RENÉE ZON FILIPPI

Estudo da expressão das proteínas TFE3
e Receptor de insulina nos
hepatoblastomas a partir dos achados de
expressão gênica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de doutor em ciências

Programa de Patologia

Orientadora: Prof. Dra. Maria Claudia Nogueira Zerbini

(Versão corrigida. Resolução CoPgr 5890, de 20 de dezembro de 2010.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

SÃO PAULO

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Filippi, Renée Zon

Estudo da expressão das proteínas TFE3 e receptor de insulina nos
hepatoblastomas a partir dos achados de expressão gênica / Renée Zon Filippi.--
São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientadora: Maria Claudia Nogueira Zerbini.

Descritores: 1.Hepatoblastoma 2.cDNA *microarray* 3.Expressão gênica
4.Imunoistoquímica 5.Receptor de insulina 6.TFE3

USP/FM/DBD-225/11

“Choose a job you love, and you will never have to work a day in your life.”

Confucius

Dedicatória

Ao meu marido, por todo amor, paciência e dedicação, principalmente durante o tempo que estivemos longe um do outro (tempos de *silver line*). Te amo.

Ao meu filho, Pedro Jun, que significa tudo para mim.

Para minha mãe, Odilene , que sempre acreditou em mim..

E para o meu pai, Heitor, que mesmo em pouco tempo que tivemos juntos, me ensinou muito.

Agradecimentos

À minha orientadora, amiga e a quem admiro muito Dra Maria Claudia Zerbini, por toda a imprescindível ajuda na concepção e execução deste projeto, além de toda a paciência e o fundamental apoio psicológico.

À minha querida irmã, Ana Claudia, meu cunhado Márcio Terra Passos e minhas sobrinhas Jéssica e Bruna, responsáveis por vários momentos felizes e pelo incentivo durante o decorrer desta tese.

Aos meus sogros Sunao e Tereza Kishi, por toda a ajuda, carinho e apoio.

À minha amiga e sócia na Pernóstika, Denise da Cunha Pasqualin, por seus conselhos, amizade, companheirismo e constante encorajamento. Muito obrigada!

Ao meu colega de trabalho e amigo Carlos Saito, por toda a ajuda em tudo.

Aos meus companheiros de trabalho no IOT, pessoas com quem tenho o privilégio de trabalhar e de quem gosto demais.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho da patologia do HIAE. É muito bom trabalhar com vocês e obrigada pelo apoio constante.

Aos grandes patologistas que conheço e com quem tive o prazer de conviver e que muito ajudaram na minha formação: Dr. Carlos Musso, Dr. Allan Kardec, Dr. Giulio Cesare Santo, Dr. Kiyoshi Iria, Dr. Roberto Falzoni, Dr. Roberto Ibrahim, Dr. Filadelfio Venco, Dra. Sheila Aparecida Coelho Siqueira, Dr. Sergio Rosemberg e Dr. Joao Norberto Stávale.

Agradecimentos

Aos meus queridos colegas e amigos ortopedistas Prof. Dr. Reynaldo Jesus Garcia Filho, Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo, Dr. André Mathias Baptista e Dr. Marcelo Tadeu Caiero, obrigada pela amizade, conselhos e convivência durante todo este tempo.

Ao meu amigo Laércio Rosemberg, pelos conselhos e incentivo.

Ao meu orientador no exterior, Dr. Antonio Perez-Atayde, fundamental para o sucesso deste projeto, uma pessoa maravilhosa e um patologista excepcional. *Muchas gracias! Thank you so much.*

A Monica Calicchio, pesquisadora que me ajudou no Children's Hospital de Boston, e responsável direta pelo sucesso do projeto. *Thanks for everything!*

Agradecimento

Ao apoio obtido pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) através da bolsa de estágio de doutorado no exterior (PDEE) , número do processo BEX 2985-07-1, de novembro de 2007 a fevereiro de 2008.

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Resumo

Summary

1) Introdução e revisão da literatura.....	1
2) Objetivos.....	26
3) Metodologia.....	28
4) Resultados.....	41
4.1 Comparação entre hepatoblastoma e tecido hepático adjacente.....	42
4.2 Localização cromossômica dos genes diferencialmente expressos.....	44
4.3 Participação dos genes diferencialmente expressos em vias metabólicas e sinalização.....	45
4.4 Validação dos genes por método imunohistoquímico	46
5) Discussão.....	52
6) Conclusões.....	61
7) Anexo	63
8)Referências.....	70

Lista de Abreviaturas

AC	Amostras congeladas
AFP	Alfa-feto proteína
AFFP	Amostras fixadas em formol e incluídas em parafina
Cr.	Cromossomo
Mets.	Metástases
Mol.	Molécula
QT	Quimioterapia
Ref.	Referência
RC	Ressecção cirúrgica
RM	Ressonância magnética
TC	Tomografia computadorizada
US	Exame ultrassonográfico

Lista de Siglas

AZ	Arizona
APC	do inglês: <i>Adenomatous polyposis coli</i>
CA	Califórnia
CAP	do inglês: <i>College of American Pathologists</i>
cDNA	DNA complementar
CGA	Campos de grande aumento
CGH	Hibridação genômica comparativa, do inglês: <i>Comparative genomic hybridization</i>
CHB	do inglês: <i>Children's Hospital Boston</i>
COG	do inglês: <i>Children's Oncology Group</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico. do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i>
E1UAE	do inglês: <i>E1 ubiquitin activating enzyme</i>
EUA	Estados Unidos da América
FISH	do inglês: <i>Fluorescent in situ hybridization</i>
FOSP	Fundação Oncocentro de São Paulo
GSK-3 β	do inglês: <i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
HB	Hepatoblastoma
HCC	Hepatocarcinoma
IGF	do inglês: <i>Insulin growth factor</i>
IGF-2	do inglês: <i>Insulin growth factor 2</i>
IL-6	Interleucina 6
INI-1	do inglês: <i>Integrase interactor 1</i>
KEGG	Enciclopédia de Kyoto de genes e genomas
MA	Massachussets
OMS	Organização Mundial de Saúde
PANK4	do inglês <i>Panthotenate kinase 4</i>
PAF	Polipose Adenomatosa Familiar
PEN	do inglês: <i>Polyethylene naphthalate</i>
PPP1CB	do inglês: <i>Protein Phosphatase 1, catalytic subunit, beta isozyme</i>
PRETEXT	do inglês: <i>Pretreatment extent of disease</i>

RNA	ácido ribonucléico, do inglês: <i>ribonucleic acid</i>
RT-PCR	do inglês: <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SBW	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
SIOPEL	do francês: <i>Société Internationale D'Oncologie Pédiatrique</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TCF4	do inglês: <i>Transcription Factor 4</i>
TFE3	do inglês: <i>Transcription factor E3</i>

Lista de Símbolos

α	alfa
β	beta
$^{\circ}\text{C}$	Celsius
$\geq$	maior ou igual a
μ	micra
μl	microlitro

Resumo

Filippi RZ. Estudo da expressão das proteínas TFE3 e Receptor de insulina no Hepatoblastoma a partir dos achados de expressão gênica [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2011.

O hepatoblastoma é uma neoplasia embrionária hepática que ocorre na faixa pediátrica, rara, sendo bastante heterogênea devido aos seus diferentes componentes epiteliais e mesenquimais. Pouco ainda se sabe a respeito de sua patogênese. Utilizando um microscópio de captura a laser foram dissecadas áreas de componente epitelial do hepatoblastoma e áreas de tecido hepático adjacente não acometido. Destas amostras obtidas de pacientes não submetidos ao tratamento prévio, foram extraídos RNA e confeccionados *cDNA microarrays*, para análise comparativa da expressão gênica, seguida de validação por método imunohistoquímico de alguns genes selecionados. Comparando neoplasia e tecido hepático em duas amostras criopreservadas foram identificados 70 genes diferencialmente expressos, sendo 19 hiperexpressos e 51 hipoexpressos no tumor. A maioria dos genes encontrados foi mapeada nos cromossomos 1 e 2. Dos genes selecionados para validação por método imuno-histoquímico, destacaram-se o receptor de Insulina e o TFE3 (genes hipoexpressos no *cDNA microarray*). A imunomarcagem para o receptor de insulina foi positiva tanto no tecido hepático não acometido quanto no componente epitelial fetal do hepatoblastoma, mas foi consistentemente negativa nas amostras de componente embrionário (9/9). A imunomarcagem para o TFE3 foi positiva no tecido hepático não acometido, e nos componentes epitelial fetal e embrionário, em proporção variável das células com expressão mais intensa no componente embrionário. As reações imuno-histoquímicas para os outros genes selecionados não permitiram interpretação conclusiva. A alta proporção dos genes diferencialmente expressos localizados nos cromossomos 1 e 2 reflete os achados citogenéticos relatados na literatura relacionada ao hepatoblastoma. Achados de imunoexpressão de proteínas relacionadas aos genes TFE3 e receptor de insulina no tecido hepático e nos

diferentes componentes do hepatoblastoma são inéditos e sugerem participação da via sinalizadora da insulina na patogênese destes tumores.

Descritores: Hepatoblastoma . *cDNA microarray*. Expressão Gênica. Imuno-histoquímica. Receptor de insulina. TFE3.

Summary

Hepatoblastoma is a rare tumor, and little is known about its pathogenesis and genetic alterations. Using a laser capture microdissection microscope we sampled areas of epithelial component of hepatoblastoma prior chemotherapy and their normal liver counterpart in order to perform the comparative gene expression analysis followed by the validation of selected genes by immunohistochemistry. Comparing tumor and non-diseased liver in two frozen samples, 70 differentially expressed genes were found, 19 overexpressed and 51 underexpressed in the tumor. Most of the genes were located at chromosomes 1 and 2. Of the genes selected for validation by immunohistochemistry, the most interesting findings came from Insulin receptor and TFE3 (both underexpressed genes). Insulin receptor was positive in non diseased liver and in the fetal component of the Hepatoblastoma but was consistently negative in the embryonal component (9/9 cases). The TFE3 staining was positive in the normal liver and fetal and embryonal components of the tumor in variable proportion of the cells, more marked in the embryonal component. The higher proportion of genes located at chromosomes 1 and 2 corroborates the cytogenetics findings reported in the literature related to Hepatoblastoma . The immunohistochemistry findings of different expression of insulin receptor in the fetal and embryonal components of Hepatoblastoma and the positivity of TFE3 in normal liver and in the tumor's epithelial components deserves further investigation regarding the role of these genes to the pathogenesis of Hepatoblastoma .

Descriptors:

(Hepatoblastoma . cDNA microarray. Gene expression profile.
Immunohistochemistry. Insulin receptor. TFE3)

1) INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1) Conceito

Hepatoblastoma é definido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um tumor maligno blastematoso primário do fígado caracterizado pela combinação de vários componentes de células epiteliais e mesenquimais. O componente epitelial recapitula a ontogênese hepática, com representantes de células indiferenciadas primitivas, hepatoblastos embrionários e fetais, e um componente de células mais diferenciadas que lembram hepatócitos normais (Bosman et al., 2010).

1.2) Epidemiologia

Neoplasias hepáticas primárias na população pediátrica são raras, com incidência entre 0,5 a 2,0%, sendo o hepatoblastoma o mais comum entre estes tumores, com incidência de cerca de 1% entre todas as neoplasias malignas nesta faixa etária (Emre; McKenna, 2004).

Nos Estados Unidos (EUA), os hepatoblastomas representam 91% das neoplasias primárias hepáticas entre as crianças com menos de 5 anos de idade (Darbari et al., 2003).

Na população pediátrica européia, em pesquisa realizada com 849 crianças menores de 15 anos diagnosticadas com neoplasias malignas hepáticas, a incidência de hepatoblastoma foi de 1.2 por milhão, e cerca de 90% dos casos ocorreram em crianças com menos de 5 anos. A incidência em meninos foi de 1.5-1.6 maior do que em meninas (Stiller; Pritchard; Steliarova-Foucher, 2006).

No Brasil, nos dados de 2004 relativos ao câncer infantil do boletim do registro hospitalar de câncer da Fundação Oncocentro de São Paulo (FOSP), as neoplasias pediátricas representaram 3.7% de todas as neoplasias registradas (86.233 casos registrados). As neoplasias malignas mais comuns nesta faixa etária em ordem decrescente de frequência de diagnóstico foram as leucemias, linfomas e tumores do SNC. As neoplasias malignas hepáticas representavam 0,8% destes casos ocupando o 7º lugar entre todos os tumores (Fundação Oncocentro de São Paulo, 2004).

Em 2010 no boletim de neoplasias hepáticas e vias biliares intra-hepáticas, do registro hospitalar de câncer da FOSP, as neoplasias malignas hepáticas perfazem 0.53% dos casos registrados. Os hepatoblastomas constituem 4,4% desses casos (Fundação Oncocentro de São Paulo, 2010).

1.3) Etiologia

O hepatoblastoma ocorre em associação com vários fatores ambientais e diversas síndromes genéticas, mas nem todas estas associações descritas mostram significância estatística. Em um estudo de Buckley JD et al. (1989) utilizando-se de entrevistas aos pais de crianças com o diagnóstico de hepatoblastoma para avaliação de fatores de risco para o desenvolvimento desta neoplasia, os achados mais frequentes foram de história materna de exposição ocupacional a metais, derivados do petróleo e pinturas ou pigmentos.

A relação entre prematuridade e o risco de desenvolvimento de hepatoblastoma foi inicialmente descrita numa série de casos da Universidade do estado de Michigan em 1996. Depois se seguiram inúmeros relatos e séries de casos relacionando prematuridade e baixo

baixo peso como fatores de risco para esta neoplasia (McLaughlin et al., 2006).

Em um estudo norte-americano que utilizou dados de saúde pública do estado de Nova York (excluindo-se a cidade de Nova York) entre 1985 e 2001, ao se analisar os pacientes diagnosticados com hepatoblastoma e utilizando como casos-controle os nascimentos ocorridos no mesmo período, notou-se que o baixo peso ao nascimento (menor que 1000g) estava fortemente associado ao aumento do risco de desenvolvimento da neoplasia (McLaughlin et al., 2006).

