
Gustavo Dib Dangoni

Alterações genéticas e epigenéticas em pacientes
com câncer pediátrico

Genetic and epigenetic alterations in patients with
pediatric cancer

São Paulo
2023

EXEMPLAR CORRIGIDO

Gustavo Dib Dangoni

Alterações genéticas e epigenéticas em pacientes
com câncer pediátrico

Genetic and epigenetic alterations in patients with
pediatric cancer

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do título de
Mestre em Ciências, na Área de Biologia
(Genética).

Orientadora: Ana Cristina Victorino
Krepischi

Coorientadora: Anne Caroline Barbosa
Teixeira

São Paulo

2023

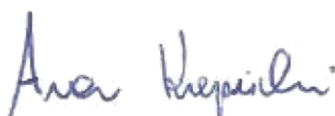
Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a) no formulário: '<https://biblioteca.ib.usp.br/ficha-catalografica/src/ficha.php>'

Dangoni, Gustavo Dib
Alterações genéticas e epigenéticas em pacientes com câncer pediátrico / Gustavo Dib Dangoni ; orientadora Ana Cristina Victorino Krepsichi ; coorientadora Anne Caroline Barbosa Teixeira -- São Paulo, 2023.
139 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Genética).

1. câncer pediátrico. 2. predisposição genética a câncer. 3. metilação do DNA. 4. FIV. I. , Ana Cristina Victorino Krepsichi, orient. II. , Anne Caroline Barbosa Teixeira, coorient. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação:
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228



Profa. Dra. Ana Cristina Victorino Krepsichi
(orientadora)

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Ana Cristina Victorino
Krepischi (orientadora)

Dedicatória

Dedico à minha família, que sempre me apoiou, incentivou e acreditou em mim. E aos pacientes e familiares que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família, João dos Santos, Maria Inês, Rodrigo, João Vitor e Sônia, que mesmo em Goiânia, sempre me apoiaram na jornada e desafio de morar sozinho. Se não fosse pelas inúmeras videochamadas, a saudade com certeza seria maior. Sem o apoio deles, seria impossível realizar o meu sonho de cursar o mestrado na Universidade de São Paulo. E à minha companheira, Angélica, por todo o apoio na etapa final deste projeto.

Toda essa jornada também seria impossível sem o apoio e ensinamentos da minha orientadora, Ana Cristina Victorino Krepischi. Muito obrigado por estar sempre presente, ser atenciosa, paciente e prestativa. Agradeço também à minha coorientadora, Anne Caroline Barbosa Teixeira, pelos ensinamentos e ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Também gostaria de agradecer os meus amigos de laboratório, Sara, Giovanna, Laura, Felipe, Gabriel e Fábio, por todo apoio, amizade e momentos especiais como o congresso da SBG e a clássica pausinha para o café que não poderia faltar. Seria difícil morar sozinho em uma cidade desconhecida sem a amizade de vocês, muito obrigado por todas as dicas para evitar os perrengues da vida adulta.

Agradeço aos pacientes e seus familiares que aceitaram participar deste trabalho; sendo considerados os pivôs do desenvolvimento científico na área médica. Espero ter contribuído no diagnóstico e na elucidação de possíveis causas moleculares do câncer de parte da coorte.

Aos colaboradores deste trabalho, Dr. Vicente Odone e Dra. Sofia Mizuho a quem nos confiou com as amostras de seus pacientes; e Dra. Mariana Maschietto pela ajuda nas análises de metilação. Ao corpo técnico do LGH – IB-USP e CEGH-CEL (Israel, Mara, Maraísa, Sílvia e Marília) que contribuíram de maneira significativa. Agradeço também os funcionários da secretaria de pós-graduação do IB-USP e alunos da comissão PROAP, todos foram de suma importância para essa trajetória.

Às agências de financiamento, CAPES (processo 88887.606266/2021-00) e FAPESP (processos 2018/21047-9 e 2018/05961-2), que foram cruciais para este trabalho e são fundamentais para o desenvolvimento científico no Brasil.

