos sobre a expressão do gene EPHA6 especificamente neste tipo de tumor. Atualmente, apenas um único trabalho avaliou as alterações no nível expressão do gene EPHA6 em tumores. Dentre todas as neoplasias avaliadas, somente o câncer colorretal apresentou alterações, sendo o nível de expressão menor do que as amostras controles. Por outro lado, um trabalho recente revelou que o aumento de expressão deste gene em câncer de próstata pode estar correlacionado com a angiogênese, metástase e progressão tumoral (LI et al., 2015a). Baseado no exposto, as análises e informações sobre as alterações genéticas ocorridas nos entornos do HERV-W do *locus* 3q11.2 não são suficientes para justificar o aumento de expressão encontrado. No entanto, a presença de LTR17 tanto a montante, quanto a jusante do provírus sugerem uma transcrição mediada por LTR e possivelmente influenciada por fatores de transcrição específicos.

A região 5p12 abriga um provírus intergênico de HERV-W composto por gag-pol-env e flanqueado por LTR17 completas, sugerindo uma transcrição mediada por LTR. A montante de HERV-W (~250kb) localiza-se o gene FGF10 membro da família fator de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor* – FGF). Este codifica para uma proteína envolvida em uma grande variedade de processos biológicos, tais como: crescimento celular, desenvolvimento embrionário, reparo tecidual, crescimento e invasão tumoral, dentre outros (EMOTO et al., 1997; SEKINE et al., 1999, 1999; THEODOROU et al., 2004; YE; DUVILLIÉ; SCHARFMANN, 2005). Os fatores de crescimento de fibroblastos têm um papel importante no desenvolvimento e diferenciação neuronal (GUILLEMOT; ZIMMER, 2011). Contudo, sua relação com neuroblastoma ainda não foi elucidada.

O gene ACTBL2 localizado no *locus* 5q11.2 codifica para uma isoforma de actina, denominada κ -actina. O aumento de expressão desta proteína, descrito em hepatocarcinoma, favorece a proliferação celular e tem sido relacionada a um mau prognóstico (CHANG et al., 2006, 2011). Não há relatos na literatura sobre a atividade deste gene em outros tumores, incluindo neuroblastoma. Na região intrônica deste gene, encontra-se o retrovírus endógeno humano da família W composto apenas pelo gene envelope e uma LTR17 a jusante do provírus. A escassez de informações sobre a região 5q11.2 que abriga HERV-W impossibilitou estabelecer hipóteses que justificassem o aumento de expressão encontrado em nosso estudo.

A região 7q21.2 abriga o gene de envelope de HERV-W responsável pela produção da proteína sincitina. Este gene manteve-se preservado no curso da evolução, tornando-se essencial para o hospedeiro (DUPRESSOIR; LAVIALLE; HEIDMANN, 2012). A sincitina é altamente expressa na placenta durante o desenvolvimento embrionário normal e está envolvida na fusão das células que formam o sinciotrofoblasto. Sua propriedade fusogênica, assim como ocorre com maioria dos vírus envelopados exógenos (CHEN; OLSON, 2005; DIMITROV, 2004), se deve a presença de domínios transmembrana e de superfície (HOLDER et al., 2012). Em situações inadequadas, a expressão de sincitina pode resultar em aumento da ploidia celular, e, conseqüentemente, instabilidade cromossômica. Os resultados deste estudo revelaram um aumento da expressão de sincitina nas amostras tumorais, corroborando com achados em outros tumores descritos na literatura (BJERREGAARD et al., 2006; MALINIEMI et al., 2013a; STRICK et al., 2007; SUN et al., 2010). Curiosamente, o aumento de expressão mostrou-se mais acentuado em tumores de baixo risco, podendo estar correlacionado com a regressão espontânea destes tumores, como descrito no item 5.2. O aumento recorrente de transcritos de HERV-W em diversas neoplasias tem consolidado a hipótese de utilização destes como marcadores prognósticos, como já proposto para câncer colorretal (LARSEN et al., 2009) e câncer de mama (LARSSON; HOLCK; CHRISTENSEN, 2007), bem como para fins terapêuticos (GASENT BLESA; CANDEL, 2009). Com isso, novos estudos se fazem necessários para validar os resultados encontrados neste trabalho e, por conseguinte, permitirão avaliar a possibilidades de utilização de HERV-W tanto na avaliação do estadiamento, como na terapia do neuroblastoma.

O *locus* 9q31.3 de HERV-W encontra-se em uma região intergênica, sendo flanqueado a montante por L1P3/L1MC, membros do grupo LINE (*Long Interspersed Nuclear*

Elements), e por uma LTR17 a jusante e aloja apenas o gene de envelope de HERV-W. LINE são elementos repetitivos que compõem ~17% do genoma humano. Estes normalmente são compostos por uma sequência promotora 5'UTR (*Untranslated Region*), duas ORFs (*Open Reading Frames*) não sobrepostas e 3'UTR. Muitos dos elementos LINEs, assim como os HERVs, são epigeneticamente silenciados por metilação ou por mutações durante a evolução do hospedeiro (CORDAUX; BATZER, 2009). Ainda assim, estudos recentes têm observado diversos transcritos em células humanas provenientes de elementos LINE (RANGWALA; ZHANG; KAZAZIAN, 2009), cujas funções ainda permanecem desconhecidas. A hipometilação encontrada em muitos tumores, incluindo neuroblastoma, permite que as regiões promotoras silenciadas de LINEs sejam expostas e sua transcrição restabelecida (CRISCIONE et al., 2014). Ademais, os promotores destes elementos também são capazes de promover a expressão dos genes que os circundam e gerar variações no *splicing* de seus transcritos (ROMAN-GOMEZ et al., 2005; WOLFF et al., 2010). Dado o exposto e a ausência da LTR 5' do *locus* de HERV, o aumento de expressão retroviral encontrado neste estudo pode ter sido mediado pelo elemento LINE localizado a montante do retrovírus. Recentemente, transcritos provenientes do mesmo *locus* 9q31.3 de HERV-W também foram detectados em amostras de pacientes com esclerose múltipla (SCHMITT et al., 2013b). No entanto, apesar de uma série de pesquisas (PERRON; LANG, 2010) terem buscado determinar o papel desses retrovírus na esclerose múltipla, nenhuma hipótese foi comprovada.

O HERV-W do *locus* 12q12 é composto por pseudogenes completos de gag-pol-env e apenas uma LTR17 a jusante. Nenhum gene foi localizado nos entornos deste *locus*, sendo a transcrição deste provírus, possivelmente promovida por sua LTR a jusante. Ademais, nenhum trabalho relatou a presença de transcritos de HERV-W proveniente deste *locus*.

Flanqueado pelos genes TMPRSS12 a jusante e METTL7A a montante, o HERV-W do *locus* 12q13.2 é composto por pseudogenes gag-pol-env e possui uma LTR17 5' e LTR 3'. O gene TMPRSS12 codifica uma endopeptidase-serina responsável pela quebra de ligações peptídicas de aminoácidos não-terminais. Esta proteína encontra-se normalmente expressa em testículos e recentemente também foi encontrada em tecido de câncer de testículo (LIU et al., 2013b). O gene METTL7A, por sua vez, pertence ao grande grupo de enzimas denominadas metiltransferases responsáveis pela metilação do DNA, RNA e proteínas. A metilação, assim como outras modificações epigenéticas, afetam regulação gênica, memória celular, silenciamento de genes e elementos transponíveis, imprinting genômico e repressão

de pseudo-elementos provenientes de sequências duplicadas (COPELAND; SOLOMON; RICHON, 2009; DENIS; NDLOVU; FUKS, 2011; LAN et al., 2010). Em neuroblastoma, o gene *TPRSS12* encontra-se hipermetilado, enquanto o gene *METTL7A* encontra-se hipometilado (GÓMEZ et al., 2015). Com isso, a divergência entre o estado de metilação de ambos os genes, sugere que o aumento da expressão de HERV-W do *locus* 12q13.2 encontrado neste estudo, pode ter sido resultante de uma hipometilação HERV-específica, independente dos demais genes nos entornos deste.

Os demais *loci* de HERV-W investigados neste estudo apresentaram uma diminuição de expressão em relação ao controle, sendo os *loci* 1p34.2, 6q21 e 14q21.2 encontrados em regiões intragênicas, e os *loci* 4q31.1 e Xq27.1 em regiões intergênicas. As análises dos genes e das LTRs de HERV-W do *locus* 4q31 revelaram que este provírus está inserido na orientação 3' -5'. Acredita-se que esta tenha sido uma conformação favorecida pela seleção natural, de modo a selecionar negativamente estes retrovírus, evitando danos a célula hospedeira (MEDSTRAND; VAN DE LAGEMAAT; MAGER, 2002). No entanto, como mencionado anteriormente, algumas LTRs possuem um promotor bidirecional, capaz de promover a transcrição de genes a montante ou a jusante destas (HUH et al., 2008). O *locus* Xq22.3, por exemplo, também abriga um membro da família W em orientação reversa a fita codante (ROEBKE et al., 2010). Apesar disso, um grande número de transcritos provenientes deste *locus* são encontrados em amostras de pacientes com esclerose múltipla (RYAN, 2011). Ademais, o HERV-W do *locus* 4q31 possui uma LTR17 completa a jusante da região 3' do provírus e uma LTR17 parcial, imediatamente seguida de uma LTR8 completa a montante da região 5'. A presença de diferentes LTRs, permite que diferentes fatores de transcrição possam estar atuando na expressão proviral. Diante do exposto, especula-se que a orientação 3' → 5' do HERV-W, somada às diferenças entre o estado epigenético e a presença de possíveis fatores de transcrição distintos de ambas as amostras, possam ter influenciado no resultado encontrado.

O HERV-W do *locus* Xq27.1, mapeado e descrito por Tristem (TRISTEM, 2000) é composto por gene um envelope e apenas uma LTR17 a montante. No entanto, a atividade deste provírus não foi descrita em mais nenhum outro trabalho disponível na literatura. Neste estudo apresentamos dois resultados para este *locus*. O primeiro resultado mostrou uma diferença de expressão significativa entre todos os grupos tumorais, sendo a maior expressão encontrada no grupo Ganglio/Neuro I e a menor no grupo Neuro IV. O segundo

resultado, proveniente da comparação entre o grupo controle e os grupos tumorais, revelou uma diferença de expressão apenas entre o grupo controle e o grupo Neuro IV. No entanto, o grupo controle apresentou uma variância alta, implicando na ausência de diferença de expressão significativa entre este e os grupos Ganglio/Neuro I e Neuro III. O grupo Neuro IV, por outro lado, apresentou um nível de expressão significativamente inferior ao mínimo encontrado nas amostras controle. Uma análise observacional e descritiva desses resultados, excluindo-se os que se apresentaram extremamente discrepantes dentro do grupo controle, aponta para um nível de expressão semelhante apenas entre o grupo controle e o grupo Ganglio/Neuro I, sendo os demais diferentes entre si. Esses resultados sugerem uma possível regulação negativa da expressão de HERV-W em tumores de alto risco. Contudo, novas análises envolvendo um número maior de amostras são necessárias para validar a hipótese aqui levantada.

O HERV-W do *locus* 1p34.2 encontra-se em uma região intragênica do gene HIVPE3. Este gene, membro da família Zas, codifica uma proteína que se liga a sequências específicas de DNA em regiões promotoras e *enhancers*, atuando como fator de transcrição. Além disso, este gene também tem papel na ativação da transcrição de NFkB, atuando na inflamação e apoptose (HICAR et al., 2001). Poucos trabalhos na literatura relataram alterações na transcrição desse gene em tumores (ALLEN; WU, 2000; QIN et al., 2014). No entanto, devido a estes estudos terem reportado resultados contraditórios, não há nenhuma correlação fidedigna deste com a tumorigênese. O HERV-W localizado neste *locus* possui uma LTR90A pertencente à família HERV-L a montante e LTR17 a jusante, sendo sua orientação coerente com o gene HIVPE3 (5' → 3'). Nenhum trabalho, até o presente momento, relatou anomalias no *locus* 1p34.2 em pacientes com neuroblastoma. Ademais, estudos de metilação em neuroblastoma, revelaram hipometilação do gene HIVPE3 (GÓMEZ et al., 2015). Baseado no exposto e assumindo-se que a transcrição de HERV neste *locus* seja mediada pelo gene em que este se encontra, esperava-se que o nível de expressão de HERV-W fosse igual ou superior às amostras controle. No entanto, os resultados obtidos foram incongruentes com esta hipótese. Por outro lado, a presença de uma LTR viável a montante de HERV ou a jusante, dado a capacidade bidirecional das LTRs, pode permitir com que estes retrovírus sejam transcritos, independentemente do gene em que estão inseridos. Portanto, pressupondo que as LTRs que flanqueiam o *locus* 1p34.2 encontram-se metiladas apenas nas amostras tumorais, seria justificável a redução na expressão do HERV-W

encontrada. Futuros ensaios de atividade de LTR forneceriam suporte a esta hipótese. Em virtude do ineditismo deste trabalho, bem como a escassez de informações referentes tanto ao gene HIVPE3, quanto a regulação das LTRs em neuroblastoma, nenhuma correlação adicional pode ser estabelecida.