Tanimura M. et al. (1987), utilizando dados do registro de câncer em crianças do Japão, comparou crianças com peso ao nascer $\geq$ de 2500 gramas com crianças com peso $<1000g$, entre 1000-1499g, 1500-1999g e 2000-2499g, e observou um risco relativo de vir a desenvolver um hepatoblastoma de 15.64, 2.53, 2.71 e 1.21, respectivamente.

Em pesquisa semelhante realizada nos E.U.A., com dados de pacientes do *Children's Oncology Group* (COG), demonstrou-se risco aumentado de hepatoblastoma em crianças prematuras (duas vezes maior que o esperado) e em crianças com baixo peso ao nascer (risco 15 vezes maior que o esperado), sendo baixo peso ao nascer definido como crianças nascidas com peso menor do que 1000g (Feusner; Plaschikes, 2002).

Aproximadamente 5% dos hepatoblastomas estão associados a uma variedade de malformações e síndromes, sendo as mais comuns a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) e Síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW) (Gilbert-Barness, 2007).

A PAF é uma condição hereditária autossômica dominante resultante de uma mutação no gene APC (“Adenomatous polyposis coli”), gene supressor de tumor localizado no braço longo do cromossomo 5 na banda q21 (5q21). O gene APC tem um papel central na via sinalizadora Wnt, em grande parte regulando a degradação da beta-catenina (Half; Bercovich; Rozen, 2009).

A PAF é caracterizada clinicamente pelo desenvolvimento de múltiplos adenomas de cólon e reto cujo aparecimento se inicia geralmente na infância e adolescência, podendo evoluir, uma década após, para adenocarcinomas. Entre outras manifestações destacam-se adenomas de intestino delgado, lesões cutâneas (fibromas, lipomas, cistos sebáceos e epidérmicos), angiofibromas nasofaríngeos, osteomas, fibromatoses desmóides em mesentério e parede abdominal, tumores cerebrais, adenocarcinomas mucinosos pancreáticos e hepatoblastomas (Half; Bercovich; Rozen, 2009). O risco de hepatoblastoma é aumentado em aproximadamente 800 vezes em crianças com história familiar de PAF (Hirschman; Pollock; Tomlinson, 2005).

A SBW é a mais conhecida das síndromes de hiper-crescimento, cujas características clínicas mais comuns são: macroglossia, hiper-crescimento pré ou pós-natal, e defeitos na parede abdominal (onfalocele, hérnia umbilical e diástase dos retos abdominais), e as complicações incluem hipoglicemia neonatal e risco aumentado para neoplasias malignas (nefroblastoma, carcinoma de cortical adrenal, hepatoblastoma, rabdomiossarcoma e neuroblastoma) (Cohen, 2005).

A base molecular da SBW é heterogênea e complexa. A síndrome apresenta alterações em dois domínios de *imprinting* no cromossomo 11 (11p15), um domínio telomérico que contém os genes H19 e o IGF2, e um domínio centromérico que inclui os genes KCNQ1OT1 e o CDKN1C. Há indícios que alterações de *imprinting* nos domínios teloméricos estão associadas ao hiper-crescimento e desenvolvimento de neoplasias; enquanto que as alterações no domínio centromérico estão associadas às malformações, mas não ao desenvolvimento de neoplasias (Weksberg et al., 2001).

1.4) Aspectos clínicos

1.4.1) Exame clínico:

O hepatoblastoma geralmente apresenta-se assintomático como um achado incidental de uma massa hepática. Perda de peso, anorexia, aumento da circunferência abdominal, vômitos e febre também podem ocorrer e geralmente sinalizam para uma doença avançada (Schanater et al., 2003).

1.4.2) Exames laboratoriais:

Alterações laboratoriais incluem anemia e trombocitose. A trombocitose parece estar relacionada à produção de Interleucina-6 (IL-6) pelas células tumorais.

A elevação de Alfa-feto-proteína é bastante sensível, e está presente na maioria dos pacientes, tornando-se um marcador clínico útil no monitoramento e acompanhamento clínico destes pacientes (Schanater et al., 2003).

Os meninos podem apresentar virilização devido à secreção de gonadotropina pelas células tumorais. Outros achados descritos são elevações discretas de bilirrubina, fosfatase alcalina, e transaminase aspartato (Schanater et al., 2003).

1.4.3) Achados radiológicos:

Ao exame de US abdominal o hepatoblastoma se apresenta como uma neoplasia bem delimitada, geralmente hiperecótica, sólida e intra-hepática (Schanater et al., 2003). A aparência ao ultrassom, entretanto depende do subtipo histológico do hepatoblastoma. O hepatoblastoma epitelial frequentemente se apresenta como uma massa hipoecótica. O subtipo misto mostra-se como uma massa heterogênea com focos hiperecóticos, devido às áreas calcificadas e áreas anecóicas representando áreas de necrose liquefativa. O subtipo indiferenciado de pequenas células frequentemente mostra uma área de necrose central (Helmberger et al., 1999).

A TC mostra massas com baixa atenuação em comparação com o parênquima hepático adjacente no subtipo epitelial e uma massa um pouco mais heterogênea no subtipo misto. As calcificações podem ser pequenas e delicadas ou grosseiras. Após injeção de contraste um realce periférico que corresponde a tumor viável pode ser visto numa fase arterial precoce (Helmberger et al., 1999; Schanater et al., 2003).

Na RM o subtipo epitelial apresenta-se como uma massa homogênea, com hiposinal em T1 e hipersinal em T2. No subtipo misto, dependendo das áreas de necrose, hemorragia, fibrose e calcificação, e do conteúdo de cartilagem, pode haver um maior aspecto heterogêneo, com bandas de hiposinal em T1 e

T2 além de áreas de alto sinal devido à hemorragia nas duas fases (Helmberger et al., 1999). A RM em combinação com achados tomográficos pode auxiliar no diagnóstico diferencial com outras neoplasias hepáticas da infância (Bosman et al., 2010).

1.4.4) Biópsia diagnóstica:

Recomendada em todos os casos, para diagnóstico incluindo o subtipo histológico, com finalidade científica e planejamento terapêutico. A comprovação histológica é a única maneira de se definir o diagnóstico, uma vez que níveis séricos de AFP podem persistir após a idade de 6 meses em crianças normais. Além disso, o neuroblastoma metastático é um dos tumores mais frequentes no fígado no primeiro ano de vida, e o hepatocarcinoma apesar de raro é relatado em crianças. Também é necessária a comprovação histológica da neoplasia nos casos que serão submetidos à quimioterapia prévia à ressecção cirúrgica (Schanater et al., 2003).

Nos estudos SIOPEL 1 e 2, as complicações decorrentes deste procedimento foram pequenas e ocorreram em 7% dos casos (7/96), numa análise que incluiu biópsias cirúrgicas e por agulha. As complicações foram: sangramento (4 pacientes), dor abdominal (2 pacientes) e infecção da ferida (1 paciente). Em todos os 7 casos, a recuperação foi completa e ocorreu em horas ou poucos dias. O risco de contaminação do trajeto da biópsia pela neoplasia

também foi analisado no estudo SIOPEL 1, e nenhum caso foi registrado (Czauderma, 2005).

O tipo de biópsia recomendada nos dias de hoje é a biópsia por agulha grossa (*core biopsy*) guiada por métodos de imagem (US ou TC).

1.4.5) Estadiamento clínico:

1.4.5.1- Pré-operatório

O chamado PRETEXT (*Pretreatment extent of disease* – Extensão da doença no pré-tratamento) foi adotado a partir de 1990 pelo grupo de estudos do fígado da Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica (SIOPEL) e tem mostrado uma alta correlação com a sobrevida geral e sobrevida livre de doença, além de ser útil para verificação da eficácia da quimioterapia neoadjuvante e na avaliação da ressecabilidade cirúrgica.

O sistema PRETEXT é baseado no padrão de ramificação da veia portal que divide o fígado em 8 segmentos e em técnicas de imagem não invasivas. Os tumores são classificados em 4 categorias. Este sistema divide o fígado em 4 setores (s). O lobo esquerdo do fígado é dividido no setor lateral (segmentos 2 e 3) e medial (segmento 4). O lobo direito é dividido em um setor anterior (segmentos 5 e 8) e setor posterior (segmentos 6 e 7). As categorias são determinadas pelo número de segmentos hepáticos afetados, sendo I para 1 setor envolvido, II para 2 setores, III para 3 setores envolvidos ou 2 setores não adjacentes infiltrados e IV para os 4 setores envolvidos. A extensão além do fígado é relatada adicionando-se letras, sendo **V** para a infiltração de veia

hepática ou cava, **P** para a infiltração de veia porta, **E** para extensão extra-hepática e o **M** para a presença de metástases à distância (Stiller; Pritchard; Steliarova-Foucher, 2006)(Figura 1).

Figura 1- Sistema de estadiamento PRETEXT - esquematização

Fonte: Schanater et al., 2003

1.4.5.2- Pós-operatório

O estadiamento no pós-operatório é baseado no TNM ou no estadiamento simplificado adotado pelo Grupo de Oncologia pediátrico norte-americano (COG) – Tabela 1.

Tabela 1- Estadiamento do COG

Estadio	Definição
I	Ressecção completa do tumor
II	Tumor residual microscópico
III	Tumor residual macroscópico
IV	Metastases á distância

1.4.6) Estratégias de tratamento

O tratamento atual inclui a quimioterapia sistêmica e a cirurgia, sendo que o sucesso do tratamento é determinado pela possibilidade de ressecção completa do tumor.

A quimioterapia é bastante útil na estratégia de tratamento destes tumores, porque a maioria dos casos não é passível de ressecção cirúrgica sem quimioterapia prévia, sendo que cerca de 20% dos pacientes já se apresenta com doença metastática ao diagnóstico inicial. Além disso, a quimioterapia associada à cirurgia reduz o índice de recorrência da neoplasia (Roebuck; Perilongo; 2006; Schanater et al., 2003).

A estratégia de tratamento varia de acordo com cada grupo de tratamento e região geográfica. Na América do Norte, representada pelo COG, a tendência é realizar a cirurgia definitiva ao diagnóstico e utilizar a quimioterapia após a cirurgia, sendo que a quimioterapia pré-operatória é reservada para os pacientes nos quais a cirurgia com ressecção completa não é possível ao momento do diagnóstico. Para o grupo europeu, representado pela SIOPEL, o tratamento recomendado inclui a quimioterapia adjuvante seguida de cirurgia (Roebuck; Perilongo, 2006).

De acordo com o protocolo recomendado para o tratamento de hepatoblastoma pela SIOPEL, a quimioterapia com inclusão de cisplatina e a ressecção cirúrgica completa, são cruciais para a cura do hepatoblastoma. Um ponto importante a ser lembrado é que a ressecção cirúrgica completa pode ser por meio de hepatectomia parcial convencional ou por meio de transplante hepático quando a cirurgia convencional não é possível (Czauderma, 2005).

1.5) Classificação histopatológica

Hepatoblastomas são tumores embrionários raros e heterogêneos, constituídos por diferentes componentes, em diferentes estádios de maturação e em diferentes proporções. O componente essencial para o diagnóstico é o epitelial. A classificação se dá de acordo com a presença de cada componente. O Hepatoblastoma epitelial é aquele constituído somente por seu componente epitelial fetal ou embrionário e o misto é constituído por componente epitelial e

mesenquimal (vide classificação nas Tabelas 2 e 3) (Bosman et al., 2010; Finegold et al., 2007).

Tabela 2– Classificação do hepatoblastoma de acordo com o CAP, 2009

Categorias

Epitelial	Fetal bem diferenciado (mitoticamente inativo com índice mitótico mínimo ≤ 2 mitoses por 10,40 xcampos)	Fetal, mitoticamente ativo (>2 mitoses por 10 x40 campos)	Embrionário	Macrotrabecular
------------------	--	--	-------------	-----------------

Pequenas células , indiferenciado

Rabdóide

Estroma misto	Com osteóide; raramente: músculo esquelético, cartilagem, ou componentes menores: colangioblástico (ductal), glandular intestinal (teratóide), neuronal e melanocítico (teratóide) , rabdomioblástico, condróide, blastematoso
----------------------	--

Tabela 3—Classificação histopatológica de acordo com a OMS, 2010

Tipo histológico	Subtipo
Totalmente epitelial	Fetal
	Misto fetal e embrionário
	Macrotrabecular
Misto epitelial e mesenquimal	Pequenas células/indiferenciado
	Sem características teratóides
	Com características teratóides
Hepatoblastoma , sem outra especificação	

O hepatoblastoma epitelial tem como constituintes os componentes fetal e o embrionário. O fetal é o componente epitelial mais diferenciado do espectro, constituído por células semelhantes ao tecido hepático fetal em desenvolvimento. As células organizam-se em ninhos ou trabéculas, apresentam citoplasma claro granuloso ou eosinofílico, mostrando um aspecto característico de claro/escuro ao exame com a lupa do microscópio. Os núcleos são arredondados, com cromatina fina e nucléolo inconspícuo. A contagem mitótica é baixa (menos de 2 mitoses/10 CGA), à exceção da variante “*crowded fetal*” que mostra uma contagem mitótica maior e uma população celular com núcleos pleomórficos e com citoplasma escasso, criando uma aparência mais celular (“*crowded*”). A presença de hematopoese extramedular é um achado comum. O componente epitelial embrionário se assemelha à morfologia do tecido hepático embrionário, com cerca de 6-8 semanas de gestação, e geralmente se associa ao componente fetal. As células deste componente mostram citoplasma escasso, com pouco glicogénio e núcleos irregulares com

cromatina densa, formando arranjos acinares, papilares ou até mesmo pseudo-rosetas. A atividade mitótica é bem mais proeminente (Bosman et al., 2010; Finegold et al., 2007).