Resumo

DANGONI, Gustavo Dib. **Alterações genéticas e epigenéticas em pacientes com câncer pediátrico**. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências - Biologia Genética – Instituto de Biociências), Universidade de São Paulo, São Paulo 2023

O câncer pediátrico é um grupo complexo de doenças com etiologia multifatorial pouco elucidada. Diversos fatores de risco são associados com o desenvolvimento de tumores pediátricos, podendo ser demográficos, ambientais e/ou intrínsecos, como fatores genéticos. Parte dos casos é decorrente da presença de mutações germinativas altamente penetrantes em genes de predisposição a câncer. Adicionalmente, existe na literatura científica sugestão de associação de técnicas de reprodução assistida, como a fertilização *in vitro* (FIV), com aumento de risco de câncer pediátrico. Neste estudo, tivemos por objetivos a avaliação do impacto de fatores genéticos e epigenéticos na suscetibilidade ao câncer na infância. A primeira parte do estudo foi a análise de metilação de DNA (metiloma) de sangue periférico de 11 pacientes concebidos por FIV que desenvolveram câncer pediátrico, em comparação a grupos-controle, em busca de epivariantes potencialmente associadas com o risco de câncer pediátrico e FIV. Identificamos hipermetilação na região promotora do gene *LHX6* no metiloma do grupo de pacientes FIV, gene que é um provável supressor tumoral - este resultado nos levou a propor que tal epimutação pode ter contribuído para aumento do risco de câncer na infância no grupo de pacientes concebidos por FIV aqui avaliado. Tal achado é preliminar e baseia-se em análise de um grupo pequeno, embora raro, de pacientes; a investigação do padrão de metilação da região promotora do gene *LHX6* em grupo maior de crianças concebidas por FIV em comparação a controles poderia avaliar se tal modificação epigenética é um fenômeno que ocorre com frequência neste procedimento. A segunda parte do estudo realizado foi a análise de variantes germinativas raras potencialmente patogênicas de 22 pacientes com câncer pediátrico (sete deles do grupo gerado por FIV), sendo dez pacientes síndrômicos com fenótipos clínicos adicionais (síndrômicos) - por análise cromossômica por microarranjo e sequenciamento de exoma completo. Identificamos variantes germinativas raras,

classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas, em genes reconhecidos de predisposição ao câncer (*APC*, *LZTR1*, *MUTYH*, *PTEN*, *RB1*, *RECQL4*, *SQSTM1* e *TP53*) ou candidatos (*JAG1*, *KAT6A*, *SETD5* e *TNFRSF13B*) em 45% dos pacientes. Foi possível identificar variantes germinativas patogênicas ou provavelmente patogênicas em genes reconhecidos de predisposição com padrão de herança dominante, compatíveis com o respectivo tipo tumoral, em 14% dos pacientes (*APC*, *RB1*, *TP53*). Também foram detectadas variantes monoalélicas em genes reconhecidos de predisposição com padrão recessivo (*MUTYH* e *RECQL4*), em genes candidatos para a predisposição ao câncer (*JAG1*, *KAT6A*, *SETD5* e *TNFRSF13B*) e/ou tumores que não são associados com o respectivo gene de predisposição. Com base nos resultados da análise de variantes germinativas, propomos novas associações entre o gene *SETD5* com neuroblastoma; *PTEN* e leucemia mieloide aguda; *JAG1* e hepatoblastoma; *TNFRSF13B* e histiocitose de células de Langherans; *KAT6A* e astrocitoma. Em quatro dos dez pacientes síndrômicos com câncer pediátrico pudemos identificar variantes associadas de maneira causal ao quadro clínico completo; portanto, em 60% dos pacientes síndrômicos, o quadro clínico não foi totalmente elucidado, mesmo após a realização da análise cromossômica por microarranjo e sequenciamento de exoma completo. Em resumo, a identificação de hipermetilação na região promotora do gene *LHX6*, bem como de variantes germinativas em genes de predisposição ao câncer, reconhecidos e candidatos, contribuíram para o diagnóstico molecular de parte dos casos e para a elucidação de possíveis causas do câncer pediátrico, além da proposição de novas associações gene/subtipo tumoral.