Autofagia é um processo celular natural que ocorre no lisossomo e tem por finalidade reciclar e degradar componentes citoplasmáticos, organelas celulares danificadas, patógenos e toxinas (KIM; KLIONSKY, 2000). A atividade elevada deste processo pode resultar em morte celular autofágica, sendo este o mecanismo de ação de algumas drogas utilizadas na prática clínica oncológica (BURSCH et al., 1996; RICCI; ZONG, 2006). O gene ATG5, localizado no *locus* 6q21 codifica uma proteína envolvida na formação da vesícula autofágica e na morte autofágica celular (PYO et al., 2005). A inibição deste gene tem contribuído para a gênese de diversos tumores, como por exemplo, melanoma (LIU et al., 2013a) e câncer colorretal (CHO et al., 2012). Por outro lado, alguns estudos têm revelado que a autofagia pode ter um papel dúbio na tumorigênese, podendo atuar tanto como supressor tumoral através da remoção de proteínas aberrantes e organelas, como favorecer a sobrevivência celular após estresse (DAS; SHRAVAGE; BAEHRECKE, 2012; DEGENHARDT et al., 2006; KONDO et al., 2005). O papel de ATG5 em neuroblastoma também é controverso, pois a expressão deste pode inibir a angiogênese e impedir o crescimento tumoral (KIM; CHUNG, 2012) e a supressão resulta em uma resposta eficiente ao tratamento (WANG et al., 2014). O trabalho desenvolvido por Pilvi Maliniemi e colaboradores identificou altos níveis de expressão de HERV-W provenientes do *locus* 6q21 em lesões de pacientes com linfoma de células T cutâneas (MALINIEMI et al., 2013b), sendo este o segundo trabalho disponível na literatura que descreveu a expressão de HERV-W neste *locus* (SCHMITT et al., 2013b). Em virtude do que foi mencionado anteriormente, a redução na expressão de HERV-W encontrada no *locus* 6q21 em neuroblastoma, assim como o *locus* 1p34.2, contradiz a hipótese esperada. Diversos fatores genéticos, celulares e moleculares de neuroblastoma podem estar interferindo na expressão desses retrovírus em ambos os *loci* descritos, sendo necessários novos estudos para validá-los.

Flanqueado por LTRs17, o retrovírus do *locus* 14q21.2 apresentou baixíssimos níveis de expressão quando comparado as amostras controle. Este provírus, assim como 4q31.1, encontra-se na orientação 3' – 5' e localiza-se na região intragênica do gene FAM179B (CARNINCI et al., 2005). Nenhum estudo, além de alguns de predição gênica, foi encontrado

disponível no banco de dados público sobre este gene (PubMed Central Link), sendo sua função, até o presente momento, desconhecida. Ademais, nenhum trabalho envolvendo a expressão de HERV detectou transcritos provenientes deste *locus*. Dessa forma, nenhuma correlação dos resultados obtidos pode ser estabelecida.

A variedade de regiões genômicas intra e intergênicas às quais os transcritos de HERV-W foram mapeados, bem como as alterações no nível de expressão, levantam questões relativas aos mecanismos responsáveis pela transcrição dos mesmos. Fatores como o contexto genômico, estrutura e orientação dos HERV-W podem influenciar diretamente na sua transcrição. Um estudo detalhado feito por Li et al. (2011) avaliou quais vias de transcrição poderiam estar atuando em alguns *loci* de HERV-W, a partir da cultura celular de fibroblastos (LI et al., 2011). A maioria dos resultados obtidos por este grupo reforçam as hipóteses sugeridas em nosso estudo e serão discutidas a seguir.

Dentre os fatores classificados como estruturais por Li et al., encontram-se as LTRs, que são promotores compostos por duas regiões denominadas U3 e U5 separadas por um segmento repetitivo denominado R. A região U3 pode variar de tamanho e contem sítios de ligação para diferentes fatores de transcrição celular (SCHÖN et al., 2001). No estudo de Fang Li, a iniciação e regulação da transcrição de HERV-W revelou-se dependente da funcionalidade da região U3 da 5'LTR. Além disso, alguns *loci* de HERV-W apresentaram variações nucleotídicas nessas regiões (LI et al., 2011). Mudanças nucleotídicas nessa região impedem o reconhecimento de fatores de transcrição interferindo, consequentemente, na transcrição proviral (SCHÖN et al., 2001). A instabilidade genômica e as mutações recorrentes em tumores (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011), incluindo neuroblastomas (CHEUNG; DYER, 2013), podem gerar alterações em diversos promotores. Baseado nisso, a diminuição da expressão de HERV dos *loci* 4q13.3 e 6q 21, possivelmente podem ser decorrentes de alterações na região U3 das LTR17 que flanqueiam estes *loci*.

Diversos estudos buscam compreender como os níveis de metilação das LTRs de HERV podem contribuir com a variação de expressão retroviral entre tecidos (MATOUSKOVÁ et al., 2006; NELLÅKER et al., 2009; REISS; ZHANG; MAGER, 2007). Gimenez et al. (2010), comprovaram que a superexpressão do *locus* 7q21.2 de HERV-W em câncer testicular é decorrente da hipometilação da região U3 da LTR. Dado o estado hipometilado de neuroblastoma, o aumento de expressão dos diferentes *loci* encontrados neste estudo, dentre eles o 7q21.2, talvez se justifique da mesma forma.

A maioria das análises feitas neste estudo foram baseadas no contexto genômico em que os *loci* dos HERVs diferencialmente expressos se encontravam. Um estudo recente desenvolvido por Hurst e colaboradores, evidenciaram que mudanças na expressão de um determinado gene, prediz mudanças na expressão de genes próximos a este, excetuando-se genes vizinhos que se encontram a uma distância superior a ~100 kb (GHANBARIAN; HURST, 2015). A partir disso, este mesmo estudo demonstrou que modificações locais na cromatina em regiões com alta densidade gênica geram mudanças de expressão em todo o grupo de genes. Dentro deste cenário, o trabalho de Feng Li revelou uma predominância de LTRs transcricionalmente ativos de HERV-W em regiões repletas de genes transcricionalmente ativos (LI et al., 2011). Os mesmos resultados foram encontrados para a família K, no trabalho desenvolvido por Buzdin e colaboradores (BUZDIN et al., 2006). Além disso, regiões ricas em genes são mais acessíveis a fatores de transcrição do que regiões intergênicas, possivelmente facilitando a transcrição dos retrovírus contidos nestas. No entanto, o inverso também é verdadeiro, ou seja, caso estas regiões estejam suprimidas em um determinado tecido, os HERVs contidos nestas possivelmente também o serão.

Muitos HERV-W intragênicos desprovidos da região U3 em suas LTRs, são dependentes da expressão do gene hospedeiro. Por outro lado, LTRs íntegras parecem permitir a transcrição proviral independente do gene em que estão inseridos (LI et al., 2011). Com isso, a expressão de HERV-W dos loci intragênicos 1p34.2 e 6q21, talvez seja regulada apenas pelas LTRs17 que os circundam, não dependendo da expressão do gene em que inseridos. Ademais, a orientação dos HERVs intragênicos também interfere no nível de expressão, independente da região U3 da LTR. Provírus na mesma orientação do gene no qual eles estão integrados apresentam um nível de expressão maior do que os que se encontram na orientação oposta (LI et al., 2011). Desse modo, o nível de expressão extremamente baixo nas amostras controle e praticamente nulo nas amostras tumorais do *loci* 4q31.1 seja decorrente a orientação contrária a fita que este se encontra.

Em suma, as alterações de expressão de HERV-W descritas neste estudo, poderão contribuir para um melhor entendimento de algumas das regiões do genoma humano menos estudadas. Além de uma melhor compreensão sobre os mecanismos associados a expressão de HERV-W e a complexidade do neuroblastoma.

5.3.4 Expressão de HERV-K

A ausência de expressão de HML-2 nas amostras tumorais fez com que todas as análises referentes a família K fossem conduzidas de maneira distinta dos demais. Neste contexto, informações quantitativas como níveis globais de transcrição por *locus* tornaram-se secundárias às informações qualitativas, como a identificação de *loci* transcritionalmente ativos.

A maioria dos genomas de provírus completos, contendo os genes gag-pol-env, encontrados no genoma humano são pertencentes a família K, sendo os mais conservados pertencentes à subfamília HML-2. Os membros do grupo HML-2 são classificados em tipo I e tipo II e codificam duas proteínas distintas denominadas Rec e Np9, respectivamente (SUBRAMANIAN et al., 2011). Estas proteínas diferem entre si pela ausência de 292 pb localizados na região limítrofe dos genes pol-env de HML-2 tipo I e têm se mostrado de extrema importância na tumorigênese, pois são capazes de interagir com diversas proteínas e levar a transformação celular (ARMBRUESTER et al., 2004; BOESE et al., 2000; DENNE et al., 2007; EJTHADI et al., 2005; GALLI et al., 2005; SCHMITT et al., 2013a). Um número crescente de estudos continua demonstrando aumento nos níveis de expressão de HML-2 em diversos tipos de tumores, dentre eles: câncer de ovário (WANG-JOHANNING et al., 2007), tumores de células germinativas (BOLLER et al., 1993; HERBST et al., 1998; LÖWER et al., 1984; RUPRECHT et al., 2008a), melanomas (BÜSCHER et al., 2005, 2006; HAHN et al., 2008; MANGENEY et al., 2005; MUSTER et al., 2003; SINGH et al., 2013), leucemias e linfomas (CONTRERAS-GALINDO et al., 2008; IWABUCHI et al., 2004) e câncer de mama (ARMBRUESTER et al., 2002; CONTRERAS-GALINDO et al., 2008; FRANK et al., 2008; ONO; KAWAKAMI; USHIKUBO, 1987; WANG-JOHANNING et al., 2001, 2003; WILLER et al., 1997). No entanto não há relatos na literatura de diminuição ou ausência de expressão de HML-2 em tumores, quando comparados tecidos e células saudáveis, como foi encontrado em nosso estudo.

Estudos mais recentes têm se voltado não apenas a identificar o aumento no número de transcritos de HML-2 em tumores, mas também os *loci* de origem destes (BHARDWAJ et al., 2015; CONTRERAS-GALINDO et al., 2012; MACFARLANE; BADGE, 2015; SCHMITT et al., 2013a). Alguns *loci* como 7p22.1, 8p23.1, 19p12 e 22q11.21 foram recorrentemente descritos nestes trabalhos e também foram identificados em nosso estudo.

Os genes SDK1, FOXK1, AP5Z1 e RADIL compõem a mesma região onde se encontra o *locus* 7p22.1 de HERV-K (HML-2). O gene SDK1 localizado a 300 kb a montante do *locus* 7p22.1 de HML-2 codifica para uma proteína de adesão celular responsável por promover a formação e estabilização das sinapses durante o desenvolvimento neuronal (YAMAGATA; WEINER; SANES, 2002). A desregulação desta proteína tem um impacto importante na disfunção dos podócitos, células renais, em nefropatias associadas ao HIV (KAUFMAN et al., 2004). O aumento de expressão deste gene é comum em tumores, porém seu papel na tumorigênese ainda é indeterminado (VERONE et al., 2013; YOON et al., 2012; ZHANG et al., 2015). O gene FOXK1 localiza-se a aproximadamente 100 kb a jusante do HML-2. Este gene codifica um fator de transcrição que regula a expressão do gene da mioglobina, tendo um importante papel na diferenciação e processo de remodelamento da musculatura em adultos (SHI et al., 2012). A superexpressão desse gene tem sido correlacionada a inibição da autofagia (BOWMAN; AYER; DYNLACHT, 2014) e indução da proliferação celular em células neoplásicas (WANG et al., 2015). Imediatamente a jusante do gene FOXK1, encontra-se o gene AP5Z1 envolvido no reparo de quebra de fita dupla de DNA (SŁABICKI et al., 2010). Nenhuma correlação deste gene com a tumorigênese foi descrita na literatura. Por fim, o gene RADIL a jusante de AP5Z1 codifica uma enzima responsável por hidrolisar guanosina trifosfato (GTP). Esta hidrolase participa de eventos de adesão e migração das células precursoras da crista neural durante o desenvolvimento embrionário (SMOLEN et al., 2007). O aumento da expressão de RADIL parece estar associado ao aumento da proliferação, migração e invasão celular em alguns tumores (AHMED et al., 2012; XIA et al., 2001) e em neuroblastoma (SCHÖNHERR et al., 2010). O contexto genômico em que se encontra o *locus* 7p22.1, não suporta os resultados encontrados neste trabalho, dado que neste contexto era esperado um aumento na expressão desses retrovírus nas amostras tumorais.