O tipo histológico epitelial puro pode ter como subtipos o fetal, misto fetal e embrionário, macrotrabecular e pequenas células indiferenciadas.

O subtipo **macrotrabecular** ocorre em cerca de 3% destas neoplasias e é constituído por células dispostas em trabéculas com cerca de 6-12 células de espessura. As trabéculas são constituídas por células do componente epitelial, fetal e células maiores que se assemelham a hepatócitos ou células do hepatocarcinoma (Bosman et al., 2010; Finegold et al., 2007).

O subtipo **indiferenciado** de pequenas células também representa cerca de 2-3% dos hepatoblastomas epiteliais e são constituídos por uma população de células pequenas, redondas e azuis, indiferenciadas. As células se arranjam em padrão sólido, e a neoplasia exhibe áreas de necrose e contagem mitótica elevada (Bosman et al., 2010; Finegold et al., 2007).

A classificação do CAP inclui o hepatoblastoma rabdóide. As células tumorais rabdóides podem ocorrer associadas ao hepatoblastoma indiferenciado de pequenas células, ou representarem o único tipo celular no tumor, caracterizando um tumor rabdóide extra-renal que geralmente apresenta um comportamento clínico agressivo na faixa etária pediátrica. As células rabdóides caracterizam-se por apresentarem inclusões citoplasmáticas excêntricas (que são PAS diastase positivas, vimentina e citoqueratina

positivas), mostram núcleos vesiculares e corpos de inclusão fibrilares ao microscópio eletrônico (Finegold et al., 2007).

Os hepatoblastomas do tipo **misto epitelial e mesenquimal** representam cerca de 45% destes tumores e mostram-se constituídos por componentes epiteliais (fetal e/ou embrionário) além de componentes mesenquimais (estroma fusocelular, osteóide, cartilagem) (Bosman et al., 2010; Finegold et al., 2007).

Quando o componente mesenquimal de um hepatoblastoma é constituído por diversos componentes heterólogos do tipo endodérmico, neuroectodérmico (melanócitos, glia e células neuronais) e tecidos mesenquimais complexos, é considerado como o subtipo misto epitelial e mesenquimal com características teratóides (Bosman et al., 2010).

O estudo de Haas J.E et al. (1989), envolvendo 168 pacientes, procura relacionar prognóstico e tipo histológico, e mostra que os hepatoblastomas com histologia fetal pura quando completamente ressecados (55 casos) apresentaram melhor sobrevida quando comparado aos outros padrões histológicos (92% versus 57% de sobrevida em 24 meses, $P=0,02$). Este efeito prognóstico da histologia fetal pura não foi observado nos casos em que a ressecção completa não foi realizada. Achados como invasão vascular e contagem mitótica não interferiram no prognóstico.

A histologia indiferenciada de pequenas células apresenta relação com prognóstico desfavorável nos hepatoblastomas. Em 2001, um estudo incluindo 16 hepatoblastomas completamente ressecados que apresentavam áreas

parciais ou predominantes de histologia de pequenas células, demonstrou recorrência em 10 dos pacientes, dos quais 5 evoluíram para o óbito (Hass, 2001). Trobaugh-Lotrario et al, (2009), em um estudo retrospectivo revisando 11 pacientes diagnosticados com a histologia indiferenciada mostrou que nenhum deles sobreviveu (10 foram á óbito por progressão da doença e 1 por complicações decorrentes do tratamento).

Em revisão sobre a relação entre subtipos morfológicos do hepatoblastoma e prognóstico, Dehner e Manivel (1988), concluíram que as evidências a respeito do prognóstico favorável para a histologia fetal pura nestes tumores eram contraditórias, e havia pouca informação a respeito da histologia macrotrabecular para garantir que esta seria realmente desfavorável. Mas havia uma concordância geral que o subtipo indiferenciado de pequenas células estaria associado a um prognóstico desfavorável.

Atualmente, o subtipo histológico fetal bem diferenciado (mitoticamente inativo) por apresentar sobrevida superior ao subtipo embrionário, é considerado pelo COG como prognóstico favorável, e os tumores com esta histologia no estadio I são tratados somente com cirurgia. O subtipo histológico indiferenciado de pequenas células e o rabdóide são considerados os subtipos mais agressivos deste tumor (Finegold et al., 2007).

1.6) Imunofenótipo

O componente epitelial fetal pode expressar alfa feto proteína (AFP) e é positivo para β -catenina em padrão de membrana. O componente epitelial

embrionário mostra positividade em padrão de membrana e nuclear para a β -catenina (Bosman et al., 2010; Wang et al., 2010).

As citoqueratinas expressas no componente epitelial dos hepatoblastomas são frequentemente as citoqueratinas 8, 18 e 19 (Cajaiba et al., 2006; Van Eyken et al., 2006). A citoqueratina 7 aparece como negativa em vários trabalhos na literatura e positiva focalmente em alguns relatos (Pontisso et al., 1993; Van Eyken et al., 1993).

No componente indiferenciado de pequenas células observamos positividade para citoqueratina 8, e negatividade para AFP. A pesquisa de INI1 por exame imunohistoquímico foi negativa em 6/6 casos de hepatoblastoma indiferenciado de pequenas células, à semelhança dos tumores rabdóides da infância que por definição mostram a deleção ou mutação do INI1, e portanto não expressam essa proteína (Dehner; Manivel, 1988).

1.7) Genética

1.7.1- Citogenética convencional e Hibridação genômica comparativa (CGH)

As alterações citogenéticas mais frequentemente descritas na literatura envolvem os cromossomos 1, 2, 4, 8 e 20 e são resumidas a seguir.

Sainat L et al. em 1998, utilizando cariótipos de hepatoblastomas provenientes dos centros italianos participantes do estudo multicêntrico de tumores hepáticos (SIOPEL1), mostram que 6/9 casos mostravam cariótipos

anormais. As anormalidades mais comuns foram trissomias do cr.2 e do cr.20. Quatro casos mostraram anomalias no cr.1, sendo que em dois casos havia uma duplicação de todo ou de uma parte do braço longo deste cromossomo, e em um caso mostrou uma translocação recíproca envolvendo a região 1q21 (Sainat, 1998).

Gray et al. (2000), utilizando hibridação genômica comparativa (CGH) em 18 pacientes provenientes da Europa e Japão, mostraram que a maior parte das perdas envolviam as regiões cromossômicas 13q21-q22 (28%) e 9p22-pter (22%), enquanto que os ganhos mais frequentes ocorreram no 2q23-q24 (33%), 20q (28%) e 1q24-q25 (28%). Este estudo mostrou ainda diferenças significativas entre as alterações nas neoplasias de pacientes caucasianos e japoneses, sendo que a perda do 13q foi um achado presente apenas nas amostras japonesas.

Parada et al. (2000) , realizaram estudo citogenético em 6 casos primários e um caso de recidiva de hepatoblastoma , encontrando trissomia parcial ou total do cr.8, ganho do cr.20 e rearranjos estruturais no cr. 1 em 3 casos, além de super-representação de material do cromossomo 2 em dois casos. As bandas cromossômicas 1q12 e 1q21 estavam envolvidas em três translocações não balanceadas, t(1;2), t(1;4) e t(1;11), que resultaram em ganho de material de 1q.

Terraciano et al. (2005), realizaram um estudo com 35 amostras de hepatoblastomas provenientes de 31 pacientes, utilizando CGH. Os autores apresentaram achados inéditos de ganhos em Xp (43% dos casos) e no Xq (60% dos casos), e que foram confirmados por FISH em 6 pacientes.

Neste trabalho não foram encontradas diferenças citogenéticas entre os subtipos histológicos.

Uma revisão da literatura a respeito das anomalias citogenéticas nos hepatoblastomas foi realizada por Nagata T. et al. (2005), mostrando que as anomalias numéricas e estruturais mais frequentes envolviam regiões do 1q, 4q, 2, 8 e 20. Além disso, eles descrevem as alterações citogenéticas em dois novos casos de hepatoblastoma, um destes mostrando uma translocação cromossômica não balanceada envolvendo a região 4q35 como única anormalidade cromossômica. Tal achado sugere importância de alterações estruturais cromossômicas envolvendo a região terminal 4q e a possibilidade de anomalias estruturais nesta região ocorrerem como um dos eventos iniciais no desenvolvimento desta neoplasia.

Gao H et al. (2006), empregaram a técnica de CGH no estudo de 20 casos de hepatoblastomas, com intenção de detectar desbalanço genômico (perda ou amplificação de DNA) demonstrando amplificação cromossômica frequente em 1q, 2q, 2p, 8q, 8p, 12q e 22q. Perda cromossômica foi observada em 1p, 4p, 4q, 16q, 17p e 18q. A frequência de perda de heterozigotidade no cr.1 foi de 63.3%, mostrando uma perda extensa na região 1p36 .

Stejskalová et al. (2009), fizeram um relato dos achados citogenéticos e de CGH em 9 hepatoblastomas, encontrando alterações nos crs.1, 2, 8 e 20, confirmando achados prévios de literatura, e sugerindo que estes cromossomos possuem realmente um papel importante no desenvolvimento e curso clínico da doença.

1.7.2 - Genética molecular

1.7.2.1) Perfil de expressão gênica

Existem ainda poucos trabalhos publicados na literatura avaliando o perfil de expressão gênica nos hepatoblastomas.

O primeiro deles foi desenvolvido por Nagata et al. (2003), utilizando de um *array* de oligonucleotídeos de DNA de alta densidade Affymetrix®. Foram comparadas 14 amostras de fígado normal e 16 amostras de hepatoblastomas, encontrando como resultado 26 genes denominados de genes preditores pelos autores, isto é, genes que seriam capazes de alocar corretamente cada amostra nos grupos do fígado normal e hepatoblastoma com 100% de acurácia. Dentro deste grupo de genes, encontravam-se genes envolvidos na regulação da divisão celular e crescimento de células tumorais. Dos genes diferencialmente expressos 27% estavam localizados no cr.1, sendo que 4 dos genes preditores foram mapeados na região 1q21-q32 que tem sido frequentemente implicada no desenvolvimento do hepatoblastoma .

Posteriormente Yamada et al. (2005), utilizando a técnica de construção de *oligo-capping cDNA libraries*, comparou o perfil de expressão gênica entre dois grupos de hepatoblastoma e 1 grupo de fígado normal, e encontraram 86 genes diferencialmente expressos, sendo que 11 foram hiperexpresos nos tumores . Outro achado foi a hiperexpressão do oncogene PLK1 nos tumores, que foi associada a um pior prognóstico nos hepatoblastomas.

Luo JH et al. (2006), compararam o perfil de expressão gênica entre hepatoblastomas (07 casos) e hepatocarcinomas (37), e encontraram

hiper-expressão dos genes *IGF2*, Fibronectina, *DLK1*, *TGFb1*, *MALAT1* e *MIG6* nos hepatoblastomas.

Em trabalho mais recente de Adesina et al. (2009), estudando o perfil de expressão gênica de 13 hepatoblastomas, encontraram 942 genes diferencialmente expressos, demonstrando desregulação da via Wnt e vias decrescimento e de sobrevivência celular. O estudo mostra ainda que os diferentes subtipos de hepatoblastomas possuem perfis de expressão gênica e alterações de vias celulares distintos, caracterizando suas assinaturas gênicas.

1.7.2.2) Alterações genéticas e moleculares

Algumas alterações genéticas são compartilhadas com outros tumores embrionários, como a perda de heterozigozidade no cromossomo 11p15 (também descrita em rabdomiossarcomas e nefroblastomas).

Mutações adquiridas no gene APC e no gene da β -catenina, membros da via sinalizadora Wnt, são descritos no hepatoblastoma, sendo que a alta frequência de mutações da β -catenina e a alta incidência de hepatoblastoma nos pacientes portadores de PAF sugerem a importância da ativação da via Wnt nestes tumores (Koch et al., 1999).

O produto do gene APC é parte de um complexo multiproteico que regula o nível citoplasmático de beta-catenina ligando-se diretamente a esta e promovendo a fosforilação do NH2 terminal pela GSK-3 β , identificando a beta-catenina para ser degradada pelo sistema de proteossomos. A beta-catenina é importante no sistema de adesão celular e é a molécula

central efetora da via sinalizadora Wnt/wingless. Quando translocada para o núcleo atua junto com fatores de estimulação linfóide Tcf e regula a transcrição de genes alvo, incluindo c-myc (Koch et al., 1999).

As mutações da β -catenina em hepatoblastomas descritas na literatura, numa faixa de 48-89%, mostram mutações acometendo o éxon 3, ocorrendo nos sítios de fosforilação, e que levam ao acúmulo da proteína β -catenina no núcleo da célula (Koch et al., 1999; Wei et al., 2000; Yung-Ming et al., 2000)(Figura.2).

Figura 2 – Via Wnt : Nas células normais (figura á esquerda) a expressão da β -catenina é regulada pelo gene APC e GSK-3beta. Ambos promovem a fosforilação dos resíduos da serina/treonina e subsequente degradação da β -catenina mediada pela ubiquitina. Perda da regulação da β -catenina (figura á direita) pode ser resultado de mutações no gene APC ou no seu próprio gene resultando em seu acúmulo no citosol e eventual translocação para o núcleo. No núcleo ela age como um cofator do fator de células T na regulação negativa de diversos oncogenes, incluindo ciclina D1 and c-myc.

Fonte: Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2004. 20:781–810

doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126

Copyright 2004 by Annual Reviews.

Um resumo dos outros achados moleculares publicados na literatura a respeito do hepatoblastoma está relacionado na Tabela 4.