Palavras-chave: câncer pediátrico; predisposição genética a câncer; metilação do DNA; FIV

Abstract

DANGONI, Gustavo Dib. **Alterações genéticas e epigenéticas em pacientes com câncer pediátrico**. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências - Biologia Genética – Instituto de Biociências), Universidade de São Paulo, São Paulo 2023

Childhood cancer is a complex and heterogeneous group of diseases with a yet not fully disclosed multifactorial etiology. Several risk factors are associated with childhood cancer, and they can be demographical, environmental, or intrinsic, such as genetic variants. It is recognized that part of the cases of childhood cancer arise due to highly penetrant mutations in cancer predisposition genes. Additionally, there are evidence in the scientific literature of an association between assisted reproductive technologies, such as *in vitro* fertilization (IVF), and increased risk of childhood cancer. In the present study, we aimed to analyze genetic and epigenetic factors associated with cancer susceptibility in childhood. In the first part of the study, we performed DNA methylation analysis (methylome) in peripheral blood of 11 patients conceived by IVF who developed childhood cancer, compared to control groups, to search for epivariants potentially associated with childhood cancer risk and IVF. We identified hypermethylation in the promoter region of *LHX6* in the methylome of patients conceived by IVF, a gene that is a potential tumor suppressor – this finding led us to propose that this epimutation may have contributed to an increased risk of childhood cancer in the group of patients conceived by IVF. This is a preliminary finding based on a small group of patients, albeit rare; the investigation of the methylation pattern of the promoter region of *LHX6* in a larger group of children conceived by IVF, compared to controls, could establish if this epigenetic modification is a phenomenon that frequently occurs in this procedure. Next, in the second part of the study, we screened 22 patients with childhood cancer (seven of them from the group conceived by IVF), ten of them were syndromic patients with additional clinical phenotypes (syndromic), for the presence of potentially pathogenic rare germline variants - by chromosomal microarray analysis and whole-exome sequencing. We detected rare germline variants classified as pathogenic or likely pathogenic in 45% of patients, mapped to known (*APC*, *LZTR1*, *MUTYH*, *PTEN*, *RB1*, *RECQL4*, *SQSTM1* e *TP53*) or candidate cancer

predisposition genes (*JAG1*, *KAT6A*, *SETD5* e *TNFRSF13B*). Pathogenic variants in known cancer predisposition genes with autosomal dominant inheritance, compatible with the respective tumor type, were detected in 14% of patients (*APC*, *RB1*, *TP53*). Monoallelic variants were also detected in known cancer predisposition genes with autosomal recessive inheritance (*MUTYH*, *RECQL4*), and candidate cancer predisposition genes (*JAG1*, *KAT6A*, *SETD5* e *TNFRSF13B*). Based on these results, we proposed new associations between *SETD5* and neuroblastoma; *PTEN* and acute myeloid leukemia; *JAG1* and hepatoblastoma; *TNFRSF13B* and Langerhans cell histiocytosis; *KAT6A* and astrocytoma. Four out of the 10 syndromic patients with childhood cancer carried pathogenic germline variants associated with the full clinical picture. Therefore, the phenotype of 60% of the syndromic patients was not fully elucidated even after chromosomal microarray analysis and whole-exome sequencing. The identification of the *LHX6* promoter region hypermethylation, as well as rare germline variants in cancer predisposition genes, were crucial for the molecular diagnosis of a portion of cases and elucidation of possible causes of childhood cancer, in addition to disclosing new tumor type/gene associations.

Keywords: childhood cancer; cancer genetic predisposition; DNA methylation; IVF

Lista de siglas

| | |
|------------------|--|
| AML | <i>Acute Myeloid Leukemia</i> |
| ART | <i>Assisted Reproductive Technologies</i> |
| B/LB | <i>Benign/Likely Benign</i> |
| B-ALL | <i>B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia</i> |
| ChAMP | <i>Chip Analysis Methylation Pipeline</i> |
| CMA | <i>Chromosomal Microarray Analysis</i> |
| CNS | <i>Central Nervous System</i> |
| CNV | <i>Copy Number Variant</i> |
| CPG | <i>Cancer Predisposition Gene</i> |
| DMP | <i>Differential Methylation Position</i> |
| DMRs | <i>Differential Methylation Region</i> |
| DNA _m | <i>DNA methylation</i> |
| DOHaD | <i>Developmental Origins of Health and Disease</i> |
| FIV | Fertilização <i>in vitro</i> |
| ICSI | Injeção intracitoplasmática |
| Indel | Inserção/Deleção |
| IVF | <i>In-Vitro Fertilization</i> |
| LCH | <i>Langerhans Cell Histiocytosis</i> |
| LMA | Leucemia Mieloide Aguda |
| LoF | <i>Loss-of-Function</i> |
| NOS | <i>Not Otherwise Specified</i> |
| P/LP | <i>Pathogenic/Likely Pathogenic</i> |
| P/PP | Patogênica/Provavelmente Patogênica |
| SNV | <i>Single Nucleotide Variant</i> |
| SV | <i>Structural Variant</i> |
| TRA | Tecnologias de Reprodução Assistida |
| VUS | <i>Variant of Uncertain Significance</i> |
| WES | <i>Whole-Exome Sequencing</i> |