O HML-2 do *locus* 8p23.1 encontra-se na região intragênica do gene DEFB107A. Este gene, expresso em neutrófilos, codifica uma proteína denominada defensina envolvida na resposta imune inata a infecções virais e bacterianas (TAUDIEN et al., 2004, 2014). Somente um único trabalho descreveu sobre a expressão deste gene em vinte e nove tecidos saudáveis, não incluindo glândula adrenal (PATIL et al., 2005). Ademais, nenhum trabalho correlacionou a atividade deste gene com tumores.

O HML-2 intergênico do *locus* 19p12 é flanqueado pelo gene ZNF90 a jusante e pseudogene ZNF826P a montante. Como descrito anteriormente, o gene ZNF90 foi

classificado como membro da subfamília KRAB que codifica proteínas dedos de zinco e é expresso em todos os tecidos humanos (BELLEFROID et al., 1993). Dado o exposto, a expressão de HML-2 encontrada nas glândulas adrenais deste estudo pode ser reflexo do contexto genômico da região que abriga este provírus.

Os genes PRODH e DGCR5 flanqueiam o HML-2 do *locus* 22q11.21. O gene PRODH codifica a enzima prolina desidrogenase que cataliza a degradação de prolina (LIU; PHANG, 2012), sendo sua atividade descrita em cérebro, rim e fígado (BENDER et al., 2005). Alterações neste gene tem sido associada a doenças como esquizofrenia (JACQUET, 2002; JACQUET et al., 2004; LI; HE, 2006) e câncer (LIU; PHANG, 2012; PHANG et al., 2008). PRODH tem uma função anti-tumor, pois é capaz de induzir a apoptose, sendo que este encontra-se suprimido em células tumorais (LIU; PHANG, 2012; PHANG et al., 2008). O gene DGCR2 gera uma proteína que exerce um papel na migração de células da crista neural. Curiosamente, não há estudos sobre esta proteína em neuroblastoma, apesar desta estar envolvida no desenvolvimento da crista neural. Mutações neste foram correlacionadas a Síndrome de DiGeorge (SUTHERLAND et al., 1996; WADEY et al., 1995) e, recentemente, o aumento de expressão foi detectado em pacientes com câncer de bexiga (KIM et al., 2014). A escassez de informações sobre as funções dos genes PRODH e DGCR5 em neuroblastoma, impediu que quaisquer correlações e especulações sobre a expressão do HML-2 do *locus* 22q11.21 encontrada neste trabalho fossem estipuladas. Por outro lado, assumindo-se que a supressão do gene PRODH também ocorra em neuroblastoma, assim como ocorre em outros tumores, justificaria a ausência de expressão de do HML-2 do *locus* 22q11.21 encontrada neste estudo.

De maneira geral, a atividade de HML-2 tem sido detectada em alguns tecidos saudáveis, porém em níveis basais de expressão. Ademais, a proporção de *loci* transcritos nestes tecidos podem variar consideravelmente entre diferentes tipos celulares, sugerindo um padrão de expressão tecido-específico (HEYNE et al., 2015; SCHMITT et al., 2015; WILDSCHUTTE et al., 2014). Nenhum dos trabalhos disponíveis na literatura avaliou a expressão de HML-2 em glândulas adrenais, sendo os resultados obtidos em nosso estudo, inéditos. No entanto, esta lacuna mais uma vez demonstra a escassez de conhecimento sobre a atividade HERV e reforça a necessidade de estudos mais complexos (KHODOSEVICH; LEBEDEV; SVERDLOV, 2004).

Um estudo recente avaliou a atividade de HML-2 em câncer de próstata e revelou que quase a totalidade dos transcritos foi proveniente de poucos *loci*. Além disso, alguns *loci* comumente descritos em outros tumores, não foram detectados no tecido prostático. Este estudo avaliou ainda os sítios de ligação de fatores de transcrição das LTRs e revelou não haver diferenças entre provírus expressos e não-expressos, sugerindo uma transcrição mediada por alterações epigenéticas (GOERING et al., 2015; LAVIE et al., 2005). Baseado no exposto, a ausência de expressão de HML-2 nas amostras de neuroblastoma pode ser consequência de uma real inatividade de *loci* específicos e não de toda a subfamília HML-2. A ausência de expressão também pode ter sido resultante da limitação dos iniciadores utilizados e não deve ser totalmente descartada.

Por fim, como apenas a subfamília HML-2 foi avaliada neste estudo, estudos futuros envolvendo os demais membros da família K, bem como análises de LTRs e regulação gênica se fazem necessários para validar os resultados obtidos neste estudo, além de dar continuidade na busca sobre o real papel de HERV no desenvolvimento de neuroblastoma.

5.4 Considerações Finais

Este trabalho objetivou avaliar a expressão de três famílias de HERV em pacientes com neuroblastoma. O neuroblastoma é uma neoplasia maligna neuroepitelial com origem em células embrionárias precursoras do sistema nervoso simpático (BRODEUR, 2003). Dentro de um único tumor, diversos fenótipos celulares embrionários como neuroblastos, células de Schwann, células perineurais e até mesmo melanócitos estão presentes (WALTON et al., 2004). Dessa forma, acredita-se que o neuroblastoma origine-se de células tronco pluripotentes incapazes de se diferenciar durante o desenvolvimento embrionário. Ademais, a heterogeneidade celular encontrada nessa neoplasia pressupõe a existência de células tronco tumorais (CTT) multipotentes capazes de se replicar e originar diferentes células tumorais (KAMIJO, 2012). Muitos dos mecanismos complexos de regulação genética e epigenética na manutenção da pluripotência são compartilhados entre CTT e células tronco embrionárias (ISCENKO et al., 2008; LI; LIU; IZPISUA BELMONTE, 2012). A hipometilação é um fenômeno comumente encontrado em ambas células tronco, tumorais e embrionárias, que permite a ativação de diversos genes e retrotransposons, incluindo HERV (ROBBEZ-MASSON; ROWE, 2015).

Transcritos de HERV-H desempenham um papel fundamental na manutenção da pluripotência de células tronco humanas e são considerados atualmente marcadores precisos para a pluripotência (SANTONI; GUERRA; LUBAN, 2012), sendo sua transcrição regulada por NANOG, OCT4 e SOX2. Estes são fatores de transcrição de células tronco embrionárias capazes de se ligar a LTR de HERV-H promovendo a transcrição dos genes. A medida em que ocorre a diferenciação celular, o nível de expressão de OCT4, NANOG e SOX2 caem e, por conseguinte, o nível dos transcritos de HERV-H (OHNUKI et al., 2014; SANTONI; GUERRA; LUBAN, 2012). Estes fatores de transcrição também são altamente expressos em células tronco tumorais (LIU; YU; LIU, 2013). No entanto, apesar de sua origem embrionária, nem todos os neuroblastomas expressam estes fatores (COTTERMAN; KNOEPFLER, 2009; MONAJEMZADEH et al., 2014; X.; SHIM, 2013). A análise comparativa entre os *loci* expressos em células tronco embrionárias (LU et al., 2014) e em neuroblastoma encontrados em nosso estudo, revelou aumento de expressão apenas nos *loci* 3q24, 3q26.31, 3p14.3, 10p15.3, 14q32.12 e 18q12.2, em ambos os estudos. De modo geral, apesar das observações descritas sugerirem um perfil de expressão de HERV-H bastante distinto entre neuroblastoma e células tronco embrionárias, as singularidades encontradas, como a expressão de *loci* em comum, revelam a possibilidade de ativação de vias comuns às duas situações.

A expressão de HERV-K (HML-2) também tem sido utilizada como marcador de pluripotência em células tronco. O estudo feito por Fuchs e colaboradores (2013), encontrou altos níveis de expressão de HML-2 em células tronco induzidas e embrionárias, sendo o locus 22q11.21 (K101) o mais ativo. Em nosso estudo, transcritos provenientes deste *locus* também foram encontrados nas amostras controle, sendo o nível de expressão em natimortos mais elevado do que nas amostras pediátricas. Com isso, a diferença encontrada possivelmente resulta da presença de células tronco fetais em fase de maturação (O'DONOGHUE; FISK, 2004) nas amostras de natimortos. O estudo de Fuchs demonstrou, no entanto, que o HML-2 do *locus* 7p22.1 foi expresso apenas em células de carcinoma embrionário, não sendo detectados transcritos nas células tronco. Em contradição ao exposto, nosso estudo detectou a expressão de HML-2 do *locus* 7p22.1 somente nas amostras controle, sendo ausente nas células tumorais de neuroblastoma. A incongruência apontada salienta a complexidade e diversidade de possíveis papéis exercidos pelos HERVs. Atualmente, a presença ou ausência de transcritos da família W em células tronco embrionárias ainda não foi descrita na literatura.

RNAs não codificantes longos (*long non coding RNAs* - lncRNA) são moléculas envolvidas em diversos processos biológicos, tais como splicing, tradução e mudanças epigenéticas (GUTTMAN et al., 2011; PONTING; OLIVER; REIK, 2009). Trabalhos recentes, demonstraram que elementos transponíveis compõem a maior parte dos lncRNA (KAPUSTA et al., 2013), incluindo HERV (LU et al., 2014). Ademais, alterações na expressão de lncRNA são comuns na maioria dos tumores (ESTELLER, 2011; LI et al., 2009a), apesar dos mecanismos envolvidos nessa desregulação ainda serem desconhecidos. Desvendar o padrão de expressão *loci*-específicos de HERV no genoma humano pode ajudar a compreender diversas outras vias moleculares de regulação, inclusive as mediadas por lncRNA.

Por fim, toda a análise feita neste estudo sugere que os HERVs são regulados por diversos mecanismos celulares, além de serem um componente permanente do transcriptoma celular. Considerando a quantidade de sequências retrovirais no genoma humano, o estudo sobre a contribuição de famílias distintas de HERV no transcriptoma é importante para melhor compreender a regulação da transcrição do genoma como um todo. A estratégia de sequenciamento de *amplicons* em profundidade empregada neste estudo foi fundamental para descrever e compreender as atividades transcricionais dos *loci* individuais de HERV em neuroblastoma. Ademais, esta metodologia pode ser igualmente adequada para descrever a transcrição de outras famílias de HERV, tais como, HERV-L, e HERV-E, por exemplo, bem como em outros tipos de tecido/tumores.

Este trabalho foi o primeiro a descrever a atividade de retrovírus endógenos humanos em um tumor sólido pediátrico. A relevância deste trabalho não se limita ao seu ineditismo. Toda a rede de conhecimento gerada neste estudo resultou em mais um alicerce no conhecimento e compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação e expressão de HERV tanto em tumores, quanto em tecidos saudáveis. Ademais, a avaliação da expressão dos *loci* mais conservados do gene de envelope das famílias H, W e K forneceu as primeiras diretrizes para que ensaios futuros mais abrangentes possam determinar e entender o real papel dos HERVs na tumorigênese de neuroblastoma.

6 CONCLUSÕES

Este projeto teve como objetivo estudar a expressão de três diferentes famílias retrovírus endógenos humanos, HERV-K, HERV-W e HERV-H, em pacientes diagnosticados com neuroblastoma. As principais conclusões foram:

A - Os HERVs são ativamente transcritos em neuroblastoma e glândulas adrenais normais. No entanto, o nível de expressão de cada família é variável, sendo que nem todas são expressas.

B - O mapeamento dos transcritos de HERV em neuroblastoma revelou uma grande variabilidade de *loci* provirais intragênicos e intergênicos sendo expressos, evidenciando uma alta complexidade na regulação de expressão destes retrovírus endógenos.

C - As diferenças nos níveis de expressão de alguns *loci* de HERV encontradas em neuroblastoma revelam uma regulação de expressão tumor-específica, como já demonstrado em outros tipos de tumores. No entanto, não se pode afirmar que esta expressão seja causa ou consequência das alterações genéticas ocorridas durante a tumorigênese.

D - As análises de expressão somadas ao contexto genético e epigenético de neuroblastoma, permitiram com que várias hipóteses fossem levantadas acerca da regulação da expressão de HERV neste tumor. A hipometilação geral do tecido tumoral pode ter um papel importante na expressão gênica e na reativação de retrotransposons, podendo ser a principal razão para a expressão de HERV neste contexto.