Tabela 4 – Alterações moleculares e genéticas descritas na literatura a respeito do Hepatoblastoma

Gene/mol./via	Alteração	Ref.
GPC3	Hiperexpressão de GPC3 no HB	Toretsky, 2001
Met	Hipoexpressão do Met após quimioterapia	Ranganathan, 2005
FOXG1	Hiperexpressão de FOXG1 no HB	Adesina, 2007
Claudina-1 e 2	Hiperexpressão das claudinas no componente fetal	Halász, 2006
Via Hedgehog	Hiperexpressão dos transcritos do GLI1 e PTCH1 no HB	Eichenmüller, 2009
p27/KIP1	Hiperexpressão no subtipo fetal, negatividade no indiferenciado, expressão ↓pós QT	Brotto, 2002
DLK1	Marcador de células ovais bipotencial hiperexpresso no HB	López-Terrada, 2009
Via Notch	Ativada no subtipo fetal puro	López-Terrada, 2009

mol. - molécula

ref. -referência

Com o interesse em compreender melhor os aspectos envolvidos na patogênese e diferenciação celular no hepatoblastoma nos propusemos a identificar os genes diferencialmente expressos no tecido neoplásico, comparando com o tecido hepático não acometido do próprio paciente, (selecionando cada área por meio de microdissecção a laser), e avaliar a expressão das proteínas a eles relacionados nos componentes fetal e embrionário (utilizando o método imuno-histoquímico).

2) OBJETIVOS

2.1) Objetivo geral:

Contribuir para o conhecimento dos possíveis eventos genéticos envolvidos no hepatoblastoma, e seu papel na diferenciação celular do componente epitelial dessa neoplasia.

2.2) Objetivos específicos:

2.2.1- Identificar genes diferencialmente expressos no hepatoblastoma em comparação com o tecido hepático adjacente, em áreas selecionadas pela técnica de microdissecção a laser.

2.2.2- Avaliar a expressão das proteínas relacionadas aos genes diferencialmente expressos nos componentes epitelial fetal e epitelial embrionário do tumor por meio da técnica imuno-histoquímica.

3) METODOLOGIA

Figura 3- Etapas da metodologia

AC – amostras congeladas

AFFP – amostras fixadas em formol e incluídas em parafina

3.1) Casuística

Pacientes provenientes do Children's Hospital de Boston (CHB), de Boston, MA, EUA, com diagnóstico, tratamento e acompanhamento no próprio CHB. Para a realização dos experimentos foram selecionadas exclusivamente amostras de pacientes não submetidos previamente ao tratamento quimioterápico.

3.2) Amostras

3.2.1- Amostras fixadas em formol e incluídas em parafina (AFFP) para realização do *cDNA microarray*:

Foram selecionados 4 casos de pacientes com o diagnóstico de hepatoblastoma , segundo os seguintes critérios:

- 1- Qualidade da amostra: representação de neoplasia viável e tecido hepático não acometido.
- 2- Quantidade da amostra: representação adequada das áreas de interesse, sendo priorizados os espécimes obtidos por ressecção cirúrgica.

3.2.2 - Amostras congeladas para realização do *cDNA microarray*:

Selecionadas 03 amostras congeladas (AC) armazenadas em freezer a -70°C do Laboratório de Patologia do CHB. A seleção das amostras também obedeceu aos mesmos critérios utilizados para as AAFP. As AC dos pacientes continham tecido hepático não acometido e neoplasia.

3.2.3 - AAFP para realização do estudo imunohistoquímico:

Foram selecionados 13 blocos de parafina referentes às amostras de 13 pacientes com diagnóstico de hepatoblastoma sem tratamento quimioterápico prévio para a realização do estudo imunohistoquímico para detecção de proteínas relacionadas aos genes diferencialmente expressos.

3.3) Procedimento de avaliação das amostras para realização do cDNA microarray

Foram realizados testes de avaliação do RNA extraído nas AFFP e AC. Para avaliar a qualidade e quantidade do RNA extraído destas amostras foi utilizado o kit Paradise® Sample Quality Assessment (Catalog #KIT0313 – Version A) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, para cada amostra foram seccionados cortes de 7 µm dos blocos de parafina. Estas lâminas com as amostras sofreram em seguida o processo de desparafinização. Cada amostra foi retirada das lâminas por um processo de raspagem, utilizando-se um bisturi estéril. Após este passo, as amostras passaram por digestão com proteinase K, para extração e isolamento do RNA. A amostra total do RNA foi quantificada por meio de RT-PCR quantitativo no aparelho RT-PCR Stratagene MX 3000 P. Este teste de avaliação das amostras foi realizado duas vezes, com diferentes AFFP pertencentes aos mesmos pacientes.

Em nenhuma das AFFPs selecionadas foi obtido RNA em quantidade e/ou qualidade suficientes para realização da análise de expressão gênica.

A avaliação do RNA obtido nas AC foi realizada de acordo com o sugerido no protocolo de amplificação de RNA (Protocol RiboAmp™HS RNA Amplification Kit Catalog #KIT0205), removendo-se 2µl de cada amostra durante o 1º *round* da síntese da primeira fita, diluindo em 8µl de água livre de nuclease e mensurando-se o RNA através de RT-PCR quantitativo, no aparelho RT-PCR Stratagene MX 3000 P.

A avaliação das amostras congeladas mostrou RNA em qualidade e quantidade suficientes para prosseguimento do experimento de hibridização nos *cDNA microarrays*.

3.4) Amostras selecionadas para realização do *cDNA microarray*

Amostras congeladas provenientes de 3 pacientes diagnosticados com hepatoblastoma, dois pacientes do sexo feminino e 1 do sexo masculino. A apresentação clínica destes pacientes foi com massa tumoral única no fígado, estadio I sendo tratados inicialmente com ressecção cirúrgica, recebendo tratamento quimioterápico após cirurgia, seguindo os protocolos do CHB. Nenhum destes pacientes evoluiu com metástases ou recorrência local. O período de acompanhamento clínico foi de 4,5 anos, 5 meses e 11 meses.

Dois dos pacientes foram diagnosticados com hepatoblastoma subtipo epitelial e um deles com subtipo misto. Em todos os pacientes a ressecção cirúrgica foi completa (com margens livres). Os dados clínicos estão resumidos nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Resumo dos dados clínicos dos pacientes das AC

Caso	Idade	Dados clínicos	AFP	Mets	Tratamento	Evolução
1	6m	Massa no lobo hepático direito	140000	Não	RC + QT	BSD
2	22m	Massa no lobo hepático direito	886	Não	RC+QT	P
3	8m	Massa no segmento 4 do fígado e BWS	4000	Não	RC+QT	BSD

RC- ressecção cirúrgica

QT- quimioterapia

Mets – metástases

BSD- bem sem evidências de doença

P – perda de seguimento clínico

Tabela 6 – Resumo dos achados histopatológicos dos pacientes das AC

Caso	Tamanho	Histologia	Invasão vascular	Margens
1	8,0cm	Misto	Sim	Livres
2	7,0cm	Epitelial	Não	Livres
3	3,0cm	Epitelial	Sim	Livres

3.5) *cDna Microarray* - Procedimentos técnicos

3.5.1 - Microdissecção com captura a laser

Para esta etapa foi utilizado o protocolo HistoGene™ LCM Frozen Section Staining Kit 2 Version B ,segundo as etapas a seguir:

3.5.1.1) Congelamento dos espécimes

As amostras foram retiradas do freezer a -70°C e colocadas em gelo seco, em recipiente com isolamento térmico e transportadas para junto do criostato. As amostras foram colocadas em criomoldes em uma fina camada de OCT. Os criomoldes com as amostras foram levados ao criostato, recobertos por OCT e congelados.

3.5.1.2) Preparação das lâminas

Para cada amostra foram realizados cortes seriados de 7µ de espessura e colocados em uma lâmina de membrana PEN (Molecular Devices, Mountain View, California) indicadas para uso em plataformas de microdissecção a laser.

As lâminas com as amostras foram imediatamente acondicionadas em gelo seco.

Para cada paciente foi utilizada uma navalha de micrótomo nova, e o criostato foi limpo antes do procedimento com etanol a 100% (área interna) e com solução anti-RNase (área externa).

Foram utilizadas luvas descartáveis durante todo o procedimento, que foram trocadas frequentemente e entre a manipulação de uma amostra e outra. Todos os instrumentos e superfícies utilizados externamente foram limpos com solução anti-RNase.

3.5.1.3) Coloração e desidratação das lâminas

Sete recipientes plásticos foram identificados como: a) Etanol a 75%, b) Água destilada, c) Água destilada, d) Etanol a 75%, e) Etanol a 95%, f) Etanol a 100% e g) Xilol sendo colocados em cada um 25 ml da solução apropriada proveniente do *Histogene Frozen Section staining kit*.

A superfície foi limpa com solução anti-RNase. As lâminas foram coradas de 4 em 4. Primeiro foram colocadas sobre uma toalha de papel limpa do tipo *Kimwipe*.

As lâminas seguiram a sequência de 30 segundos no recipiente “a” (Etanol a 75%), 30 segundos no recipiente “b” (água destilada), após os quais foram colocadas numa bandeja horizontal e receberam aproximadamente 100µl

da solução coradora da Histogene que acompanha o *kit*, que permaneceu em cada lâmina por 20 segundos.

As lâminas seguiram para o recipiente “c” (contendo água destilada) por 30 segundos, para o recipiente “d” (com etanol a 75%) por mais 30 segundos, para o recipiente “e” (etanol a 95%) por mais 30 segundos, para o recipiente “f”(etanol a 100%) por 30 segundos e para o frasco “g” (xilol) por 5 minutos. As lâminas secaram por 5 minutos e seguiram para serem microdissecadas.

3.5.1.4) Microdissecção

Foi utilizado o Veritas Microdissection Instrument (Molecular Devices, Mountain View, CA) usando laser de captura IR e corte UV, onde áreas neoplásicas (componente epitelial do hepatoblastoma) e áreas de tecido hepático não acometido foram microdissecadas para cada paciente (Fig. 4).

Microscópio de disseção a laser Veritas
Microdissection Instrument

Microscópio de disseção a laser Veritas
Microdissection Instrument

Amostra após microdisseção

Fragmentos teciduais microdissecados

Figura 4 – Imagens do microscópio de disseção a laser e da amostra de tecido hepático após microdisseção e dos fragmentos teciduais microdissecados

3.5.2 - Extração de RNA

Após a microdissecção a laser o RNA foi extraído das células capturadas, incubando-se o tecido dissecado armazenado na tampa do frasco em tampão e extração de RNA (PicoPure RNA Isolation Kit, Molecular Devices, Mountain View, CA) a 42°C durante 30 minutos. O isolamento do RNA foi realizado segundo protocolos utilizando-se a *MiraCol Purification Column* como parte do kit de extração de RNA. As amostras foram eluídas em 12µl de tampão de eluição.

3.5.3 – Amplificação de RNA, hibridização e análise do *microarray*

O RNA extraído foi amplificado de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante (RiboAmp HS Plus Kit). Em resumo, a síntese da primeira fita foi realizada em cada RNA gerando *cDNAs* que incorporaram uma fita única de uma sequência do promotor T7. Os *cDNAs* gerados na reação de síntese da segunda fita utilizando-se os primers exógenos foram purificados utilizando-se a coluna de purificação MiraCol (componente do kit Paradise Reagent System). Os *cDNAs* amplificados e purificados foram enviados para o Laboratório da Harvard-Partner Center for Genetics and Genomics (www.hpcgg.org.br) para marcação, quantificação e hibridização aos *arrays*. As amostras foram marcadas com sondas biotiniladas utilizando-se o kit de transcrição Bioarray High Yield (Enzo Biochemical, New York, NY). A concentração do cRNA marcado com biotina foi determinada por absorvância de raios UV utilizando-se o leitor Bio-Tek Plate Reader (Bio-Tek instruments, Winooski, VT). Uma das amostras (caso 2) não obteve quantidade suficiente de cRNA para continuidade no experimento. Nas amostras dos casos 1 e 3, 20µg de cada preparado de cRNA biotinilado foi fragmentado, medido por eletroforese em gel e colocado em coquetel de hibridização contendo controles de hibridização como

recomendado pelo fabricante. As amostras foram então hibridizadas ao Array – Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChip Array (<http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/hgu133plus.affx>) a 45 °C por 24 horas. Os microarrays foram lavados e corados de acordo como o protocolo apropriado para o Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChip Array em uma estação de fluidos modelo 450 (www.affymetrix.com) controlado pelo sistema da Affymetrix (Affymetrix GeneChip Operating System –GCOS).

As imagens dos chips foram scaneadas utilizando-se um scanner Affymetrix Model 7000 com autocarga (www.affymetrix.com), controlada pelo Affymetrix GCOS e a função de aquisição dos dados. Os arquivos de imagem foram importados e analisados utilizando-se o programa de computação baseado em dados da internet, o GeneSifter® (www.GeneSifter@.net), ferramenta de manuseio para análise de informações obtidas nos *microarrays*.

Temos que ressaltar que na análise da Affymetrix®, a comparação entre os grupos só pode ser feita com significância estatística somente se cada grupo possuir pelo menos 3 amostras. Se menos de 3 amostras de cada grupo forem usadas, como no nosso experimento, a significância estatística não pode ser obtida, e deve-se usar filtrar os genes diferencialmente expressos por um *cut-off* numérico de expressão (exemplo: gene 1,5 vezes hipoexpresso e hiperexpresso no tumor em relação ao parênquima normal)(PCPGM – Partners Healthcare).

3.5.4 - Análise dos dados

Os dados obtidos foram analisados no programa GeneSifter®, utilizando-se o teste estatístico t (t-test) comparando-se fígado normal e tecido neoplásico. Os dados foram normalizados pela média. Os resultados foram filtrados mediante a imposição de um cut-off de 1,5 x ou mais na alteração de expressão dos genes.

Os resultados falso-positivos foram reduzidos aplicando-se o coeficiente de correlação de *Benjamini e Hochberg*.

O programa GeneSifter® usa dados do Gene Ontology (www.geneontology.org) e z-scores para sumarizar os processos biológicos, funções moleculares ou componentes celulares, além dos dados da KEGG (Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas) (www.genome.jp/kegg/).