Sumário

| | |
|---|-----|
| Capítulo 1. Introdução Geral | 13 |
| 1.1. O câncer pediátrico como doença..... | 13 |
| 1.2. Predisposição genética ao câncer | 15 |
| 1.3. Epigenética, fertilização <i>in vitro</i> e câncer pediátrico | 18 |
| 1.3.1. Metilação de DNA | 18 |
| 1.3.2. Origem da saúde e da doença no desenvolvimento (DOHaD) | 19 |
| 1.3.3. Tecnologias de reprodução assistida e fertilização <i>in vitro</i> (FIV)..... | 21 |
| Capítulo 2. Objetivos..... | 24 |
| 2.1. Objetivo geral..... | 24 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 24 |
| Capítulo 3. Metodologia e casuística | 25 |
| 3.1. Aspectos éticos | 25 |
| 3.2. Caracterização da casuística | 25 |
| 3.3. Delineamento experimental..... | 28 |
| 3.4. Metodologia..... | 29 |
| Capítulo 4. Metilação de DNA em pacientes com câncer pediátrico concebidos por fertilização <i>in vitro</i> | 32 |
| Capítulo 5. Predisposição a câncer em pacientes com tumores na infância..... | 54 |
| Capítulo 6. <i>JAG1</i> como gene de predisposição a hepatoblastoma - relato de caso | 88 |
| Capítulo 7. Discussão Geral e Conclusões | 102 |
| Referências Bibliográficas | 107 |
| ANEXOS | 118 |

Capítulo 1. Introdução Geral

1.1. O câncer pediátrico como doença

O câncer pediátrico (crianças e adolescentes 0-19 anos) é um grupo de doenças bastante heterogêneo, complexo, histologicamente e molecularmente distinto de tumores adultos, que apresenta uma etiologia multifatorial ainda pouco elucidada (ALEJANDRO SWEET-CORDERO et al., 2019). Em 2015, aproximadamente 397.000 crianças menores de 15 anos desenvolveram câncer em todo o mundo (WARD et al., 2019). As taxas de incidência e mortalidade apresentam variações significativas entre países desenvolvidos e países em desenvolvimento (JOHNSTON et al., 2020).

Indivíduos com câncer pediátrico de maneira geral apresentam um bom prognóstico, com uma sobrevida de 80% quando diagnosticados precocemente (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2023). No entanto, sobreviventes de câncer pediátrico podem apresentar efeitos adversos crônicos decorrentes do tratamento oncológico com radioterapia e quimioterapia, como também apresentam um risco 10x maior para o desenvolvimento de tumores secundários ao longo da vida (ARMENIAN; MEADOWS; BHATIA, 2015). O câncer pediátrico é uma das principais causas de morte em todo o mundo, com um crescimento da condição em anos recentes (FORCE et al., 2019). No Brasil, foram registrados 2.289 óbitos por câncer infanto-juvenil em 2020; e a incidência será de aproximadamente 7.930 casos por ano no próximo triênio (2023-2025), liderado pela região Sudeste, com 3.310 casos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2023).

A frequência dos tipos de neoplasias pediátricas difere bastante das que acometem adultos. As neoplasias com maior frequência na faixa etária de 0 a 14 anos são as leucemias (33% do total), seguido dos tumores do sistema nervoso central (16%), linfomas (14%), tumores de tecidos moles (6%), tumores de tecido epitelial (6%), tumores renais (4,5%), neuroblastoma (4%), tumores ósseos (4%), tumores de células germinativas (3%), retinoblastoma (2%), e tumores hepáticos (1%) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016). Considerando todas as faixas etárias (crianças, adultos e idosos), as leucemias

correspondem ao 15º tipo de câncer mais comum (JOHNSTON et al., 2020; SUNG et al., 2021).