REFERÊNCIAS*

- AHMED, S. M. et al. KIF14 negatively regulates Rap1a-Radil signaling during breast cancer progression. **The Journal of Cell Biology**, v. 199, n. 6, p. 951–967, 10 dez. 2012.
- ALLEN, C. E.; WU, L. C. Downregulation of KRC induces proliferation, anchorage independence, and mitotic cell death in HeLa cells. **Experimental Cell Research**, v. 260, n. 2, p. 346–356, 1 nov. 2000.
- ALVARADO, C. S. et al. Natural history and biology of stage A neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group Study. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 22, n. 3, p. 197–205, jun. 2000.
- ANTONY, J. M. et al. Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: Innocent bystanders or disease determinants? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 2, p. 162–176, fev. 2011.
- ARMBRUESTER, V. et al. A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 8, n. 6, p. 1800–1807, jun. 2002.
- ARMBRUESTER, V. et al. Np9 protein of human endogenous retrovirus K interacts with ligand of numb protein X. **Journal of Virology**, v. 78, n. 19, p. 10310–10319, out. 2004.
- ARVEY, A. et al. The tumor virus landscape of AIDS-related lymphomas. **Blood**, v. 125, n. 20, p. e14–e22, 14 maio 2015.
- BAILEY, S. L. et al. ZNF397, a new class of interphase to early prophase-specific, SCAN-zinc-finger, mammalian centromere protein. **Chromosoma**, v. 117, n. 4, p. 367–380, 28 mar. 2008.
- BAILLAT, D. et al. Integrator, a multiprotein mediator of small nuclear RNA processing, associates with the C-terminal repeat of RNA polymerase II. **Cell**, v. 123, n. 2, p. 265–276, 21 out. 2005.
- BALTIMORE, D. Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. **Nature**, v. 226, n. 5252, p. 1209–1211, 27 jun. 1970.
- BARBARO, G.; BARBARINI, G. HIV infection and cancer in the era of highly active antiretroviral therapy (Review). **Oncology Reports**, v. 17, n. 5, p. 1121–1126, maio 2007.
- BARBUTO, J. A. M. et al. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. **Cancer immunology, immunotherapy: CII**, v. 53, n. 12, p. 1111–1118, dez. 2004.
- BAUER, J. W. et al. Galanin – 25 years with a multitasked neuropeptide. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 12, p. 1820–1825, 27 maio 2008.
- BAYLIN, S. B.; JONES, P. A. A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 10, p. 726–734, out. 2011.
- BELLEFROID, E. J. et al. The evolutionarily conserved Krüppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 9, p. 3608–3612, 1 maio 1991.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração, Rio de Janeiro, 2002.

- BELLEFRÖID, E. J. et al. Clustered organization of homologous KRAB zinc-finger genes with enhanced expression in human T lymphoid cells. **The EMBO journal**, v. 12, n. 4, p. 1363–1374, abr. 1993.
- BENDER, H.-U. et al. Functional Consequences of PRODH Missense Mutations. **The American Journal of Human Genetics**, v. 76, n. 3, p. 409–420, mar. 2005.
- BERGER, A. et al. Galanin receptor subtype GalR2 mediates apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 500–507, fev. 2004.
- BHARDWAJ, N. et al. Differential Expression of HERV-K (HML-2) Proviruses in Cells and Virions of the Teratocarcinoma Cell Line Tera-1. **Viruses**, v. 7, n. 3, p. 939–968, 4 mar. 2015.
- BIELACK, S. et al. Controversies in childhood osteosarcoma. **Minerva Pediatrica**, v. 65, n. 2, p. 125–148, abr. 2013.
- BIRCH, J. M.; MARSDEN, H. B. A classification scheme for childhood cancer. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 40, n. 5, p. 620–624, 15 nov. 1987.
- BJERREGAARD, B. et al. Syncytin is involved in breast cancer-endothelial cell fusions. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 63, n. 16, p. 1906–1911, ago. 2006.
- BLAISE, S.; MANGENEY, M.; HEIDMANN, T. The envelope of Mason-Pfizer monkey virus has immunosuppressive properties. **The Journal of General Virology**, v. 82, n. Pt 7, p. 1597–1600, jul. 2001.
- BLOCK, T. M. et al. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, v. 22, n. 33, p. 5093–5107, 11 ago. 2003.
- BLOMBERG, J. et al. Classification and nomenclature of endogenous retroviral sequences (ERVs): problems and recommendations. **Gene**, v. 448, n. 2, p. 115–123, 15 dez. 2009.
- BOESE, A. et al. Human endogenous retrovirus protein cORF supports cell transformation and associates with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. **Oncogene**, v. 19, n. 38, p. 4328–4336, 7 set. 2000.
- BOLLER, K. et al. Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. **Virology**, v. 196, n. 1, p. 349–353, set. 1993.
- BOUVARD, V. et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. **The Lancet. Oncology**, v. 10, n. 4, p. 321–322, abr. 2009.
- BOWMAN, C. J.; AYER, D. E.; DYNLACHT, B. D. Foxk proteins repress the initiation of starvation-induced atrophy and autophagy programs. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 12, p. 1202–1214, dez. 2014.
- BRADLEY, R. D.; HILLIS, D. M. Recombinant DNA sequences generated by PCR amplification. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, n. 5, p. 592–593, maio 1997.
- BRANTLEY-SIEDERS, D. M. et al. Eph/ephrin profiling in human breast cancer reveals significant associations between expression level and clinical outcome. **PloS One**, v. 6, n. 9, p. e24426, 2011.
- BRAZINA, J. et al. DNA damage-induced regulatory interplay between DAXX, p53, ATM kinase and Wip1 phosphatase. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 14, n. 3, p. 375–387, 2015.

- BRODEUR, G. M. et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 11, n. 8, p. 1466–1477, ago. 1993.
- BRODEUR, G. M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 3, p. 203–216, mar. 2003.
- BRODEUR, G. M.; BAGATELL, R. Mechanisms of neuroblastoma regression. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 11, n. 12, p. 704–713, dez. 2014.
- BRÜCKNER, K.; KLEIN, R. Signaling by Eph receptors and their ephrin ligands. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 8, n. 3, p. 375–382, jun. 1998.
- BURSCHE, W. et al. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 8, p. 1595–1607, ago. 1996.
- BÜSCHER, K. et al. Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. **Cancer Research**, v. 65, n. 10, p. 4172–4180, 15 maio 2005.
- BÜSCHER, K. et al. Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas and melanoma cell lines. **Melanoma Research**, v. 16, n. 3, p. 223–234, jun. 2006.
- BUZDIN, A. et al. At least 50% of human-specific HERV-K (HML-2) long terminal repeats serve in vivo as active promoters for host nonrepetitive DNA transcription. **Journal of Virology**, v. 80, n. 21, p. 10752–10762, nov. 2006.
- CAIRO, M. S. et al. Childhood and adolescent non-Hodgkin lymphoma: new insights in biology and critical challenges for the future. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 45, n. 6, p. 753–769, nov. 2005.
- CARNINCI, P. et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5740, p. 1559–1563, 2 set. 2005.
- CARTUM, J. **Variáveis de prognóstico em crianças maiores de um ano portadoras de neuroblastoma disseminado**. text—[s.l.] Universidade de São Paulo, 31 jan. 2011.
- CASTLEBERRY, R. P. Neuroblastoma. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 33, n. 9, p. 1430-1437-1438, ago. 1997.
- CHANG, K.-W. et al. Identification of a novel actin isoform in hepatocellular carcinoma. **Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology**, v. 36, n. 1, p. 33–39, set. 2006.
- CHANG, K.-W. et al. Overexpression of kappa-actin alters growth properties of hepatoma cells and predicts poor postoperative prognosis. **Anticancer Research**, v. 31, n. 6, p. 2037–2044, jun. 2011.
- CHEN, C. K. et al. Characterization of human GRK7 as a potential cone opsin kinase. **Molecular Vision**, v. 7, p. 305–313, 21 dez. 2001.
- CHEN, E. H.; OLSON, E. N. Unveiling the Mechanisms of Cell-Cell Fusion. **Science**, v. 308, n. 5720, p. 369–373, 15 abr. 2005.

CHEN, X.; PAPPO, A.; DYER, M. A. Pediatric solid tumor genomics and developmental pliancy. **Oncogene**, v. 34, n. 41, p. 5207–5215, 8 out. 2015.

CHEN, Y. et al. Thyroid hormone, T3-dependent phosphorylation and translocation of Trip230 from the Golgi complex to the nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 8, p. 4443–4448, 13 abr. 1999.

CHERKASOVA, E.; WEISMAN, Q.; CHILDS, R. W. Endogenous retroviruses as targets for antitumor immunity in renal cell cancer and other tumors. **Frontiers in Oncology**, v. 3, p. 243, 2013.

CHEUNG, N.-K. V.; DYER, M. A. Neuroblastoma: Developmental Biology, Cancer Genomics, and Immunotherapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 6, p. 397–411, jun. 2013.

CHO, D.-H. et al. Down-regulated expression of ATG5 in colorectal cancer. **Anticancer Research**, v. 32, n. 9, p. 4091–4096, set. 2012.

CHOW, L. T.; BROKER, T. R.; STEINBERG, B. M. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 118, n. 6–7, p. 422–449, jun. 2010.

CHU, A. et al. Wilms' tumour: a systematic review of risk factors and meta-analysis. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 24, n. 5, p. 449–469, set. 2010.

CIDECIYAN, A. V. et al. Cone deactivation kinetics and GRK1/GRK7 expression in enhanced S cone syndrome caused by mutations in NR2E3. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 3, p. 1268–1274, mar. 2003.

COFFIN, J. M. Genetic diversity and evolution of retroviruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 176, p. 143–164, 1992.

COFFIN, J. M.; HUGHES, S. H.; VARMUS, H. E. (EDS.). **Retroviruses**. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

COHEN, C. J. et al. Placenta-specific expression of the interleukin-2 (IL-2) receptor β subunit from an endogenous retroviral promoter. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 41, p. 35543–35552, 14 out. 2011.

COHEN, M.; LARSSON, E. Human endogenous retroviruses. **BioEssays**, v. 9, n. 6, p. 191–196, 1 dez. 1988.

COHN, S. L. et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 27, n. 2, p. 289–297, 10 jan. 2009.

CONRAD, B. et al. A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. **Cell**, v. 90, n. 2, p. 303–313, 25 jul. 1997.

CONTRERAS-GALINDO, R. et al. Human endogenous retrovirus K (HML-2) elements in the plasma of people with lymphoma and breast cancer. **Journal of Virology**, v. 82, n. 19, p. 9329–9336, out. 2008.

CONTRERAS-GALINDO, R. et al. Characterization of human endogenous retroviral elements in the blood of HIV-1-infected individuals. **Journal of Virology**, v. 86, n. 1, p. 262–276, jan. 2012.

COPELAND, R. A.; SOLOMON, M. E.; RICHON, V. M. Protein methyltransferases as a target class for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 9, p. 724–732, set. 2009.

CORDAUX, R.; BATZER, M. A. The impact of retrotransposons on human genome evolution. **Nature Reviews. Genetics**, v. 10, n. 10, p. 691–703, out. 2009.

COTTERMAN, R.; KNOEPFLER, P. S. N-Myc Regulates Expression of Pluripotency Genes in Neuroblastoma Including *lif*, *klf2*, *klf4*, and *lin28b*. **PLOS ONE**, v. 4, n. 6, p. e5799, 4 jun. 2009.

CRISCIONE, S. W. et al. Transcriptional landscape of repetitive elements in normal and cancer human cells. **BMC Genomics**, v. 15, p. 583, 2014.

DANSRANJAVIN, T. et al. The role of promoter CpG methylation in the epigenetic control of stem cell related genes during differentiation. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 8, n. 6, p. 916–924, 15 mar. 2009.

DAS, G.; SHRAVAGE, B. V.; BAEHRECKE, E. H. Regulation and Function of Autophagy during Cell Survival and Cell Death. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 6, p. a008813–a008813, 1 jun. 2012.

DAVIDOFF, A. M. Wilms' tumor. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 21, n. 3, p. 357–364, jun. 2009.

DE BACKER, A. et al. Ovarian germ cell tumors in children: a clinical study of 66 patients. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 46, n. 4, p. 459–464, abr. 2006.

DE JONGE, H. J. M. et al. Evidence Based Selection of Housekeeping Genes. **PLoS ONE**, v. 2, n. 9, p. e898, 19 set. 2007.

DE OLIVERIA ANDRADE, L. J. et al. Association Between Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 33–37, 2009.

DE PARSEVAL, N.; HEIDMANN, T. Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, n. 1–4, p. 318–332, 2005.

DEB, P. et al. A single-primer PCR-based retroviral-related DNA polymorphism shared by two distinct human populations. **Genome / National Research Council Canada = Génome / Conseil National De Recherches Canada**, v. 41, n. 5, p. 662–668, out. 1998.

DEGENHARDT, K. et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 10, n. 1, p. 51–64, jul. 2006.

DEININGER, P. Alu elements: know the SINEs. **Genome Biology**, v. 12, n. 12, p. 236, 2011.

DENGLER, V. L.; GALBRAITH, M.; ESPINOSA, J. M. Transcriptional Regulation by Hypoxia Inducible Factors. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 49, n. 1, p. 1–15, 2014.

DENIS, H.; NDLOVU, 'MATLADI N; FUKS, F. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. **EMBO Reports**, v. 12, n. 7, p. 647–656, jul. 2011.

DENNE, M. et al. Physical and Functional Interactions of Human Endogenous Retrovirus Proteins Np9 and Rec with the Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein. **Journal of Virology**, v. 81, n. 11, p. 5607–5616, 6 jan. 2007.