3.6) Avaliação imunohistoquímica – Procedimentos técnicos

Da lista obtida dos genes diferencialmente expressos, alguns genes foram selecionados para a realização da validação por imunohistoquímica. A seleção foi feita levando-se em conta os seguintes critérios:

- 1-Informações conhecidas a respeito destes genes: associações com neoplasias, localização cromossômica e participação em vias conhecidas.
- 2-Existência de anticorpos avaliáveis comercialmente para uso em AAFP
- 3-Controles positivos em amostras de tecido humano.

Dos 13 blocos de parafina selecionados para o estudo imunohistoquímico, foram seccionados cortes de 4µm em lâminas eletricamente carregadas, e o procedimento de imunohistoquímica foi realizado no sistema automatizado *Ventana Discovery XT* de acordo com os protocolos do fabricante. Seguindo o protocolo *Closed Loop Assay*

Development (CLAD) (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) os anticorpos foram otimizados utilizando-se os kits de detecção/amplificação OmniMap ou Ultra-Map DAB anti-camundongo HRP ou anti-coelho HRP (Ventana Medical Systems, Tucson , AZ).

Para cada anticorpo, procedimentos básicos de controle de qualidade foram realizados para otimizar a recuperação antigênica, diluição do anticorpo primário e detecção do anticorpo secundário. Um painel de várias amostras de tecidos humanos de órgãos variados foi utilizado como controle positivo para os anticorpos testados.

As reações imuno-histoquímicas foram analisadas no tecido hepático não acometido e na área neoplásica, sendo analisados separadamente os componentes embrionário e fetal, e quantificadas separadamente de acordo com a extensão de imunomarcção em uma escala semi-quantitativa: sendo 0 para a ausência de imunomarcção, 1+ para imunomarcção focal ($\leq 25\%$), 2+ para imunomarcção moderada (25-50%) e 3+ para imunomarcção difusa ($> 50\%$).

4) RESULTADOS

4.1) Comparação entre hepatoblastoma e tecido hepático adjacente

Comparando as amostras de hepatoblastoma com as de fígado adjacente, foram encontrados 70 genes diferencialmente expressos no tecido neoplásico. Destes, 19 hiperexpressos e 51 hipoexpressos (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7 – Genes com expressão aumentada no hepatoblastoma e respectivas localizações cromossômicas

Gene com expressão aumentada	Localização
<i>Tripartite motif-containing 10</i>	6p21.3
<i>DCMP deaminase</i>	4q35.1
<i>CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 8 (CMTM8)</i>	3p22.3
<i>RAP2B member of RAS oncogene family</i>	3q25.2
*CD46 ,complement regulatory protein	1q32
<i>Der1-like domain family, member 1 (DERL1)</i>	8q24.13
<i>Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1(GFPT1)</i>	2p13
<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 2</i>	7q34
<i>F-box protein 8</i>	4q34.1
<i>Solute carrier family 33 acetyl CoA transporter member 1</i>	3q25.31
<i>Zinc finger protein 323 (ZNF 323)</i>	6p22.3-p22.1
<i>Phospholipase C-like 1 (PLCL1)</i>	2q33
<i>Syntaxin 12(STX12)</i>	1p35.3
<i>CDGSH iron sulfur domain 2</i>	4q24
<i>Bromodomain containing 1(BRD1)</i>	22q13.33
<i>VAMP-associated protein A</i>	18p11.22
<i>VAV 2 guanine nucleotide exchange factor</i>	9q34.1
*Palladin	4q32.3
*Calmodulin 1	14q24-q31

* refere-se aos genes selecionados para validação por técnica imunohistoquímica.

Tabela 8– Genes hipoexpressos no hepatoblastoma e respectivas localizações cromossômicas

Genes com expressão diminuída	Localização
<i>Small proline -rich protein 1B cornifin (sprr1b)</i>	1q21-q22
<i>ATF7IP</i>	12p13.1
<i>PHD finger protein 6 (PHF6)</i>	Xq26.3
<i>Adaptor-related protein complex 3, sigma 2 subunit (AP3S2)</i>	15q26.1
<i>Forkhead box C1 (FOX C1)</i>	6p25
*Insulin receptor	19p13.3-p13.2
<i>2-oxoglutarase and iron dependent oxygenase domain containing 1 (OGFOD1)</i>	16q12.2
<i>NECAP endocytosis associated 2 (NECP2)</i>	1p36.13
<i>Serine/arginine repetitive matrix 1 (SRRM1)</i>	1p36.11
<i>SAPS domain family member 3 (PPP6R3)</i>	11q13
<i>Mediator complex subunit 6 (MED6)</i>	14q24.2
<i>Serine/threonine kinase receptor associated protein (RIPK2)</i>	8q21
<i>Proline rich 3</i>	6p21.3
*Transcription factor 4	10q25.3
<i>RAS homolog gene family member F</i>	12q24.31
<i>Makorin, ring finger protein 1 (MKRN1)</i>	7q34
<i>Serine/Threonine/tyrosine interacting protein (STYX)</i>	14
*TFE3	Xp11.22
<i>Jumonji domain containing 2C (KDM4C)</i>	9q24.1
<i>KIA1033</i>	12q24.11
<i>Retinoblastoma binding protein 4</i>	1p35.1
<i>Xeroderma pigmentosum complementation group c</i>	3p25
<i>Polybromo 1 (PBRM1)</i>	3p21
<i>Transcription factor 12 (TCF12)</i>	15q21
<i>Mediator complex subunit 14 (MED14)</i>	Xp11.4
<i>Dihydrofolate reductase -like 1 (DHFR1L1)</i>	3q11.1
<i>F-box protein 33 (FBXO33)</i>	14q21.1
<i>Tripartite motif containing 62 (TRIM62)</i>	1p35.1
<i>Ubiquitin-activating enzyme E1 (UBA1)</i>	Xp11.23
<i>Zinc finger protein 18 (ZNF18)</i>	17p11.2
<i>BSD domain containing 1 (BSDC1)</i>	1p35.1
<i>SON DNA binding protein (SON)</i>	21q22.1-q22.2; 21q22.11
<i>MTERF domain containing 2 (MTERFD2)</i>	2q37.3
<i>Cold shock domain protein A (CSDA)</i>	12p13.1
*PANK4	1p36.32
<i>Serine/threonine/tyrosine interacting -like 1 (STYXL1)</i>	7q11.23
<i>GATA zinc finger domain containing 2B (GATAD2B)</i>	1q21.3
<i>M-phase phosphoprotein 8 (MPHOSPH8)</i>	13q12.11
<i>Rab member of RAS oncogene family like 3 (RABL3)</i>	3q13.33
<i>Ribosomal protein s19 (RPS19)</i>	19q13.2
<i>S1 RNA binding domain 1s (SRBD1)</i>	2p21
<i>Ubiquitin specific peptidase 4 (USP4)</i>	3p21.3
<i>Homeobox A7 (HOXA7)</i>	7p15.2
*PPP1CB	2p23
<i>KIAA0460 (RPRD2)</i>	1q21.3
<i>Apolipoprotein M</i>	6q21.33
<i>Lymphocyte antigen 96 (LY96)</i>	8q21.11
<i>Spectrin , alpha , non erythrocytic 1 (alpha fodrin) (SPTAN1)</i>	9q34.11
<i>Abl interactor 2</i>	2q33
<i>Serine/threonine kinase 36 (STK36)</i>	2q35

* refere-se aos genes selecionados para validação por técnica imunohistoquímica.

4.2) Localização cromossômica dos genes diferencialmente expressos

Os genes diferencialmente expressos foram mapeados nos loci cromossômicos usando a informação registrada no banco de genes NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene). Os cromossomos mais frequentemente envolvidos foram: cromossomo 1 (11 genes, 9 hipoexpressos e 2 hiperexpressos), cromossomo 2 (7 genes, 5 hipoexpressos e 2 hiperexpressos), cromossomo 3 (8 genes, sendo 5 hipoexpressos e 3 hiperexpressos). Abaixo a Tabela 9 relacionando os genes localizados no cromossomo 1 e suas respectivas funções conhecidas.

Tabela 9 – Genes diferencialmente expressos localizados no cromossomo 1

Gene ↑	Região do Ch	Função
*CD46	1q32	Proteína reguladora do complemento
STX12	1p35.3	Proteína de transporte intracelular
Gene ↓		
SPRR1b	1q21-q22	Envolvimento na metaplasia escamosa
NECP2	1p36.13	Provável papel na endocitose
SRRM1	1p36.11	Papel como co-ativador do <i>splicing</i>
RBP4	1p35.1	Regulação negativa da proliferação celular e regulação da transcrição celular
TRIM62	1p35.1	Codificação de proteínas
BSDC1	1p35.1	Codificação de proteínas e ligação com as proteínas
*PANK4	1p36.32	Enzima chave reguladora na biossíntese da coenzima A (CoA)
GATAD2B	1q21.3	Codificação proteica, ligação com íons, metal e regulação da transcrição
RPRD2	1q21.3	Codificação de proteínas e ligação com as proteínas

* refere-se aos genes selecionados para validação por técnica imunohistoquímica.

4.3) Participação dos genes diferencialmente expressos em vias metabólicas e de sinalização

Os genes diferencialmente expressos encontrados, com participação em vias conhecidas estão relacionados na Tabela 10.

Tabela 10 – Vias metabólicas e de sinalização relacionadas aos genes diferencialmente expressos

Vias	Genes	Expressão no hepatoblastoma
Via sinalizadora da Insulina	<i>Insulin receptor</i>	↓
	<i>PPP1CB</i>	↓
	<i>Calmodulin 1</i>	↑
Via sinalizadora Wnt	<i>TCF4</i>	↓
	<i>USP4</i>	↓
Via sinalizadora GnRH	<i>Calmodulin 1</i>	↑
Via sinalizadora Hedgehog	<i>Serine/threonine kinase 36</i>	↓
Metabolismo da Pirimidina	<i>DCMP deaminase</i>	↑
Metabolismo do Fosfato inositol	<i>Inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II</i>	↓
Proteólise mediada pela Ubiquitina	<i>Ubiquitin-activating enzyme E1</i>	↓
Regulação do citoesqueleto de actina	<i>Abl interactor 2</i>	↓
	<i>PPP1CB</i>	↓
	<i>Vav 2 guanine nucleotide exchange factor</i>	↑
Junção Tight	<i>Cold shock domain protein A</i>	↓
	<i>Spectrin , alpha, non-erythrocytic 1</i>	↓
	<i>VAMP</i>	↑
Junção Adherens	<i>Insulin receptor</i>	↓
	<i>TCF 4</i>	↓

4.4) Validação dos genes por método imunohistoquímico

Para validação dos achados de expressão gênica através da técnica imuno-histoquímica, segundo os critérios já relatados na metodologia, os seguintes genes foram selecionados: Receptor de insulina, *TFE3*, *CD46*, *PANK4*, *Calmodulina*, *TCF4*, *PP1beta*, *Palladin* e *E1UAE*. As especificações dos anticorpos utilizados encontram-se descritas na tabela 11.

Tabela 11 – Anticorpos utilizados para o exame imunohistoquímico.

Anticorpo	Clone	Fonte	Título	Padrão de expressão	Controle positivo
Receptor de insulina	Policlonal	Abcam	1/50	membrana	placenta
Anti-PANK4	Policlonal	Sigma-Aldrich	1/25	citoplasma	músculo e fígado
Anti-TFE3	Policlonal	Sigma-Aldrich	1/250	nuclear	rim e cérebro
Anti-CD46	policlonal	Sigma-Aldrich	1/250	membrana	prostata
Calmodulin	policlonal	Abcam	Vd	citoplasma e membrana	carcinoma urotelial
TCF4	O.T.149	Abcam	Vd	nuclear	fígado, cérebro
PP1beta	EP1804Y	Abcam	Vd	Citoplasma	tecido muscular
Palladin		Proteintech Group Inc.	Vd	Citoplasma	carcinoma de ovário
E1 ubiquitin AE	policlonal	Abcam	Vd	citoplasma	placenta

Vd – testes em várias diluições

O receptor de insulina mostrou imunomarcção positiva de forma leve nos hepatócitos e uma imunomarcção moderada no componente fetal do hepatoblastoma, mas foi consistentemente negativo no componente embrionário de todas as amostras testadas (9/9). Os resultados das reações imunohistoquímicas para a pesquisa de receptor de insulina são apresentados na Tabela 12 e Figura 4.

Tabela 12 – Resultados da pesquisa do anti-receptor de insulina

Caso	Tecido hepático não neoplásico	Componente fetal do HB	Componente embrionário do HB
1	1+	2+	0
2	1+	2+	0
3	1+	NR	0
4	1+	2+	0
5	1+	2+	NR
6	1+	2+	0
7	NR	NR	NR
8	1+	1+	NR
9	1+	NR	0
10	1+	NR	0
11	NR	NR	NR
12	1+	NR	0
13	NR	NR	NR
Resumo	10/10 Positivos (1+)	6/7 Positivos 5(2+) e 1 (1+)	9/9 Negativos

NR – Componente não representado

A imunomarcção para o anti-TFE3 foi extremamente variável, sendo que a maioria dos hepatócitos e componente fetal mostraram uma imunomarcção positiva, sendo a maioria dos casos de forma leve. Já o componente embrionário do hepatoblastoma mostrou uma imunomarcção positiva na maioria dos casos testados (5/6), e com 2 casos mostrando uma positividade acentuada. Os resultados das reações imunohistoquímicas para a pesquisa de anti-TFE3 são apresentados na Tabela 13 e Figura 4.

Tabela 13 – Resultados da imunomarcação para TFE3

Caso	Tecido hepático não neoplásico	Componente fetal do HB	Componente embrionário do HB
1	0	0	NR
2	1+	1+	2+
3	0	1+	1+
4	2+	0	1+
5	1+	1+	NR
6	NR	NR	NR
7	2+	2+	NR
8	NR	NR	NR
9	1+	1+	3+
10	0	NR	1+
11	0	1+	3+
12	NR	NR	NR
13	NR	NR	NR
Resumo	5/9 Positivos 3(1+) 2 (2+)	6/8 Positivos 5(1+) 1(2+)	5/6 Positivos 3(1+) ,2(3+) ,1(2+)

NR – Componente não representado

Após inúmeras tentativas de padronização para o uso dos anticorpos CD46, PANK4, Calmodulina, TCF4, PP1beta, Palladin e E1UAE, incluindo utilização de diferentes diluições e protocolos, os resultados obtidos foram insatisfatórios para análise.