- DIMITROV, D. S. Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 109–122, fev. 2004.
- DOCKERTY, J. D. et al. Infections, vaccinations, and the risk of childhood leukaemia. **British Journal of Cancer**, v. 80, n. 9, p. 1483–1489, jul. 1999.
- DOUGLAS, P. et al. Protein Phosphatase 6 Interacts with the DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit and Dephosphorylates γ -H2AX. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, n. 6, p. 1368–1381, mar. 2010.
- DOWNEY, R. F. et al. Human endogenous retrovirus K and cancer: Innocent bystander or tumorigenic accomplice? **International Journal of Cancer**, v. 137, n. 6, p. 1249–1257, 1 set. 2015.
- DUNN, C. A. et al. Transcription of two human genes from a bidirectional endogenous retrovirus promoter. **Gene**, v. 366, n. 2, p. 335–342, 1 fev. 2006.
- DUNN, C. A.; MEDSTRAND, P.; MAGER, D. L. An endogenous retroviral long terminal repeat is the dominant promoter for human beta1,3-galactosyltransferase 5 in the colon. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 22, p. 12841–12846, 28 out. 2003.
- DUPRESSOIR, A.; LAVIALLE, C.; HEIDMANN, T. From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytins in placentation. **Placenta**, v. 33, n. 9, p. 663–671, set. 2012.
- EASTY, D. J. et al. Up-regulation of ephrin-A1 during melanoma progression. **International Journal of Cancer**, v. 84, n. 5, p. 494–501, 22 out. 1999.
- EJTHADI, H. D. et al. A novel multiplex RT-PCR system detects human endogenous retrovirus-K in breast cancer. **Archives of Virology**, v. 150, n. 1, p. 177–184, jan. 2005.
- EKSTRÖM-SMEDBY, K. Epidemiology and etiology of non-Hodgkin lymphoma--a review. **Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)**, v. 45, n. 3, p. 258–271, 2006.
- EMOTO, H. et al. Structure and expression of human fibroblast growth factor-10. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 37, p. 23191–23194, 12 set. 1997.
- ESPARZA, S. D.; SAKAMOTO, K. M. Topics in Pediatric Leukemia – Acute Lymphoblastic Leukemia. **Medscape General Medicine**, v. 7, n. 1, p. 23, 25 fev. 2005.
- ESTELLER, M. Non-coding RNAs in human disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 12, p. 861–874, dez. 2011.
- FENG, H. et al. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. **Science (New York, N.Y.)**, v. 319, n. 5866, p. 1096–1100, 22 fev. 2008.
- FERREIRA, J. L. DE P. et al. Evaluation of genotypic prediction of HIV-1 tropism using population sequencing of replicates. **Journal of Virological Methods**, v. 179, n. 2, p. 325–329, fev. 2012.
- FERRERI, A. J. M.; ERNBERG, I.; COPIE-BERGMAN, C. Infectious agents and lymphoma development: molecular and clinical aspects. **Journal of Internal Medicine**, v. 265, n. 4, p. 421–438, abr. 2009.

- FLAVELL, K. J.; MURRAY, P. G. Hodgkin's disease and the Epstein-Barr virus. **Molecular Pathology**, v. 53, n. 5, p. 262–269, out. 2000.
- FRANK, O. et al. Variable transcriptional activity of endogenous retroviruses in human breast cancer. **Journal of Virology**, v. 82, n. 4, p. 1808–1818, fev. 2008.
- FUCHS, N. V. et al. Human endogenous retrovirus K (HML-2) RNA and protein expression is a marker for human embryonic and induced pluripotent stem cells. **Retrovirology**, v. 10, p. 115, 2013.
- GALLI, U. M. et al. Human endogenous retrovirus rec interferes with germ cell development in mice and may cause carcinoma in situ, the predecessor lesion of germ cell tumors. **Oncogene**, v. 24, n. 19, p. 3223–3228, 28 abr. 2005.
- GASENT BLESÁ, J.; CANDEL, V. Cell–cell fusion as a potential target in cancer therapy. **ecancermedicalsecience**, v. 3, 6 ago. 2009.
- GHANBARIAN, A. T.; HURST, L. D. Neighboring genes show correlated evolution in gene expression. **Molecular Biology and Evolution**, p. msv053, 4 mar. 2015.
- GILBERT, C. et al. Parallel Germline Infiltration of a Lentivirus in Two Malagasy Lemurs. **PLOS Genet**, v. 5, n. 3, p. e1000425, 20 mar. 2009.
- GIMENEZ, J. et al. Custom human endogenous retroviruses dedicated microarray identifies self-induced HERV-W family elements reactivated in testicular cancer upon methylation control. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 7, p. 2229–2246, abr. 2010.
- Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition - acspc-044738.pdf**. , [s.d.]. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-044738.pdf>>. Acesso em: 2 mar. 2016
- Globocan 2012 - Home**. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>>. Acesso em: 3 mar. 2016.
- GOERING, W. et al. Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) activity in prostate cancer is dominated by a few loci. **The Prostate**, v. 75, n. 16, p. 1958–1971, 1 dez. 2015.
- GÓMEZ, S. et al. DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights. **Epigenomics**, v. 7, n. 7, p. 1137–1153, out. 2015.
- GRIFFITHS, D. J. Endogenous retroviruses in the human genome sequence. **Genome Biology**, v. 2, n. 6, p. reviews1017.1-reviews1017.5, 2001.
- GRULICH, A. E. et al. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. **Lancet (London, England)**, v. 370, n. 9581, p. 59–67, 7 jul. 2007.
- GUILLEMOT, F.; ZIMMER, C. From cradle to grave: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. **Neuron**, v. 71, n. 4, p. 574–588, 25 ago. 2011.
- GUTTMAN, M. et al. lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. **Nature**, v. 477, n. 7364, p. 295–300, 15 set. 2011.

- HAASE, G. M.; PEREZ, C.; ATKINSON, J. B. Current aspects of biology, risk assessment, and treatment of neuroblastoma. **Seminars in Surgical Oncology**, v. 16, n. 2, p. 91–104, mar. 1999.
- HAFNER, C. et al. Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 490–499, mar. 2004.
- HAHN, S. et al. Serological response to human endogenous retrovirus K in melanoma patients correlates with survival probability. **AIDS research and human retroviruses**, v. 24, n. 5, p. 717–723, maio 2008.
- HAMMOND, D. et al. Melanoma-associated mutations in protein phosphatase 6 cause chromosome instability and DNA damage owing to dysregulated Aurora-A. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. Pt 15, p. 3429–3440, 1 ago. 2013.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.
- HARAGUCHI, S.; GOOD, R. A.; DAY-GOOD, N. K. A potent immunosuppressive retroviral peptide: cytokine patterns and signaling pathways. **Immunologic Research**, v. 41, n. 1, p. 46–55, 2008.
- HÄSLER, J.; STRUB, K. Alu elements as regulators of gene expression. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 19, p. 5491–5497, nov. 2006.
- HATA, L. et al. Zinc-finger protein 90 negatively regulates neuron-restrictive silencer factor-mediated transcriptional repression of fetal cardiac genes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 50, n. 6, p. 972–981, jun. 2011.
- HECK, J. E. et al. The epidemiology of neuroblastoma: a review. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 23, n. 2, p. 125–143, mar. 2009.
- HENRICH, K.-O.; SCHWAB, M.; WESTERMANN, F. 1p36 tumor suppression—a matter of dosage? **Cancer Research**, v. 72, n. 23, p. 6079–6088, 1 dez. 2012.
- HERBST, H. et al. Human endogenous retrovirus (HERV)-K transcripts in germ cell and trophoblastic tumours. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 106, n. 1, p. 216–220, jan. 1998.
- HERO, B. et al. Localized Infant Neuroblastomas Often Show Spontaneous Regression: Results of the Prospective Trials NB95-S and NB97. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 9, p. 1504–1510, 20 mar. 2008.
- HERV genome browser**. Disponível em: <<http://herv.pparser.net/GenomeBrowser.php>>. Acesso em: 3 mar. 2016.
- HEYNE, K. et al. Np9, a cellular protein of retroviral ancestry restricted to human, chimpanzee and gorilla, binds and regulates ubiquitin ligase MDM2. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 14, n. 16, p. 2619–2633, 2015.
- HICAR, M. D. et al. Structure of the human zinc finger protein HIVEP3: molecular cloning, expression, exon-intron structure, and comparison with paralogous genes HIVEP1 and HIVEP2. **Genomics**, v. 71, n. 1, p. 89–100, 1 jan. 2001.

HIRSCHL, S. et al. Sequence variability of retroviral particles derived from human melanoma cells melanoma-associated retrovirus. **Virus Research**, v. 123, n. 2, p. 211–215, fev. 2007.

HOLDER, B. S. et al. Syncytin 1 in the human placenta. **Placenta**, v. 33, n. 6, p. 460–466, jun. 2012.

HORNER, T. J. et al. Phosphorylation of GRK1 and GRK7 by cAMP-dependent protein kinase attenuates their enzymatic activities. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 31, p. 28241–28250, 5 ago. 2005.

HUH, J.-W. et al. Transcriptional regulation of GSDML gene by antisense-oriented HERV-H LTR element. **Archives of Virology**, v. 153, n. 6, p. 1201–1205, 2008.

ICTV Code of Virus Classification. Disponível em:

<<http://www.ictvonline.org/codeOfVirusClassification.asp>>. Acesso em: 2 mar. 2016.

ISCHENKO, I. et al. Cancer stem cells: how can we target them? **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 30, p. 3171–3184, 2008.

IWABUCHI, H. et al. A gene homologous to human endogenous retrovirus overexpressed in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & Lymphoma**, v. 45, n. 11, p. 2303–2306, nov. 2004.

JACKSON, M. et al. Severe global DNA hypomethylation blocks differentiation and induces histone hyperacetylation in embryonic stem cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 20, p. 8862–8871, out. 2004.

JACQUET, H. PRODH mutations and hyperprolinemia in a subset of schizophrenic patients. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 19, p. 2243–2249, 15 set. 2002.

JACQUET, H. et al. Hyperprolinemia is a risk factor for schizoaffective disorder. **Molecular Psychiatry**, v. 10, n. 5, p. 479–485, 19 out. 2004.

JANUSZKIEWICZ-LEWANDOWSKA, D. et al. Env gene expression of human endogenous retrovirus-k and human endogenous retrovirus-w in childhood acute leukemia cells. **Acta Haematologica**, v. 129, n. 4, p. 232–237, 2013.

JERN, P. et al. Sequence variability, gene structure, and expression of full-length human endogenous retrovirus H. **Journal of Virology**, v. 79, n. 10, p. 6325–6337, maio 2005.

KAATSCH, P. Epidemiology of childhood cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 36, n. 4, p. 277–285, jun. 2010.

KALOGERIS, T. et al. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. **International review of cell and molecular biology**, v. 298, p. 229–317, 2012.

KAMIJO, T. Role of stemness-related molecules in neuroblastoma. **Pediatric Research**, v. 71, n. 4–2, p. 511–515, abr. 2012.

KANG, M.-I. et al. Transitional CpG methylation between promoters and retroelements of tissue-specific genes during human mesenchymal cell differentiation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 102, n. 1, p. 224–239, 1 set. 2007.

- KAPUSTA, A. et al. Transposable Elements Are Major Contributors to the Origin, Diversification, and Regulation of Vertebrate Long Noncoding RNAs. **PLOS Genet**, v. 9, n. 4, p. e1003470, 25 abr. 2013.
- KATO, H. et al. Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes increases susceptibility to ultraviolet-B-induced carcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 365, n. 2, p. 223–228, 1 set. 2015.
- KATOH, I. Impacts of Endogenous Retroviruses on Tumorigenesis, Immunity, Stem Cells, and Research Safety. **Frontiers in Oncology**, v. 4, 31 mar. 2014.
- KATZOURAKIS, A. et al. Discovery and analysis of the first endogenous lentivirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 15, p. 6261–6265, 4 out. 2007.
- KAUFMAN, L. et al. Sidekick-1 is upregulated in glomeruli in HIV-associated nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 15, n. 7, p. 1721–1730, jul. 2004.
- KELLEY, J.; WALTER, L.; TROWSDALE, J. Comparative Genomics of Natural Killer Cell Receptor Gene Clusters. **PLOS Genet**, v. 1, n. 2, p. e27, 26 ago. 2005.
- KERSHAW, M. H. et al. Immunization against endogenous retroviral tumor-associated antigens. **Cancer Research**, v. 61, n. 21, p. 7920–7924, 1 nov. 2001.
- KESSLER, A. F. et al. Expression-analysis of the human endogenous retrovirus HERV-K in human astrocytic tumors. **BMC research notes**, v. 7, p. 159, 2014.
- KHODOSEVICH, K.; LEBEDEV, Y.; SVERDLOV, E. D. Large-scale determination of the methylation status of retrotransposons in different tissues using a methylation tags approach. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 3, p. e31, 2004.
- KIM, J.; KLIONSKY, D. J. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p. 303–342, 2000.
- KIM, K. W.; CHUNG, D. H. Abstract 5283: Autophagy regulation of angiogenesis in human neuroblastoma. **Cancer Research**, v. 72, n. 8 Supplement, p. 5283–5283, 15 abr. 2012.
- KIM, Y.-H. et al. Novel Combination Markers for Predicting Survival in Patients with Muscle Invasive Bladder Cancer: USP18 and DGCR2. **Journal of Korean Medical Science**, v. 29, n. 3, p. 351–356, mar. 2014.
- KIVIPÖLD, P. et al. DAXX modulates human papillomavirus early gene expression and genome replication in U2OS cells. **Virology Journal**, v. 12, p. 104, 2015.
- KLEIBER, M. L.; SINGH, S. M. Divergence of the vertebrate sp1A/ryanodine receptor domain and SOCS box-containing (Spsb) gene family and its expression and regulation within the mouse brain. **Genomics**, v. 93, n. 4, p. 358–366, abr. 2009.
- KLUG, A. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 79, p. 213–231, 2010.
- KOIKE, T. et al. Identification of Phosphatase That Dephosphorylates Xylose in the Glycosaminoglycan-Protein Linkage Region of Proteoglycans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 10, p. 6695–6708, 7 mar. 2014.

- KONDO, Y. et al. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 9, p. 726–734, set. 2005.
- KOVALSKAYA, E. et al. Functional human endogenous retroviral LTR transcription start sites are located between the R and U5 regions. **Virology**, v. 346, n. 2, p. 373–378, 15 mar. 2006.
- KRAMÁROVÁ, E.; STILLER, C. A. The international classification of childhood cancer. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 68, n. 6, p. 759–765, 11 dez. 1996.
- KURIHARA, S. et al. Clinical features of ATRX or DAXX mutated neuroblastoma. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 49, n. 12, p. 1835–1838, dez. 2014.
- KWAN, M. L. et al. Breastfeeding and the risk of childhood leukemia: a meta-analysis. **Public Health Reports**, v. 119, n. 6, p. 521–535, 2004.
- LABRECQUE, M. P. et al. A TRIP230-Retinoblastoma Protein Complex Regulates Hypoxia-Inducible Factor-1 α -Mediated Transcription and Cancer Cell Invasion. **PLOS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99214, 11 jun. 2014.
- LAITY, J. H.; LEE, B. M.; WRIGHT, P. E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, n. 1, p. 39–46, fev. 2001.
- LAN, J. et al. DNA methyltransferases and methyl-binding proteins of mammals. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 42, n. 4, p. 243–252, 1 abr. 2010.
- LANDER, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860–921, 15 fev. 2001.
- LANGE, R. et al. Developmentally regulated mouse gene NK10 encodes a zinc finger repressor protein with differential DNA-binding domains. **DNA and cell biology**, v. 14, n. 11, p. 971–981, nov. 1995.
- LARSEN, J. M. et al. Syncytin immunoreactivity in colorectal cancer: potential prognostic impact. **Cancer Letters**, v. 280, n. 1, p. 44–49, 18 jul. 2009.
- LARSSON, L.-I.; HOLCK, S.; CHRISTENSEN, I. J. Prognostic role of syncytin expression in breast cancer. **Human Pathology**, v. 38, n. 5, p. 726–731, maio 2007.
- LAUFER, G. et al. Analysis of transcribed human endogenous retrovirus W env loci clarifies the origin of multiple sclerosis-associated retrovirus envsequences. **Retrovirology**, v. 6, p. 37, 2009.
- LAVIE, L. et al. CpG methylation directly regulates transcriptional activity of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2). **Journal of Virology**, v. 79, n. 2, p. 876–883, jan. 2005.
- LAWSON, D. A. et al. Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 131–135, 1 out. 2015.
- LI, D.; HE, L. Association study of the G-protein signaling 4 (RGS4) and proline dehydrogenase (PRODH) genes with schizophrenia: a meta-analysis. **European Journal of Human Genetics**, v. 14, n. 10, p. 1130–1135, 21 jun. 2006.
- LI, F. et al. A systematic evaluation of expression of HERV-W elements; influence of genomic context, viral structure and orientation. **BMC Genomics**, v. 12, p. 22, 2011.

- LI, L. et al. Role of human noncoding RNAs in the control of tumorigenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 31, p. 12956–12961, 8 abr. 2009a.
- LI, M.; LIU, G.-H.; IZPISUA BELMONTE, J. C. Navigating the epigenetic landscape of pluripotent stem cells. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 8, p. 524–535, ago. 2012.
- LI, S. et al. EphA6 promotes angiogenesis and prostate cancer metastasis and is associated with human prostate cancer progression. **Oncotarget**, v. 6, n. 26, p. 22587–22597, 27 maio 2015a.
- LI, S. et al. The 1p36 Tumor Suppressor KIF 1B β Is Required for Calcineurin Activation, Controlling Mitochondrial Fission and Apoptosis. **Developmental Cell**, v. 36, n. 2, p. 164–178, 25 jan. 2016.
- LI, Y. et al. KIFC1 is a novel potential therapeutic target for breast cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 16, n. 9, p. 1316–1322, 2 set. 2015b.
- LI, Z. D. et al. Identification and characterization of human ARIP2 and its relation to breast cancer. **Cytokine**, v. 46, n. 2, p. 251–259, maio 2009b.
- LINDESKOG, M.; BLOMBERG, J. Spliced human endogenous retroviral HERV-H env transcripts in T-cell leukaemia cell lines and normal leukocytes: alternative splicing pattern of HERV-H transcripts. **The Journal of General Virology**, v. 78 (Pt 10), p. 2575–2585, out. 1997.
- LINDESKOG, M.; MAGER, D. L.; BLOMBERG, J. Isolation of a human endogenous retroviral HERV-H element with an open env reading frame. **Virology**, v. 258, n. 2, p. 441–450, 5 jun. 1999.
- LIU, A.; YU, X.; LIU, S. Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference. **Chinese Journal of Cancer**, v. 32, n. 9, p. 483–487, set. 2013.
- LIU, H. et al. Down-regulation of autophagy-related protein 5 (ATG5) contributes to the pathogenesis of early-stage cutaneous melanoma. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 202, p. 202ra123, 11 set. 2013a.
- LIU, M. et al. Scanning of novel cancer/testis proteins by human testis proteomic analysis. **PROTEOMICS**, v. 13, n. 7, p. 1200–1210, 1 abr. 2013b.
- LIU, W.; PHANG, J. M. Proline dehydrogenase (oxidase), a mitochondrial tumor suppressor, and autophagy under the hypoxia microenvironment. **Autophagy**, v. 8, n. 9, p. 1407–1409, 14 set. 2012.
- LÖWER, R. et al. Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses. **The Journal of General Virology**, v. 65 (Pt 5), p. 887–898, maio 1984.
- LÖWER, R.; LÖWER, J.; KURTH, R. The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 11, p. 5177–5184, 28 maio 1996.
- LU, X. et al. The retrovirus HERVH is a long noncoding RNA required for human embryonic stem cell identity. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 21, n. 4, p. 423–425, abr. 2014.
- MACFARLANE, C. M.; BADGE, R. M. Genome-wide amplification of proviral sequences reveals new polymorphic HERV-K(HML-2) proviruses in humans and chimpanzees that are absent from genome assemblies. **Retrovirology**, v. 12, p. 35, 2015.

- MALIK, N. et al. Identification of the mammalian Na,K-ATPase 3 subunit. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 37, p. 22754–22758, 13 set. 1996.
- MALIK, N. et al. Structural organization and chromosomal localization of the human Na,K-ATPase beta 3 subunit gene and pseudogene. **Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society**, v. 9, n. 2, p. 136–143, fev. 1998.
- MALINIEMI, P. et al. Expression of human endogenous retrovirus-w including syncytin-1 in cutaneous T-cell lymphoma. **PloS One**, v. 8, n. 10, p. e76281, 2013a.
- MALINIEMI, P. et al. Expression of human endogenous retrovirus-w including syncytin-1 in cutaneous T-cell lymphoma. **PloS One**, v. 8, n. 10, p. e76281, 2013b.
- MANGENEY, M. et al. The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties. **The Journal of General Virology**, v. 82, n. Pt 10, p. 2515–2518, out. 2001.
- MANGENEY, M. et al. Endogenous retrovirus expression is required for murine melanoma tumor growth in vivo. **Cancer Research**, v. 65, n. 7, p. 2588–2591, 1 abr. 2005.
- MANGENEY, M.; HEIDMANN, T. Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 25, p. 14920–14925, 8 dez. 1998a.
- MANGENEY, M.; HEIDMANN, T. Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 25, p. 14920–14925, 8 dez. 1998b.
- MANTINA, H. et al. Vertical transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 94, n. 5, p. 749–752, 1 dez. 2001.
- MARTIN, J. N.; OSMOND, D. H. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and sexual transmission of cancer risk. **Current Opinion in Oncology**, v. 11, n. 6, p. 508–515, nov. 1999.
- MASCHIETTO, M. et al. Temporal blastemal cell gene expression analysis in the kidney reveals new Wnt and related signaling pathway genes to be essential for Wilms' tumor onset. **Cell Death & Disease**, v. 2, n. 11, p. e224, nov. 2011.
- MATHEW, P. et al. Detection of MYCN Gene Amplification in Neuroblastoma by Fluorescence In Situ Hybridization: A Pediatric Oncology Group Study. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 3, n. 2, p. 105–109, mar. 2001.
- MATOUSKOVÁ, M. et al. CpG methylation suppresses transcriptional activity of human syncytin-1 in non-placental tissues. **Experimental Cell Research**, v. 312, n. 7, p. 1011–1020, 15 abr. 2006.
- MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). **Retrovirology**, v. 2, p. 27, 26 abr. 2005.
- MATTHAY, K. K. et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 16, p. 1165–1173, 14 out. 1999.

- MAYER, J.; MEESE, E. Human endogenous retroviruses in the primate lineage and their influence on host genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, n. 1–4, p. 448–456, 2005.
- MCDAID, C. et al. Systematic review of effectiveness of different treatments for childhood retinoblastoma. **Health Technology Assessment (Winchester, England)**, v. 9, n. 48, p. iii, ix–x, 1–145, dez. 2005.
- MEDSTRAND, P. et al. Impact of transposable elements on the evolution of mammalian gene regulation. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, n. 1–4, p. 342–352, 2005.
- MEDSTRAND, P.; LANDRY, J. R.; MAGER, D. L. Long terminal repeats are used as alternative promoters for the endothelin B receptor and apolipoprotein C-I genes in humans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 3, p. 1896–1903, 19 jan. 2001.
- MEDSTRAND, P.; VAN DE LAGEMAAT, L. N.; MAGER, D. L. Retroelement distributions in the human genome: variations associated with age and proximity to genes. **Genome Research**, v. 12, n. 10, p. 1483–1495, out. 2002.
- MERCHENTHALER, I. Galanin and the neuroendocrine axes. **EXS**, v. 102, p. 71–85, 2010.
- MESRI, M. et al. Identification and Characterization of Angiogenesis Targets through Proteomic Profiling of Endothelial Cells in Human Cancer Tissues. **PLOS ONE**, v. 8, n. 11, p. e78885, 13 nov. 2013.
- MEYERHANS, A.; VARTANIAN, J. P.; WAIN-HOBSON, S. DNA recombination during PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 7, p. 1687–1691, 11 abr. 1990.
- MI, S. et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. **Nature**, v. 403, n. 6771, p. 785–789, 17 fev. 2000.
- MITTAL, K. et al. A centrosome clustering protein, KIFC1, predicts aggressive disease course in serous ovarian adenocarcinomas. **Journal of Ovarian Research**, v. 9, n. 1, p. 17, 2016.
- MONAJEMZADEH, M. et al. Expression and prognostic significance of Oct4 and Nanog in neuroblastoma. **APMIS**, v. 122, n. 9, p. 734–741, 1 set. 2014.
- MONCLAIR, T. et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System: An INRG Task Force Report. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 2, p. 298–303, 10 jan. 2009.
- MONORANU, C. M. et al. pH measurement as quality control on human post mortem brain tissue: a study of the BrainNet Europe consortium. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 35, n. 3, p. 329–337, jun. 2009.
- MOORE, P. S.; CHANG, Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. **Nature Reviews. Cancer**, v. 10, n. 12, p. 878–889, dez. 2010.
- MORI, N. et al. A common silencer element in the SCG10 and type II Na⁺ channel genes binds a factor present in nonneuronal cells but not in neuronal cells. **Neuron**, v. 9, n. 1, p. 45–54, jul. 1992.
- MOSSÉ, Y. P. et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 930–935, 16 out. 2008.