Figura 5 – Imunoexpressão do Receptor de insulina e do TFE3 no tecido hepático, e componente epitelial fetal e embrionário do hepatoblastoma.

5) DISCUSSÃO

Sendo o hepatoblastoma uma neoplasia rara, e atualmente cada vez mais diagnosticada através de amostras obtidas por biópsias por agulha guiadas por imagem, um dos maiores desafios do projeto foi a obtenção de um número adequado de amostras das quais conseguíssemos extrair RNA em quantidade e qualidade adequadas para a realização do *cDNA microarray*. Nas amostras obtidas por biópsia por agulha, tanto das AC como das AAFP, não foi possível a obtenção de RNA suficiente para a realização dos *arrays*, desta maneira restringimos o número de amostras, utilizando somente ACs provenientes de espécimes de ressecções cirúrgicas diagnosticados como hepatoblastoma e não submetidos ao tratamento quimioterápico prévio, evento cada vez mais incomum nos dias de hoje.

A utilização de amostras de pacientes não submetidas ao tratamento quimioterápico prévio é um critério importante na seleção dos casos, pois existem diferenças no perfil de expressão gênica de neoplasias após tratamento quimioterápico, havendo inclusive importantes relatos na literatura em relação ao hepatoblastoma, tais como o decréscimo da imunoexpressão do p27 no componente epitelial fetal (Brotto et al., 2002) e o decréscimo na imunoexpressão do *C-myc*, Ciclina D1 e *Met*, após tratamento quimioterápico (Ranganathan et al., 2005).

Em comparação com os outros trabalhos que utilizaram o *cDNA microarray* na literatura, este é inédito em seu desenho, pois apresenta todos os seguintes requisitos: 1) Exclusão de casos submetidos ao tratamento prévio, 2) Comparação entre neoplasia e tecido hepático provenientes dos mesmos pacientes, 3) Utilização da técnica de microdissecção a laser para garantir

microscopicamente a seleção das áreas de parênquima hepático e neoplasia sem risco de “contaminação”, 4) e validação dos achados por método imunohistoquímico permitindo a correlação morfológica. A metodologia utilizada nos outros trabalhos de expressão gênica em hepatoblastoma existentes na literatura está resumida na Tabela 14.

Tabela 14- Revisão da literatura relativa ao perfil de expressão gênica nos Hepatoblastomas

Publicação	Número de casos	Seleção de amostras	Método	ML	Validação
Nagata 2003	16HB/14FSD	FSD e HB/pacientes diferentes /amostras congeladas	Affymetrix <i>gene chip</i>	N	N
Yamada 2004	74HB/FSD	FSD e HB/ mesmo paciente/ amostras congeladas/pré e pós QT	Oligo-capping <i>cDNA libraries</i>	N	RT-PCR/NB SB
Luo 2006	7HB/37HCC/32 FC/29 FSD	HB, HCC, fígado adulto /amostras congeladas	Affymetrix u95av2, u95b and u95c	S	N
Adesina 2009	13HB	HB e <i>pool</i> de amostras de fígado fetal e adulto /amostras congeladas	Affymetrix <u>U133A</u>	N	Qrt-RT-PCR

ML- Microdissecção a laser
 HB- Hepatoblastoma
 FSD- Fígado sem doença
 FC- Fígado cirrótico
 HCC- Hepatocarcinoma
 QT- Quimioterapia
 N-Não
 S- Sim

Alterações numéricas ou estruturais no cr.1 estão entre as mais frequentes ao se analisar a literatura a respeito de achados citogenéticos (Nagata et al., 2005; Parada et al., 2000; Wassim et al., 2002; Yeh et al., 2000) e de CGH nos hepatoblastomas (Gao et al., 2006; Gray et al., 2000; Stejskalova et al., 2009; Terraciano et al., 2003). No perfil de expressão gênica de nossas amostras, dos 70 genes genes diferencialmente expressos encontrados, 11 genes foram

localizados no cr.1 (9 hipoexpressos e 2 hiperexpressos). Destes genes, 7 estão localizados na região 1p35 e 1p36 e todos foram hipoexpressos no hepatoblastoma em relação ao tecido hepático. É importante notar que a região 1p36 aparece em alguns estudos de CGH como uma região com extensa perda de heterozigotidade no hepatoblastoma, aparentando ser uma região envolvida no desenvolvimento desta neoplasia (Gao et al., 2006; Terraciano et al., 2003). Foram encontrados 3 genes na região 1q21 e 1 na região 1q32, lembrando que a região 1q21-q32 aparece na literatura como uma região frequentemente alterada no hepatoblastoma (Parada et al., 2000; Stejskalova et al., 2009; Nagata et al., 2005). Em resumo, alterações no cr.1 são um evento comum nos hepatoblastomas, e este é um cromossomo no qual podem estar localizados possíveis genes de importância na patogênese destas neoplasias. Os achados de expressão gênica em nossas amostras corroboram tais fatos.

Da lista de genes diferencialmente expressos foram encontrados genes participantes na via sinalizadora Wnt (*TCF4* e *USP4*), via que tem um importante e comprovado papel na patogênese do hepatoblastoma (Koch et al., 1999; Wei et al., 2000; Yung-Ming et al., 2000). A via Wnt apresenta inúmeros papéis no desenvolvimento celular, regulando a expressão de genes da via *TCF/LEF*. Distúrbios nesta via estão associados ao desenvolvimento de neoplasias, e há estudos sugerindo um papel de gene supressor tumoral para o *TCF* (Angus-Hill et al., 2011), achado que explicaria a hipoexpressão do gene *TCF* encontrada nos nossos casos.

Outra via sinalizadora com diversos genes participantes representados foi a via da insulina (Receptor de insulina, Calmodulina 1 e *PPP1CB*).

Em um dos únicos estudos existentes na literatura sobre alterações no eixo do fator de crescimento da insulina (IGF) e receptores de insulina nos hepatoblastomas (Von Horn et al., 2001), usando como metodologia a análise por proteção de RNase, são descritas alterações na expressão do receptor de insulina, sendo que a isoforma A deste receptor mostrou expressão heterogênea nas amostras (4 casos com níveis normais, 2 com expressão aumentada e 2 com expressão discretamente diminuída), enquanto a isoforma B mostrou-se hipoexpressa quando comparada com o tecido hepático normal. (von Horn et al., 2001). A análise da expressão gênica dos nossos 2 casos mostrou uma hipoexpressão do Receptor de insulina e do PPP1CB em relação ao tecido hepático normal, e uma hiperexpressão da Calmodulina 1. Estes achados mostram claramente alterações na via da insulina, que podem contribuir para o desenvolvimento da neoplasia.

Da via Hedgehog, descrita recentemente como ativada nos hepatoblastomas, (Eichenmüller et al., 2009; Oue et al, 2010) e com a hiperexpressão de alguns de seus componentes relacionadas ao prognóstico desta neoplasia (Li et al., 2010), encontramos apenas um gene hipoexpresso participante (*Serine/threonine kinase 36*).

O Hepatoblastoma é uma neoplasia que traz a sua heterogeneidade em sua própria definição, e mesmo ao analisarmos o subtipo epitelial isolado, este mostra dois componentes morfologicamente diferentes, o fetal e o embrionário. Além disso, o componente fetal e o embrionário mostram conteúdo de DNA diferente, sendo que o embrionário mostra-se fortemente associado à aneuploidia do DNA (Zerbini et al., 1998), e há indícios de ativação de diferentes vias moleculares de acordo com o subtipo histológico do hepatoblastoma

(López-Terrada et al, 2009). Diante de tais achados faz todo o sentido especular que estes componentes apresentem alterações moleculares diferentes em seu processo de diferenciação. Nos trabalhos publicados abordando o perfil de expressão gênica em hepatoblastomas, a validação dos achados foi realizada por meio de métodos moleculares. Optamos pelo método imunohistoquímico, para comparar a expressão proteica dos genes encontrados diretamente no tecido hepático particularmente nos componentes epitelial fetal e embrionário, avaliando assim diferentes perfis de expressão dentro do universo heterogêneo do próprio hepatoblastoma.

A validação dos achados por meio do método imunohistoquímico, utilizando marcadores disponíveis comercialmente foi de difícil execução. Vários dos nossos anticorpos testados, apesar de seguirmos rigorosamente os protocolos fornecidos (e também de diversas tentativas de variações destes), utilizarmos somente anticorpos com reatividade em material fixado em formalina e incluído em parafina e utilizarmos controles conhecidos, não mostraram um resultado satisfatório que fosse confiável para análise.

Além disso, a tradução dos achados de expressão gênica em expressão imunohistoquímica das proteínas revelou resultados discrepantes, como verificado em relação aos genes Receptor de Insulina e TFE3, que foram hipoexpressos nas amostras tumorais e mostraram imunoexpressão aumentada em alguns dos componentes do hepatoblastoma. Uma das explicações para tais achados pode ser a heterogeneidade dos componentes do hepatoblastoma evidenciada através da visualização de expressão diferencial dessas proteínas nos diferentes componentes do tumor.

Em relação ao receptor de insulina, que no *cDNA microarray* foi 2.0 vezes hipoexpresso no tumor em relação ao parênquima hepático normal, chamou atenção a completa ausência de imunoexpressão no componente embrionário do hepatoblastoma e também a imunoexpressão positiva maior no componente fetal do que no parênquima hepático adjacente.

Para o TFE3, que também está hipoexpresso (1.81 vezes) no *cDNA microarray*, ao considerarmos somente os casos com imunoexpressão moderada e intensa (2 e 3+), o componente embrionário mostra uma imunoexpressão bem maior (60%) quando comparada ao componente fetal (17%) e parênquima hepático não acometido (17%).

O receptor de insulina é uma glicoproteína tetramérica composta de duas sub-unidades extracelulares (α) e duas sub-unidades transmembrana (β), sendo que cada sub-unidade beta contém um domínio de tirosina quinase. O receptor de insulina humano existe em duas isoformas (IR-A e IR-B), sendo que a população das isoformas é regulada por fatores teciduais e fatores desconhecidos (Pandini et al., 2002; von Horn et al., 2001).

A Isoforma A do receptor de insulina tem uma alta afinidade pelo receptor de IGF-II nas células fetais e cancerígenas, e se comporta como um segundo receptor fisiológico para o IGF-II nestes tecidos (von Horn, 2001). Vários estudos mostram que o desenvolvimento e progressão do hepatoblastoma inclui a hiperexpressão de IGF-II e também em outros tumores da infância como o Tumor de Wilms (Honda et al., 2008), e que há uma expressão gênica alterada tanto no IGF-II quanto em outros genes participantes do eixo IGF no tumor em relação ao parênquima hepático adjacente (Gray et al., 2000; Tomizawa;

Saisho, 2006; von Horn et al., 2002). Apesar disto, pouco se conhece a respeito do receptor de insulina nos hepatoblastomas, principalmente em relação a sua imunoexpressão em relação ao tecido hepático normal e nos seus diferentes componentes. Nossos achados demonstram que de alguma maneira o receptor de insulina participa da patogênese do hepatoblastoma, sugerindo a importância de futuros estudos da via sinalizadora da insulina e eixo IGF nestes tumores. Este conhecimento pode ser bastante útil em um futuro próximo, na linha da terapia molecular agindo direcionada a moléculas alvo.

O *TFE3* faz parte de uma família de quatro fatores de transcrição cujos outros membros são o *MITF*, *TFEB* e *TFEC*. A proteína codificada por este gene ativa e interage com fatores reguladores da transcrição (ex: *SMAD3*, *E2F3*, *LEF-1*), apresentando um papel importante no crescimento celular e proliferação. Também está envolvido em translocações cromossômicas que resultam em diferentes produtos de fusão gênica, e são características de tumores como o carcinoma de células renais papilífero associado à translocação do Xp11 e do sarcoma alveolar de partes moles (Aulmann et al., 2007; Ross; Argani, 2010). O *TFE3* ativa o *IRS-2* hepático e induz a hexoquinase II (*HKII*) e a *INSIG1* (do inglês: *Insulin-induced gene 1*), participando assim da via sinalizadora da insulina (Nakagawa et al., 2006).

Não existem estudos a respeito do *TFE3* nos hepatoblastomas, mas os achados de hipoexpressão do gene no *cDNA microarray*, associados a uma diferença de imunoexpressão nos componentes epiteliais fetal e embrionário do hepatoblastoma, com uma nítida hiperexpressão no componente embrionário,

sugerem que este gene deve ser melhor investigado nesta neoplasia. A estas evidências associam-se os fatos do *TFE3* participar diretamente na ativação da

via sinalizadora da insulina, que como já discutido neste texto, parece ser importante na patogênese do hepatoblastoma, e a sua participação (por meio de translocações com outros genes) em outras neoplasias da infância.

Os nossos resultados de expressão gênica não demonstraram hiperexpressão do gene *IGF-2*, um gene hiper-expresso relatado nos outros trabalhos de perfil de expressão gênica nos hepatoblastomas (Luo et al., 2006; Nagata et al.; 2003; Yamada et al, 2004). Também não encontramos a hiperexpressão do *PLK-1*, um oncogene hiperexpresso e relacionado a um pior prognóstico nos hepatoblastomas (Yamada et al., 2004).

Os genes diferencialmente expressos relacionados á via MAPK e anti-apoptose, relatados por Adesina ET al. (2009) não foram encontrados nos nossos achados, porém entre os casos submetidos ao *cDna microarray* não haviam representantes do hepatoblastoma de pequenas células/indiferenciado, relatado como o subtipo em que estas vias estão mais frequentemente hiper-reguladas.

6) CONCLUSÕES

6.1) Os achados de expressão gênica confirmados por imunohistoquímica dos genes *TFE3* e *Receptor de Insulina* indicam estes genes como candidatos a uma futura investigação sobre seus papéis na patogênese do hepatoblastoma .

6.2) Nossos achados demonstram a participação e a importância da via sinalizadora da insulina no hepatoblastoma , com a presença de 3 genes participantes diretos diferencialmente expressos, além de um participante indireto , o *TFE3*.

6.3) O grande número de genes diferencialmente expressos localizados no cr.1, confirma a importância desse cromossomo, particularmente da região 1q21-q32 no hepatoblastoma

6.4) Dentre os genes diferencialmente expressos encontrados no *cDNA microarray* estão os genes participantes das vias sinalizadoras Wnt e Hedgehog, confirmando a participação destas vias na patogênese do hepatoblastoma .

6.5) A validação dos achados de expressão gênica pela técnica imunohistoquímica mostrou-se difícil mas fundamental para se compreender e interpretar os achados obtidos através das plataformas de expressão gênica.

7)ANEXO

Anexo : Protocolo utilizado para amplificação de RNA**Protocol RiboAmp™HS RNA Amplification Kit****Catalog #KIT0205****Catalog KIT0215****Version C –For laboratory use****Arcturus Bioscience, Inc.****Primeiro dia:****A) Síntese da primeira fita**

1. Prepare a amostra de RNA num volume total de 10-11µl num tubo para uso em microcentrífuga (livre de Rnase) de 0.5ml ou 0.2 ml e coloque para resfriar numa temperatura de 4-8°C.
 2. Descongele o *Primer 1* mexendo vigorosamente de cima para baixo.
 3. Adicione 1.0 µl do *Primer 1* e misture bem.
 4. Incube a 65°C durante 5 minutos e resfrie as amostras a 4-8°C por pelo menos 1 minuto, antes de prosseguir.
 5. Coloque os componentes da síntese de primeira fita a 6°C. O *1st Strand Master Mix* e o *HS enhancer* devem ser descongelados e mexidos de cima para baixo, até que todos os componentes sólidos estejam dissolvidos, e mantidos numa temperatura de 4-8°C até serem usados. O *1st strand enzyme mix* não precisa ser descongelado e pode ser colocado diretamente a 4-8°C. Misture a enzima por inversão diversas vezes e centrifugue rapidamente.
 6. Adicione os componentes da síntese de primeira fita na seguinte ordem: *HS enhancer* (2µl), *1st strand master mix* (5µl) e *1st strand enzyme mix* (2µl). Adicione os 9µl a cada amostra e mexa bem, virando o tubo de cima para baixo.
-

7. Incube a 42°C por 1 hora e resfrie a amostra a 4-8°C por ao menos 1 minuto. Mantenha as amostras nesta temperatura até a próxima incubação.
8. Inverta e gire de ponta cabeça o *1st strand nuclease mix* e coloque no gelo.
9. Adicione 2µl do *1st strand nuclease mix* à amostra, misture bem.
10. Incube a amostra a 37°C por 30 minutos e em seguida a 95°C por 5 minutos.
11. Resfrie a amostra a 4-8°C por pelo menos 1 minuto.

B) Síntese da segunda fita

1. Coloque a amostra a 4-8°C e permita descongelar se congelada.
2. Descongele o *Primer 2*, mexendo vigorosamente.
3. Adicione 1.0µl do *Primer 2*. Misture virando o tubo e girando.
4. Incube a amostra a 95°C durante 2 minutos, depois resfrie e mantenha a amostra a 4-8°C por pelo menos 2 minutos.
5. Descongele o *2nd Strand Master Mix* a 4-8°C. Mexa vigorosamente. O *2nd Strand Enzyme Mix* não requer descongelamento, mexa bem o tubo invertendo e girando e coloque a 4-8°C.
6. Adicione os componentes da síntese de segunda fita separadamente e na seguinte ordem: *2nd Strand Master Mix* (29µl), *2nd Strand Enzyme Mix* (1µl), adicione os 30µl da solução completa para cada amostra e mexa bem invertendo e girando o tubo.
7. Incube a amostra como o roteiro abaixo:
 - 25°C por 10 minutos
 - 37°C por 30 minutos
 - 70°C por 5 minutos
 - 4-8°C: Até o próximo passo (tempo máximo de 30 minutos)

C) Purificação de *cDNA*

1. Adicione 250µl do *DNA Binding Buffer (DB)* a uma coluna de purificação nova no tubo coletor que acompanha o kit. Incube durante 5 minutos á temperatura ambiente e centrifugue a 16,000 x g por um minuto.
2. Adicione 200µl do DB a um tubo da amostra da síntese de segunda fita , misture bem e pipete o volume total numa coluna de purificação
3. Para combinar o *cDNA*, centrifugue a 100 x g durante dois minutos , seguido imediatamente de centrifugação a 10,000 x g por um minuto e remova o sobrenadante.
4. Adicione 250µl do *DNA Wash Buffer (DW)* á coluna e centrifugue a 16,000 x g durante dois minutos. Cheque a coluna de purificação para qualquer tampão de lavagem residual, se sobrar, centrifugue novamente por mais 1 minuto na mesma velocidade.
5. Descarte o tubo coletor e o sobrenadante.
6. Coloque a coluna no tubo para microcentrífuga que acompanha o kit e cuidadosamente adicione 11µl do *DNA Elution Buffer (DE)* no centro da membrana da coluna de purificação. Gentilmente toque a ponta da pipeta na superfície da membrana enquanto dispensa o DE para garantir máxima absorção deste na membrana. Gentilmente toque a coluna de purificação para distribuir o tampão, se necessário.
7. Incube um minuto em temperatura ambiente.
8. Coloque cada junção coluna-tubo em um tubo de suporte de 2ml na centrífuga com a tampa do tubo de 0,5 ml fixando o tubo.
9. Centrifugue a 1000 x g por um minuto, seguido imediatamente por 16,000 x g por um minuto. Descarte a coluna e retenha a eluição contendo o *cDNA*.

D) Transcrição *in vitro*

1. Descongele o *IVT buffer*, *Master Mix* e o *HS enhancer* e coloque á temperatura ambiente (22-25°C) e mexa os frascos para dissolver todos os sólidos. O *IVT enzyme mix* pode ser colocado diretamente á temperatura de 4-8°C, mexendo somente o frasco por inversão.
2. Adicione os componentes da transcrição *in vitro* na seguinte ordem: *HS enhancer* (2µl), *IVT buffer* (2µl), *IVT master mix* (6µl), *IVT enzyme mix* (2µl), adicione os 12µl da solução completa á amostra, misturando bem.
3. Incube a 42°C durante 6 horas. Resfrie a amostra a 4-8°C.

Segundo dia

A) Síntese da primeira fita

1. Descongele a amostra a 4-8 °C se necessário.
2. Descongele o *Primer 2* mexendo vigorosamente de cima para baixo e mantenha a 4-8°C.
3. Adicione 1.0 µl do *Primer 2* ao aRNA eluído (produto do primeiro dia) e misture bem.
4. Incube a 65°C durante 5 minutos e resfrie as amostras a 4-8°C por pelo menos 1 minuto, antes de prosseguir.
5. Coloque os componentes da síntese de primeira fita a 4-8°C. O *1st Strand Master Mix* e o *HS enhancer* devem ser descongelados e mexidos de cima para baixo, até que todos os componentes sólidos estejam dissolvidos, e mantidos a uma temperatura de 4-8°C até serem usados. O *1st strand enzyme mix* não precisa ser descongelado e pode ser colocado diretamente a 4-8°C. Misture a enzima por inversão diversas vezes e centrifugue rapidamente.
6. Adicione os componentes da síntese de primeira fita na seguinte ordem: *HS enhancer* (2µl), *1st strand master mix* (5µl) e *1st strand enzyme mix* (2µl).

Adicione os 9µl a cada amostra e mexa bem , virando o tubo de cima para baixo.

7. Incube as amostras a 25°C por 10 minutos e a 37°C por 1 hora.

8. Resfrie a amostra a 4-8°C por ao menos 1 minuto.

B) Síntese da segunda fita

1. Coloque a amostra á 4-8°C e permita descongelar se congelada

2. Descongele o *Primer 3*, mexendo vigorosamente.

3. Adicione 1.0µl do *Primer 3* á amostra. Misture invertendo o tubo e girando.

4. Incube a amostra a 95°C durante 2 minutos, depois resfrie e mantenha a amostra a 4-8°C por pelo menos 1 minuto.

5. Descongele o *2nd Strand Master Mix* a 4-8°C. Agitar vigorosamente. O *2nd Strand Enzyme Mix* não requer descongelamento, agite bem o tubo invertendo e girando e coloque a 4-8°C.

6. Adicione os componentes da síntese de segunda fita separadamente e na seguinte ordem: *2nd Strand Master Mix*(29µl), *2nd Strand Enzyme Mix* (1µl), adicione os 30ml da solução completa para cada amostra e mexa bem invertendo e girando o tubo.

7. Incube a amostra como o roteiro abaixo:

- 37°C por 30 minutos
- 70°C por 5 minutos
- 4-8°C: Até o próximo passo (tempo máximo de 30 minutos)

C) Purificação do *cDNA*

1. Adicione 250µl do *DNA Binding Buffer (DB)* a uma coluna de purificação nova no tubo coletor que acompanha o kit. Incube durante 5 minutos á temperatura ambiente e centrifugue a 16,000 x g por um minuto.
2. Adicione 200µl do DB a um tubo da amostra da síntese de segunda fita, misture bem e pipete o volume total numa coluna de purificação.
3. Para combinar o *cDNA*, centrifugue a 100 x g durante dois minutos , seguido imediatamente de centrifugação a 10,000 x g por um minuto e remova o sobrenadante.
4. Adicione 250µl do *DNA Wash Buffer (DW)* á coluna e centrifugue a 16,000 x g durante dois minutos. Cheque a coluna de purificação para qualquer tampão de lavagem residual, se sobrar, centrifugue novamente por mais 1 minuto na mesma velocidade.
5. Descarte o tubo coletor e o sobrenadante.
6. Coloque a coluna no tubo para microcentrífuga que acompanha o kit e cuidadosamente adicione 11µl do *DNA Elution Buffer (DE)* no centro da membrana da coluna de purificação. Gentilmente toque a ponta da pipeta na superfície da membrana enquanto dispensa o DE para garantir máxima absorção deste na membrana. Gentilmente toque a coluna de purificação para distribuir o tampão, se necessário.
7. Incube a um minuto em temperatura ambiente.
8. Coloque cada junção coluna-tubo em um tubo de suporte de 2ml na centrífuga com a tampa do tubo de 0,5 ml fixando o tubo.
9. Centrifugue a 1000 x g por um minuto, seguido imediatamente por 16,000 x g por um minuto. Descarte a coluna e retenha a elução contendo o *cDNA*.

8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Adesina AM, Nguyen Y, Guanaratne P, Pulliam J, Lopez-Terrada D, Margolin J, Finegold M. Foxg1 is overexpressed in hepatoblastoma. *Human Pathology*. 2007 Mar; 38(3):400-9.

Adesina AM, Lopez-Terrada D, Wong KK, Gunaratne P, Nguyen Y, Pulliam J, Margolin J, Finegold MJ. Gene expression profiling reveals signatures characterizing histology subtypes of hepatoblastoma and global deregulation in cell growth and survival pathways. *Human Pathology*. 2009 Jun; 40(6):843-53.

Angus-Hill ML, Elbert KM, Hidalgo J, Capecchi MR. T-cell factor 4 functions as a tumor suppressor whose disruption modulates colon cell proliferation and tumorigenesis. *PNAS*. 2011; 108 (12):4914-19.

Aulmann S, Longerich T, Schirmacher P, Mechttersheimer G, Penzel R. Detection of the *ASPSCR1-TFE3* gene fusion in paraffin-embedded alveolar soft part sarcomas. *Histopathology*. 2007 Jun; 50 (7):881-6.

Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. WHO Classification of Tumors of the Digestive System. 4th ed. Lyon: IARC; 2010: 228-35.

Brotto M, Finegold MJ. Distinct patterns of p27/KIP1 gene expression in hepatoblastoma and prognostic implications with correlation before and after chemotherapy. *Human Pathology*. 2002; 33(2):198-205.

Cajaiba MM, Neves JI, Casarotti FF, de Camargo BB, Chap Chap P, Sredini ST, Soares FA. Hepatoblastoma and liver development: a study of cytokeratin immunoexpression in twenty nine hepatoblastomas. *Pediatr Dev Pathol*. 2006; 9(3):196-202.

Cohen MM Jr. Beckwith-Wiedemann Syndrome: Historical, clinicopathological, and etiopathogenetic perspectives. *Pediatric and Developmental Pathology*. 2005 May-Jun; 8(3):287-304.

Czauderma P, Otte JB, Aronson DC, Gauthier F, Mackinlay G, Roebuck D, Plaschkes J, Perilongo G. Guidelines for surgical treatment of hepatoblastoma in the modern era – Recommendations from the Childhood Liver Tumour Strategy Group of the International Society of Paediatric Oncology (SIOPEL). *European Journal of Cancer*. 2005 May; 41(7):1031-36.

Darbari A, Sabin KM, Shapiro CN, Schwarz KB. Epidemiology of primary hepatic malignancies in US children. *Hepatology* 2003 Sep; 38(3):560-6.

Dehner LP, Manivel JC. Hepatoblastoma: An analysis of the relationship between morphologic subtypes and prognosis. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1988; 10(4):301-7.

Eichenmüller M, Gruner I, Hagl B, Häberle B, Müller-Höcker J, von Schweinitz D, Kappler R. Blocking the hedgehog pathway inhibits hepatoblastoma growth. *Hepatology*. 2009 Feb; 49(2):482-90.

Emre S, McKenna G J. Liver tumors in children. *Pediatr Transplantation*. 2004 Dec; 8(6):632-8.