- MULLINS, C. S.; LINNEBACHER, M. Endogenous retrovirus sequences as a novel class of tumor-specific antigens: an example of HERV-H env encoding strong CTL epitopes. **Cancer immunology, immunotherapy: CII**, v. 61, n. 7, p. 1093–1100, jul. 2012.
- MUSTER, T. et al. An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells. **Cancer Research**, v. 63, n. 24, p. 8735–8741, 15 dez. 2003.
- NAGAYOSHI, K. et al. Galanin plays an important role in cancer invasiveness and is associated with poor prognosis in stage II colorectal cancer. **Oncology Reports**, v. 33, n. 2, p. 539–546, fev. 2015.
- NELLÅKER, C. et al. Transactivation of elements in the human endogenous retrovirus W family by viral infection. **Retrovirology**, v. 3, p. 44, 2006.
- NELLÅKER, C. et al. Expression profiling of repetitive elements by melting temperature analysis: variation in HERV-W gag expression across human individuals and tissues. **BMC Genomics**, v. 10, p. 532, 2009.
- NEMOTO, Y.; DE CAMILLI, P. Recruitment of an alternatively spliced form of synaptojanin 2 to mitochondria by the interaction with the PDZ domain of a mitochondrial outer membrane protein. **The EMBO journal**, v. 18, n. 11, p. 2991–3006, 1 jun. 1999.
- NISHIMURA, E. et al. Decrease in neuron-restrictive silencer factor (NRSF) mRNA levels during differentiation of cultured neuroblastoma cells. **Neuroscience Letters**, v. 211, n. 2, p. 101–104, 21 jun. 1996.
- O'DONOGHUE, K.; FISK, N. M. Fetal stem cells. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 18, n. 6, p. 853–875, dez. 2004.
- OHNUKI, M. et al. Dynamic regulation of human endogenous retroviruses mediates factor-induced reprogramming and differentiation potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 34, p. 12426–12431, 26 ago. 2014.
- ONO, M.; KAWAKAMI, M.; USHIKUBO, H. Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D. **Journal of Virology**, v. 61, n. 6, p. 2059–2062, jun. 1987.
- OTTAVIANI, G.; JAFFE, N. The epidemiology of osteosarcoma. **Cancer Treatment and Research**, v. 152, p. 3–13, 2009.
- PAQUETTE, A. J.; PEREZ, S. E.; ANDERSON, D. J. Constitutive expression of the neuron-restrictive silencer factor (NRSF)/REST in differentiating neurons disrupts neuronal gene expression and causes axon pathfinding errors in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 22, p. 12318–12323, 24 out. 2000.
- PARK, J. R.; EGGERT, A.; CARON, H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. **Pediatric Clinics of North America**, v. 55, n. 1, p. 97–120, x, fev. 2008.
- PARKIN, D. M. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 118, n. 12, p. 3030–3044, 15 jun. 2006.

- PATIL, A. A. et al. Cross-species analysis of the mammalian β -defensin gene family: presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract. **Physiological Genomics**, v. 23, n. 1, p. 5–17, 21 set. 2005.
- PAWAR, S. et al. KIFCI, a novel putative prognostic biomarker for ovarian adenocarcinomas: delineating protein interaction networks and signaling circuitries. **Journal of Ovarian Research**, v. 7, p. 53, 2014.
- PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD. Neuroblastoma Treatment (PDQ®): Health Professional Version. In: **PDQ Cancer Information Summaries**. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US), 2002.
- PEARSON, A. D. J. et al. High-dose rapid and standard induction chemotherapy for patients aged over 1 year with stage 4 neuroblastoma: a randomised trial. **The Lancet. Oncology**, v. 9, n. 3, p. 247–256, mar. 2008.
- PERL, A. et al. Endogenous retroviral pathogenesis in lupus. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 22, n. 5, p. 483–492, set. 2010.
- PERRON, H. et al. Human endogenous retrovirus (HERV)-W ENV and GAG proteins: physiological expression in human brain and pathophysiological modulation in multiple sclerosis lesions. **Journal of Neurovirology**, v. 11, n. 1, p. 23–33, fev. 2005.
- PERRON, H. et al. Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. **Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)**, v. 18, n. 12, p. 1721–1736, dez. 2012.
- PERRON, H.; LANG, A. The human endogenous retrovirus link between genes and environment in multiple sclerosis and in multifactorial diseases associating neuroinflammation. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 39, n. 1, p. 51–61, ago. 2010.
- PFISTER, S. et al. Outcome Prediction in Pediatric Medulloblastoma Based on DNA Copy-Number Aberrations of Chromosomes 6q and 17q and the MYC and MYCN Loci. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 10, p. 1627–1636, 23 fev. 2009.
- PHANG, J. M. et al. The metabolism of proline, a stress substrate, modulates carcinogenic pathways. **Amino Acids**, v. 35, n. 4, p. 681–690, 10 abr. 2008.
- PIPINIKAS, C. P. et al. Epigenetic dysregulation and poorer prognosis in DAXX-deficient pancreatic neuroendocrine tumours. **Endocrine-Related Cancer**, v. 22, n. 3, p. L13-18, jun. 2015.
- PIZZO, P. A.; POPLACK, D. G. **Principles and Practice of Pediatric Oncology**. [s.l.] Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
- POIESZ, B. J. et al. Prevalence of HTLV-I-associated T-cell lymphoma. **American Journal of Hematology**, v. 66, n. 1, p. 32–38, jan. 2001.
- POMEROY, S. L. et al. Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 436–442, 24 jan. 2002.
- PONTING, C. P.; OLIVER, P. L.; REIK, W. Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 629–641, 20 fev. 2009.

Portal - Instituto Nacional de Câncer - INCA. , [s.d.]. Disponível em:

<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acesso em: 2 mar. 2016

Prism - graphpad.com. Disponível em: <<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>>.

Acesso em: 3 mar. 2016.

PubMed Central Link. , [s.d.]. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC51501/>>. Acesso em: 3 mar. 2016

PUTO, L. A.; BROGNARD, J.; HUNTER, T. Transcriptional Repressor DAXX Promotes Prostate Cancer Tumorigenicity via Suppression of Autophagy. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 25, p. 15406–15420, 19 jun. 2015.

PYO, J.-O. et al. Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 21, p. 20722–20729, 27 maio 2005.

QIN, G. et al. Combined overexpression of HIVEP3 and SOX9 predicts unfavorable biochemical recurrence-free survival in patients with prostate cancer. **OncoTargets and therapy**, v. 7, p. 137–146, 24 jan. 2014.

RANGWALA, S. H.; ZHANG, L.; KAZAZIAN, H. H. Many LINE1 elements contribute to the transcriptome of human somatic cells. **Genome Biology**, v. 10, n. 9, p. R100, 2009.

REISS, D.; ZHANG, Y.; MAGER, D. L. Widely variable endogenous retroviral methylation levels in human placenta. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 14, p. 4743–4754, jul. 2007.

REITER, A. Diagnosis and treatment of childhood non-hodgkin lymphoma. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, p. 285–296, 2007.

RepeatMasker Home Page. Disponível em: <<http://www.repeatmasker.org/>>. Acesso em: 10 abr. 2016.

RESCORLA, F. J. Pediatric germ cell tumors. **Seminars in Surgical Oncology**, v. 16, n. 2, p. 144–158, mar. 1999.

RHYU, D.-W. et al. Expression of human endogenous retrovirus env genes in the blood of breast cancer patients. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 6, p. 9173–9183, 2014.

RICCI, M. S.; ZONG, W.-X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **The Oncologist**, v. 11, n. 4, p. 342–357, abr. 2006.

RISSE, R.; HOROWITZ, J. M.; MCCUBREY, J. Endogenous mouse leukemia viruses. **Annual Review of Genetics**, v. 17, p. 85–121, 1983.

ROBBEZ-MASSON, L.; ROWE, H. M. Retrotransposons shape species-specific embryonic stem cell gene expression. **Retrovirology**, v. 12, p. 45, 2015.

ROBERTS, S. S.; CHOU, A. J.; CHEUNG, N.-K. V. Immunotherapy of Childhood Sarcomas. **Frontiers in Oncology**, v. 5, p. 181, 2015.

- RODA-NAVARRO, P. et al. Human KLRF1, a novel member of the killer cell lectin-like receptor gene family: molecular characterization, genomic structure, physical mapping to the NK gene complex and expression analysis. **European Journal of Immunology**, v. 30, n. 2, p. 568–576, 1 fev. 2000.
- RODA-NAVARRO, P. et al. Molecular characterization of two novel alternative spliced variants of the KLRF1 gene and subcellular distribution of KLRF1 isoforms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v. 1520, n. 2, p. 141–146, 30 ago. 2001.
- ROEBKE, C. et al. An N-terminally truncated envelope protein encoded by a human endogenous retrovirus W locus on chromosome Xq22.3. **Retrovirology**, v. 7, p. 69, 2010.
- ROMAN-GOMEZ, J. et al. Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia. **Oncogene**, v. 24, n. 48, p. 7213–7223, 3 nov. 2005.
- ROMANO, C. M.; DE MELO, F. L.; DE A ZANOTTO, P. M. Preferential expression of human endogenous retrovirus K (HERV-K/HML-2) type 1 in tumor cells. **Retrovirology**, v. 8, n. Suppl 1, p. A216, 6 jun. 2011.
- ROMANO, C. M.; RAMALHO, R. F.; ZANOTTO, P. M. DE A. Tempo and mode of ERV-K evolution in human and chimpanzee genomes. **Archives of Virology**, v. 151, n. 11, p. 2215–2228, nov. 2006.
- RUPRECHT, K. et al. Human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2) RNA transcripts are selectively packaged into retroviral particles produced by the human germ cell tumor line Tera-1 and originate mainly from a provirus on chromosome 22q11.21. **Journal of Virology**, v. 82, n. 20, p. 10008–10016, out. 2008a.
- RUPRECHT, K. et al. Endogenous retroviruses and cancer. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 65, n. 21, p. 3366–3382, nov. 2008b.
- RYAN, F. . Human Endogenous Retroviruses in Multiple Sclerosis: Potential for Novel Neuro-Pharmacological Research. **Current Neuropharmacology**, v. 9, n. 2, p. 360–369, jun. 2011.
- RYCAJ, K. et al. Cytotoxicity of human endogenous retrovirus K-specific T cells toward autologous ovarian cancer cells. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 21, n. 2, p. 471–483, 15 jan. 2015.
- SANTONI, F. A.; GUERRA, J.; LUBAN, J. HERV-H RNA is abundant in human embryonic stem cells and a precise marker for pluripotency. **Retrovirology**, v. 9, p. 111, 2012.
- SCHIAVETTI, F. et al. A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes. **Cancer Research**, v. 62, n. 19, p. 5510–5516, 1 out. 2002.
- SCHIRMER, M. et al. Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 6, p. e37–e37, 31 mar. 2015.
- SCHMITT, K. et al. Transcriptional profiling of human endogenous retrovirus group HERV-K(HML-2) loci in melanoma. **Genome Biology and Evolution**, v. 5, n. 2, p. 307–328, 2013a.
- SCHMITT, K. et al. Comprehensive Analysis of Human Endogenous Retrovirus Group HERV-W Locus Transcription in Multiple Sclerosis Brain Lesions by High-Throughput Amplicon Sequencing. **Journal of Virology**, v. 87, n. 24, p. 13837–13852, 15 dez. 2013b.

- SCHMITT, K. et al. HERV-K(HML-2) rec and np9 transcripts not restricted to disease but present in many normal human tissues. **Mobile DNA**, v. 6, p. 4, 2015.
- SCHÖN, U. et al. Cell type-specific expression and promoter activity of human endogenous retroviral long terminal repeats. **Virology**, v. 279, n. 1, p. 280–291, 5 jan. 2001.
- SCHÖNHERR, C. et al. Anaplastic lymphoma kinase activates the small GTPase Rap1 via the Rap1-specific GEF C3G in both neuroblastoma and PC12 cells. **Oncogene**, v. 29, n. 19, p. 2817–2830, 13 maio 2010.
- SCHWAB, M.; PRAML, C.; AMLER, L. C. Genomic instability in 1p and human malignancies. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 16, n. 4, p. 211–229, ago. 1996.
- SEKINE, K. et al. Fgf10 is essential for limb and lung formation. **Nature Genetics**, v. 21, n. 1, p. 138–141, jan. 1999.
- SEYED-AHADI, M.-M. et al. Wilms' tumor: a 10 year retrospective study. **Archives of Iranian Medicine**, v. 10, n. 1, p. 65–69, jan. 2007.
- SHI, X. et al. Foxk1 promotes cell proliferation and represses myogenic differentiation by regulating Foxo4 and Mef2. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. Pt 22, p. 5329–5337, 15 nov. 2012.
- SHIMADA, H. et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). **Cancer**, v. 86, n. 2, p. 364–372, 15 jul. 1999.
- SIMON, T. et al. New definition of low-risk neuroblastoma using stage, age, and 1p and MYCN status. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 26, n. 12, p. 791–796, dez. 2004.
- SIMPSON, G. R. et al. Endogenous D-type (HERV-K) related sequences are packaged into retroviral particles in the placenta and possess open reading frames for reverse transcriptase. **Virology**, v. 222, n. 2, p. 451–456, 15 ago. 1996.
- SINGH, S. et al. Human endogenous retrovirus K (HERV-K) rec mRNA is expressed in primary melanoma but not in benign naevi or normal skin. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 26, n. 3, p. 426–428, maio 2013.
- SJØTTEM, E.; ANDERSEN, S.; JOHANSEN, T. The promoter activity of long terminal repeats of the HERV-H family of human retrovirus-like elements is critically dependent on Sp1 family proteins interacting with a GC/GT box located immediately 3' to the TATA box. **Journal of Virology**, v. 70, n. 1, p. 188–198, jan. 1996.
- SŁABICKI, M. et al. A Genome-Scale DNA Repair RNAi Screen Identifies SPG48 as a Novel Gene Associated with Hereditary Spastic Paraplegia. **PLOS Biol**, v. 8, n. 6, p. e1000408, 29 jun. 2010.
- SLIEKER, R. C. et al. DNA Methylation Landscapes of Human Fetal Development. **PLOS Genet**, v. 11, n. 10, p. e1005583, 22 out. 2015.
- SMOLEN, G. A. et al. A Rap GTPase interactor, RADIL, mediates migration of neural crest precursors. **Genes & Development**, v. 21, n. 17, p. 2131–2136, 1 set. 2007.
- SMYTH, R. P. et al. Reducing chimera formation during PCR amplification to ensure accurate genotyping. **Gene**, v. 469, n. 1–2, p. 45–51, dez. 2010.

- SQUIRE, R. et al. The relationship of class I MHC antigen expression to stage IV-S disease and survival in neuroblastoma. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 25, n. 4, p. 381–386, abr. 1990.
- STANTON F., R. M. K. **Tratado de Pediatria**. 18ª ed. [s.l.] Elsevier, 2009.
- STEFANSSON, B. et al. Protein phosphatase 6 regulatory subunits composed of ankyrin repeat domains. **Biochemistry**, v. 47, n. 5, p. 1442–1451, 5 fev. 2008.
- STELIAROVA-FOUCHER, E. et al. International Classification of Childhood Cancer, third edition. **Cancer**, v. 103, n. 7, p. 1457–1467, 1 abr. 2005.
- STILLER, C. A. Epidemiology and genetics of childhood cancer. **Oncogene**, v. 23, n. 38, p. 6429–6444, 23 ago. 2004.
- STOYE, J. P. Studies of endogenous retroviruses reveal a continuing evolutionary saga. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 395–406, jun. 2012.
- STRICK, R. et al. Proliferation and cell-cell fusion of endometrial carcinoma are induced by the human endogenous retroviral Syncytin-1 and regulated by TGF-beta. **Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)**, v. 85, n. 1, p. 23–38, jan. 2007.
- STRISSEL, P. L. et al. Reactivation of codogenic endogenous retroviral (ERV) envelope genes in human endometrial carcinoma and prestages: Emergence of new molecular targets. **Oncotarget**, v. 3, n. 10, p. 1204–1219, out. 2012.
- SUBRAMANIAN, R. P. et al. Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses. **Retrovirology**, v. 8, p. 90, 2011.
- SUGIMURA, H. et al. EPH-EHRIN in human gastrointestinal cancers. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 2, n. 12, p. 421–428, 15 dez. 2010.
- SUN, Y. et al. Expression of syncytin in leukemia and lymphoma cells. **Leukemia Research**, v. 34, n. 9, p. 1195–1202, set. 2010.
- SUTHERLAND, H. F. et al. Identification of a novel transcript disrupted by a balanced translocation associated with DiGeorge syndrome. **American Journal of Human Genetics**, v. 59, n. 1, p. 23–31, jul. 1996.
- SVERDLOV, E. D. Retroviruses and primate evolution. **BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, v. 22, n. 2, p. 161–171, fev. 2000.
- TAKAHASHI, Y. et al. Regression of human kidney cancer following allogeneic stem cell transplantation is associated with recognition of an HERV-E antigen by T cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 3, p. 1099–1109, 3 mar. 2008.
- TAKITA, J. et al. Aberrations of NEGR1 on 1p31 and MYEOV on 11q13 in neuroblastoma. **Cancer Science**, v. 102, n. 9, p. 1645–1650, set. 2011.
- TANG, M. et al. Disease mutant analysis identifies a new function of DAXX in telomerase regulation and telomere maintenance. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 2, p. 331–341, 15 jan. 2015.

- TANG, X. X. et al. High-level expression of EPHB6, EFNB2, and EFNB3 is associated with low tumor stage and high TrkA expression in human neuroblastomas. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 5, n. 6, p. 1491–1496, jun. 1999.
- TANG, X. X. et al. Implications of EPHB6, EFNB2, and EFNB3 expressions in human neuroblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 20, p. 10936–10941, 26 set. 2000a.
- TANG, X. X. et al. Prognostic significance of EPHB6, EFNB2, and EFNB3 expressions in neuroblastoma. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 35, n. 6, p. 656–658, dez. 2000b.
- TAUDIEN, S. et al. Polymorphic segmental duplications at 8p23.1 challenge the determination of individual defensin gene repertoires and the assembly of a contiguous human reference sequence. **BMC Genomics**, v. 5, p. 92, 2004.
- TAUDIEN, S. et al. Narrowing down the distal border of the copy number variable beta-defensin gene cluster on human 8p23. **BMC research notes**, v. 7, p. 93, 2014.
- TAY, S. K. H. et al. Studies of COX16, COX19, and PET191 in Human Cytochrome-c Oxidase Deficiency. **Archives of Neurology**, v. 61, n. 12, 1 dez. 2004.
- TAYLOR, M. D. et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. **Acta Neuropathologica**, v. 123, n. 4, p. 465–472, abr. 2012.
- THEODOROU, V. et al. Fgf10 is an oncogene activated by MMTV insertional mutagenesis in mouse mammary tumors and overexpressed in a subset of human breast carcinomas. **Oncogene**, v. 23, n. 36, p. 6047–6055, 12 ago. 2004.
- TING, C. N. et al. Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. **Genes & Development**, v. 6, n. 8, p. 1457–1465, ago. 1992.
- TOFIGHI, R. et al. Galanin decreases proliferation of PC12 cells and induces apoptosis via its subtype 2 receptor (GalR2). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 7, p. 2717–2722, 19 fev. 2008.
- TÖNJES, R. R. et al. HERV-K: the biologically most active human endogenous retrovirus family. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology: Official Publication of the International Retrovirology Association**, v. 13 Suppl 1, p. S261-267, 1996.
- TRISTEM, M. Identification and characterization of novel human endogenous retrovirus families by phylogenetic screening of the human genome mapping project database. **Journal of Virology**, v. 74, n. 8, p. 3715–3730, abr. 2000.
- UCSC Genome Bioinformatics: FAQ**. Disponível em: <<https://genome.ucsc.edu/FAQ/FAQblat.html>>. Acesso em: 3 mar. 2016.
- VAN DER KUYL, A. C. HIV infection and HERV expression: a review. **Retrovirology**, v. 9, p. 6, 2012.
- VENTER, J. C. et al. The sequence of the human genome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 291, n. 5507, p. 1304–1351, 16 fev. 2001.
- VERISSIMO, C. S. et al. Silencing of Doublecortin-Like (DCL) Results in Decreased Mitochondrial Activity and Delayed Neuroblastoma Tumor Growth. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, p. e75752, 26 set. 2013.

VERONE, A. R. et al. Androgen-responsive serum response factor target genes regulate prostate cancer cell migration. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 8, p. 1737–1746, ago. 2013.

VIVIER, E. et al. Functions of natural killer cells. **Nature Immunology**, v. 9, n. 5, p. 503–510, maio 2008.

WADEY, R. et al. Isolation of a gene encoding an integral membrane protein from the vicinity of a balanced translocation breakpoint associated with DiGeorge syndrome. **Human Molecular Genetics**, v. 4, n. 6, p. 1027–1033, 1995.

WALTON, J. D. et al. Characteristics of Stem Cells from Human Neuroblastoma Cell Lines and in Tumors. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 6, n. 6, p. 838–845, nov. 2004.

WANG, J. et al. Inhibition of autophagy potentiates the efficacy of Gli inhibitor GANT-61 in MYCN-amplified neuroblastoma cells. **BMC cancer**, v. 14, p. 768, 2014.

WANG, W. et al. FOXKs promote Wnt/ β -catenin signaling by translocating DVL into the nucleus. **Developmental Cell**, v. 32, n. 6, p. 707–718, 23 mar. 2015.

WANG-JOHANNING, F. et al. Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 7, n. 6, p. 1553–1560, jun. 2001.

WANG-JOHANNING, F. et al. Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. **Oncogene**, v. 22, n. 10, p. 1528–1535, 13 mar. 2003.

WANG-JOHANNING, F. et al. Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 1, p. 81–90, 1 jan. 2007.

WEINBERG, R. **The Biology of Cancer, Second Edition**. [s.l.] Garland Science, 2013.

WEINSTEIN, J. L.; KATZENSTEIN, H. M.; COHN, S. L. Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. **The Oncologist**, v. 8, n. 3, p. 278–292, 2003.

WILDSCHUTTE, J. H. et al. The distribution of insertionally polymorphic endogenous retroviruses in breast cancer patients and cancer-free controls. **Retrovirology**, v. 11, p. 62, 2014.

WILLER, A. et al. Two groups of endogenous MMTV related retroviral env transcripts expressed in human tissues. **Virus Genes**, v. 15, n. 2, p. 123–133, 1997.

WOLFF, E. M. et al. Hypomethylation of a LINE-1 Promoter Activates an Alternate Transcript of the MET Oncogene in Bladders with Cancer. **PLOS Genet**, v. 6, n. 4, p. e1000917, 22 abr. 2010.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews. Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11–22, jan. 2007.

WU, Y. et al. Identification and characterization of two novel human SCAN domain-containing zinc finger genes ZNF396 and ZNF397. **Gene**, v. 310, p. 193–201, 22 maio 2003.

X., X.; SHIM, H. Clinical Implications of Neuroblastoma Stem Cells. In: SHIMADA, H. (Ed.). **Neuroblastoma**. [s.l.] InTech, 2013.

- XIA, Z. et al. Blocking protein geranylgeranylation is essential for lovastatin-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. **Leukemia**, v. 15, n. 9, p. 1398–1407, set. 2001.
- YAMAGATA, M.; WEINER, J. A.; SANES, J. R. Sidekicks: Synaptic Adhesion Molecules that Promote Lamina-Specific Connectivity in the Retina. **Cell**, v. 110, n. 5, p. 649–660, 6 set. 2002.
- YAN, B. et al. Genome-wide identification of novel expression signatures reveal distinct patterns and prevalence of binding motifs for p53, nuclear factor- κ B and other signal transcription factors in head and neck squamous cell carcinoma. **Genome Biology**, v. 8, n. 5, p. R78, 2007.
- YANG, Y. et al. NRSF silencing induces neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells. **Experimental Cell Research**, v. 314, n. 11–12, p. 2257–2265, 1 jul. 2008.
- YANG, Y.; CAO, J.; SHI, Y. Identification and characterization of a gene encoding human LPGAT1, an endoplasmic reticulum-associated lysophosphatidylglycerol acyltransferase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 53, p. 55866–55874, 31 dez. 2004.
- YE, F.; DUVILLIÉ, B.; SCHARFMANN, R. Fibroblast growth factors 7 and 10 are expressed in the human embryonic pancreatic mesenchyme and promote the proliferation of embryonic pancreatic epithelial cells. **Diabetologia**, v. 48, n. 2, p. 277–281, fev. 2005.
- YOON, S. et al. NF- κ B and STAT3 cooperatively induce IL6 in starved cancer cells. **Oncogene**, v. 31, n. 29, p. 3467–3481, 19 jul. 2012.
- ZAGE, P. E. et al. Outcomes of the POG 9340/9341/9342 trials for children with high-risk neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 51, n. 6, p. 747–753, dez. 2008.
- ZHANG, Y. et al. High frequency of the SDK1:AMACR fusion transcript in Chinese prostate cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 9, p. 15127–15136, 2015.
- ZHAO, Z. et al. Worldwide DNA sequence variation in a 10-kilobase noncoding region on human chromosome 22. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 21, p. 11354–11358, 10 out. 2000.
- ZHONG, J. et al. Protein phosphatase PP6 is required for homology-directed repair of DNA double-strand breaks. **Cell Cycle**, v. 10, n. 9, p. 1411–1419, 1 maio 2011.

ANEXOS

ANEXO A - Comparação da expressão de HERV-H nas amostras controle bilaterais

ANEXO B - Comparação da expressão de HERV-W nas amostras controle bilaterais

ANEXO C - Comparação da expressão de HERV-K nas amostras controle bilaterais

Continuação do ANEXO C

ANEXO D - Idiograma dos *loci* de HERV diferencialmente expressos.

Representação esquemática dos cromossomos e *loci* de HERV que foram diferencialmente expressos neste estudo. Seta verde HERV-H. Seta azul: HERV-W. Seta vermelha: HERV-K. Este ideograma foi desenhado através de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp/>

Continuação do ANEXO D

Representação esquemática dos cromossomos e *loci* de HERV que foram diferencialmente expressos neste estudo. Seta verde HERV-H. Seta azul: HERV-W. Seta vermelha: HERV-K. Este ideograma foi desenhado através de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp/>

Continuação do ANEXO D

Representação esquemática dos cromossomos e loci de HERV que foram diferencialmente expressos neste estudo. Seta verde HERV-H. Seta azul: HERV-W. Seta vermelha: HERV-K. Este ideograma foi desenho através de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp/>