Feusner J, Plaschikes J. Hepatoblastoma and low birth weight: a trend or chance observation?. *Med Pediatr Oncol*. 2002 Nov; 39(5):508-9.

Finegold MJ, Lopez-Terrada DH, Bowen J, Washington MK, Qualman SJ. Protocol for the examination of specimens from pediatric patients with hepatoblastoma . *Arch Pathol Lab Med*. 2007 Apr; 131(4):520-9.

Fundação Oncocentro de São Paulo. Boletim do Registro Hospitalar de Câncer [on-line]. Ano IV. Boletim nº 21. Julho 2004. Available from: <http://www.fosp.saude.sp.gov.br>.

Fundação Oncocentro de São Paulo. Boletim do Registro Hospitalar de Câncer [on-line]. Ano 10. Boletim nº 44. Março 2010. Tumor Primário do Fígado e Vias Biliares Intra-Hepática. Available from: <http://www.fosp.saude.sp.gov.br>.

Gao H, Zhang ZB, Ou YL, Zhang KR, Wang WL. Genomic imbalance and chromosome disorders in hepatoblastoma. *Zhonghua Zong Liu Za Zhi*. 2006 Dec; 28(12):915-9.

Gilbert-Barness E (Editor): Potter's Pathology of the fetus, infant, child. Second edition. Mosby-Elsevier: Philadelphia 2007: 1257-59.

Gray SG, Eriksson T, Ekstrom C, Holm S, von Schweinitz D, Kogner P, Sandstedt B, Pietsch T, Ekstrom TJ. Altered expression of members of the IGF-axis in hepatoblastomas. *British Journal of Cancer*.2000; 82(9):1561-67.

Gray SG, Kytola S, Matsunaga T, Larsson C, Ekstrom TJ. Comparative genomic hybridizations reveals population-based genetic alterations in hepatoblastomas. *British Journal of Cancer*. 2000; 83(8):1020-5.

Halász J, Holczbauer A, Páska C, Kovács M, Benyó G, Verebely T, Schaff S, Kiss A. Claudin -1 and claudin-2 differentiate fetal and embryonal components in human hepatoblastoma. *Human Pathology*. 2006 May; 37(5):555-61.

Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet Journal of Rare diseases*. 2009 Oct 12;4:22.

Hass JE, Muczynski KA, Krailo M, Ablin A, Land V, Vietti TJ, Hammond GD. Histopathology and prognosis in childhood hepatoblastoma and hepatocarcinoma. *Cancer*. 1989 Sep 1; 64(5):1082-95.

Hass JE, Feusner JH, Finegold MJ.Small cell undifferentiated histology in hepatoblastoma may be unfavorable. *Cancer*. 2001Dec 15; 92(12):3130-4.

Helmberger TK, Ros PR, Mergo PJ, Tomczak R, Reiser MF. Pediatric liver neoplasms: a radiologic-pathologic correlation. *Eur Radiol*. 1999; 9(7):1339-47.

Hirschman BA, Pollock BH, Tomlinson GE. The spectrum of APC mutations in children with hepatoblastoma from Familial Adenomatous Polyposis kindreds. *The Journal of Pediatrics*. 2005 Aug; 147:263-6.

Honda S, Arai Y, Haruta M, Sasaki F, Ohira M, Yamaoka H, Horie H, Nakagawara A, Hiyama E, Todo S, Kaneki Y. Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypermethylation of the H19 differentially methylated region in hepatoblastoma. *British Journal of Cancer*. 2008; 99:1891-99.

Jeng YM, Wu MZ, Mao TL, Chang MH, Hsu HC. Somatic mutations of β -catenin play a crucial role in the tumorigenesis of sporadic hepatoblastoma. *Cancer Letters*. 2000 Apr 28; 152(1):45-51.

Koch A, Denkhaus D, Albrecht S, Leuschner I, Von Schweinitz D, Pietsch T. Childhood Hepatoblastoma s frequently carry a mutated degradation targeting box of the β -catenin gene. *Cancer Research*. 1999 Jan 15;59(2):269-73

Li YC, Deng YH, Guo ZH, Zhang MM, Zhu J, Pu CL, Xiang CP, Guo CB. Prognostic value of hedgehog signal component expressions in hepatoblastoma patients. *Eur J Med Res*. 2010; 15(11):468-74.

Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004; 20:781-810.

López-Terrada D, Gunaratne PH, Adesina AM, Pulliam J, Hoang DM, Nguyen Y, Mistretta TA, Margolin J, Finegold MJ. Histologic subtypes of hepatoblastoma are characterized by differential canonical Wnt and Notch pathway activation in DLK+ precursors. *Human pathology*. 2009 Jun; 40(6):783-94.

Luo JH, Ren B, Keryanov S, Tseng GC, Rao UN, Monga SP, Strom S, Demetris AJ, Nalesnik M, Yu YP, Ranganathan S, Michalopoulos GK. Transcriptomic and genomic analysis of human hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Hepatology*. 2006 Oct; 44(4):1012-24.

McLaughlin CC, Baptiste M.S, Schymura M.J, Nasca PC, Zdep MS. Maternal and infant birth characteristics and Hepatoblastoma . *Am J Epidemiol*. 2006 May 1; 163(9):818-28.

Montgomery E, Folpe AL. The diagnostic value of β -catenin immunohistochemistry. *Adv Anat Pathol*. 2005 Nov; 12(6):350-6.

Nagata T, Takahashi Y, Ishii Y, Asai S, Nishida Y, Murata A, Koshinaga T, Fukuzawa M, Hamazaki M, Asami K, Ito E, Ikeda H, Takamatsu H, Koike K, Kikuta A, Kuroiwa M, Watanabe A, Kosaka Y, Fujita H, Miyake M, Mugishima H. Transcriptional profiling in hepatoblastomas using high-density oligonucleotide DNA array. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2003 Sep; 145(2):152-60.

Nagata T, Nakamura M, Shichino H, Chin M, Sugito K, Ikeda T, Koshinaga T, Fukuzawa M, Inoue M, Mugishima H. Cytogenetic abnormalities in hepatoblastoma: report of two new cases and review of the literature suggesting imbalance of chromosomal regions on chromosomes 1, 4, and 12. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2005 Jan 1; 156(1):8-13.

Nakagawa Y, Shimano H, Yoshikawa T, Ide T, Tamura M, Furusawa M, Yamamoto T, Inoue N, Matsuzaka T, Takahashi A, Hasty AH, Suzuki H, Sone H, Toyoshima H, Yahagi N, Yamada N. TFE3 transcriptionally activates hepatic IRS-2, participates in insulin signaling and ameliorates diabetes. *Nature Medicine*. 2006 Jan; 12(1):107-13.

NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) [internet]. Bethesda; 2011[atualizado em 05 de junho de 2011 e citado em 27 de junho de 2011]. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene.

Nijman SM, Hijmans EM, El Messaoudi S, van Dongen MM, Sardet C, Bernards R. A functional genetic screen identifies TFE3 as a gene that confers resistance to the antri-proliferative effects of the retinoblastoma protein and transforming growth factor- β . *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Aug 4; 281(31):21582-7.

Oue T, Yoneda A, Uehara S, Yamanaka H, Fukuzawa M. Increased expression of the hedgehog signaling pathway in pediatric solid malignancies. *J Pediatr Surg*. 2010 Feb; 45 (2): 387-92.

Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A. Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 42(18):39684-95.

Parada LA, Limon J, Iliszko M, Czauderna P, Gisselsson D, Hoglund M, Kullendorff CM, Wiebe T, Mertens F, Johansson B. Cytogenetics of hepatoblastoma Further characterization of 1q rearrangements by fluorescence in situ hybridization : an international collaborative study. *Med Pediatr Oncol*. 2000 Mar; 34(3):165-70.

PCPGM.Partners.org [internet]. Boston: Partners Healthcare – Center for personalized genetic medicine - Harvard Medical School; 2011 [atualizado em 09 de junho de 2011 e citado em 21 de junho de 2011]. Available from: <http://pcpgm.partners.org/research-services/microarrays/affymetrix>.

Pontisso P, Barzon M, Basso GM, Cecchetti GM, Oerukibgi GM, Alberti A. Cytokeratins patterns in childhood primary liver tumors. *Int J Clin Lab Res*. 1993; 23(4): 225-7.

Ranganathan S, Tan X, Monga SP. Beta-catenin and Met deregulation in childhood hepatoblastomas. *Pediatric and Dev Pathol*. 2005 Jul-Aug; 8(4):435-47.

Roebuck DJ, Perilongo G. Hepatoblastoma: an oncological review. *Pediatr Radiol*. 2006 Mar; 36(3):183-6.

Ross H, Argani P. *Xp11* translocation renal cell carcinoma. *Pathology*. 2010 Jun; 42 (4):369-73.

Sagara Y, Miyata Y, Nomata K, Abe K, Eguchi J, Hayashi T, Sakai H, Kanda S, Kanetake H. *TFE3*-renal carcinoma in an adult patient: A case with strong expression of Phosphorylated hepatocyte growth factor (*HGFR*)/*Met*. *Pathology Research and Practice*. 2009; 205(1):57-61.

Sainati L, Leszl A, Stella M, Montaldi A, Perilongo G, Rugge M, Bolcato S, Iolascon A, Basso G. Cytogenetic analysis of hepatoblastoma: Hypothesis of cytogenetic evolution in such tumors and results of a multicentric study. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998 Jul 1; 104:39-44.

Schanater JM, Kohler SE, Lamers WH, von Schweinitz D, Aronson DC. Where do we stand with hepatoblastoma? A review. *Cancer*. 2003 Aug 15; 98 (4):668-7.

Stejskalová E, Malis J, Snajdauf J, Pýcha K, Urbánková H, Bajciová V, Starý J, Kodete R, Jarosová M. Cytogenetic and array comparative genomic hybridization analysis of a series of hepatoblastomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2009 Oct 15; 194(2): 82-87.

Stiller CA, Pritchard J, Steliarova-Foucher E. Liver cancer in European children: incidence and survival, 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer*. 2006 Sep; 42(13):2115-23.

Tanimura M, Matsui I, Abe J, Ikeda H, Kobayashi N, Ohira M, Yokoyama M, Kaneko M. Increased risk of hepatoblastoma among immature children with a lower birth weight. *Cancer Res.* 1998 Jul 15; 58(14):3032-5.

Terracciano LM, Bernasconi B, Ruck P, Stallmach T, Briner J, Sauter G, Moch H, Vecchione R, Pollice L, Pettinato G, Gürtl B, Ratschek M, De Krijger R, Tornillo L, Bruder E. Comparative Genomic Hybridization analysis of Hepatoblastoma reveals high frequency of X chromosome gains and similarities between epithelial and stromal components. *Human Pathology.* 2003 Sep; 34(9):864-71.

Tomizawa M, Saisho H. Signaling pathway of insulin-like growth factor-II as a target of molecular therapy for hepatoblastoma. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(40): 6531-35.

Toretsky JA, Zitomersky NL, Eskenazi AE, Voigt RW, Strauch ED, Sun CC, Huber R, Meltzer SJ, Schlessinger D. Glypican-3 expression in Wilms Tumor and Hepatoblastoma. *Journal of Pediatric Hematology Oncology.* 2001 Nov; 23(8):496-9.

Trobaugh-Lotrario AD, Tomlinson GE, Finegold MJ, Gore L, Feusner JH. Small cell undifferentiated variant of hepatoblastoma: adverse clinical and molecular features similar to rhabdoid tumors. *Pediatr Blood Cancer.* 2009 Mar; 52(3):328-34.

Tsuda M, Davis IJ, Argani P, Shukla N, McGill GG, Nagai M, Saito T, Laé M, Fisher DE, Ladanyi M. TFE3 fusions activate MET signaling by transcriptional up-regulation, defining another class of tumors as candidates for therapeutic MET inhibition. *Cancer Res.* 2007 Feb 1; 67(3):919-29.

Van Eyken P, Sciort R, Callea F, Ramaekers F, Schaart G, Desmet VJ. A cytokeratin-immunohistochemical study of hepatoblastoma. *Hum Pathol.* 1990; 21(3):302-8.

Von Horn H, Tally M, Kerstin H, Eriksson T, Ekström TJ, Gray SG. Expression levels of insulin-like growth factor binding proteins and insulin receptor isoforms in hepatoblastoma s. *Cancer Letters.* 2001; 162:253-60.

Wang LL, Filippi RZ, Zurakowski D, Archibald T, Vargas SO, Voss SD, Shamberger RC, Davies K, Kozakewich H, Perez-Atayde AR. Effects of neoadjuvant chemotherapy on hepatoblastoma: a morphologic and immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol.* 2010 Mar; 34(3):287-99.

Weksberg R, Nishikawa J, Caluseriu O, Fei YL, Shuman C, Wei C, Steele L, Cameron J, Smith A, Ambus I, Li M, Ray PN, Sadowski P, Squire J. Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1. *Human Molecular Genetics.* 2001 Dec 15; 10(26):2989-3000.

Wei Y, Fabre M, Branchereau S, Gauthier F, Perilongo G, Buendia MA. Activation of beta-catenin in epithelial and mesenchymal hepatoblastomas. *Oncogene*. 2000 Jan 27; 19(4):498-504.

Yamada S, Ohira M, Horie H, Ando K, Takayasu H, Suzuki Y, Sugano S, Hirata T, Goto T, Matsunaga T, Hiyama E, Hayashi Y, Ando H, Suita S, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Ohnuma N, Nakagawara A. Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: identification of high expression of the *PLK1* oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas. *Oncogene*. 2004 Aug 5; 23(35):5901-11.

Zerbini MCN, Sredini ST, Grier H, Cristofani LM, Latorre MRDO, Hollister KA, Alves VAF, Weinberg DS, Perez-Atayde AR. Primary malignant epithelial tumors of the liver in children: a study of DNA content and oncogene expression. *Pediatr Dev Pathol*. 1998; 1: 270-80.