O câncer em adultos se desenvolve em decorrência do risco cumulativo pela aquisição gradual de mutações genéticas e epigenéticas ao longo de várias décadas, modelo evidenciado pelo fato de que mais de 50% das neoplasias ocorrem em indivíduos com mais de 70 anos (KATTNER et al., 2019). Em contrapartida, tumores pediátricos se desenvolvem numa curta janela temporal, antes do acúmulo de quantidade substancial de (epi)mutações somáticas (FILBIN; MONJE, 2019). Conseqüentemente, há diferença na quantidade de mutações somáticas em tumores pediátricos, já demonstrada em estudos de *pan-cancer* como o de Gröbner e colaboradores (2018) que, ao comparar com tumores em adultos (KANDOTH et al., 2013), identificou que a média de mutações somáticas em 24 tipos de cânceres pediátricos (0,13 por milhão de bases - Mb) foi aproximadamente 14 vezes menor (1,8 por Mb). No mesmo estudo, os autores observaram um aumento no número de mutações conforme a idade do paciente, exceto em linfoma de Burkitt, e tumores com eventos de hipermutação decorrentes de quebras de fita dupla de DNA (GRÖBNER et al., 2018). Há também variações no número de mutações entre diferentes tipos de tumores pediátricos; no hepatoblastoma foi observado em média 0,02 mutações por Mb, enquanto no linfoma de Burkitt, o valor médio foi de 0,49 mutações por Mb (GRÖBNER et al., 2018). Outro estudo *pan-cancer* pediátrico, de Ma. e colaboradores (2018), obteve média de 0,17 mutações/Mb em leucemia mieloide aguda (LMA) e tumor de Wilms, enquanto osteosarcomas exibiram número muito maior (0,79 mutações/Mb).

Diversos fatores de risco estão associados com o desenvolvimento de tumores pediátricos. No entanto, a maioria desses fatores apresenta uma associação epidemiológica considerada fraca, e a etiologia assim permanece inconclusiva (SPECTOR; PANKRATZ; MARCOTTE, 2015). Apesar disso, há fatores cuja associação está bem estabelecida. Estes fatores podem ser demográficos, variando de acordo com a idade, sexo e etnia; ambientais, como altas doses de radiação ionizante e quimioterapia prévia; características intrínsecas, em particular baixo e alto peso ao nascer, presença de malformações congênitas e idade dos pais (O'NEILL et al., 2015; SPECTOR; PANKRATZ; MARCOTTE, 2015; PLON; LUPO, 2019; SCHRAW et al., 2020). Além dos fatores de risco mencionados, também existem casos

decorrentes da presença de uma mutação altamente penetrante em gene de predisposição ao câncer.

Há documentação de forte associação entre malformações congênitas e aumento de risco de câncer pediátrico (LUPO et al., 2019; SCHRAW et al., 2020). O aumento de risco existe tanto para crianças com anomalias congênitas causadas por alterações cromossômicas quanto para os casos de malformações congênitas não associadas a cromossomopatias. Neste último grupo, há um aumento de 2,5x de risco de câncer em comparação a crianças sem malformações congênitas, enquanto crianças com 4 ou mais malformações congênitas graves apresentam um aumento de risco de 5,9x (LUPO et al., 2019). Particularmente, malformações congênitas estão associadas com um maior risco de tumores embrionários e de células germinativas, bem como idade de diagnóstico precoce em pacientes com leucemias, astrocitoma e tumores embrionários que não são do sistema nervoso central (FISHER et al., 2012; LUPO et al., 2019; SCHRAW et al., 2020).

1.2. Predisposição genética ao câncer

Embora a grande maioria dos casos de câncer ocorram esporadicamente, sob um modelo multifatorial, aproximadamente 8% dos casos de câncer em adultos são decorrentes da presença de mutações germinativas altamente penetrantes em genes de predisposição a câncer, que atuam em modelo similar ao de doenças monogênicas (HUANG et al., 2018). Assim, a predisposição genética é significativamente associada ao desenvolvimento de uma parcela dos casos de câncer pediátrico (KRATZ et al., 2021).

Genes de predisposição ao câncer podem ser definidos como aqueles cujas variantes germinativas raras (frequência alélica <1% na população) e patogênicas contribuem de maneira moderada a elevada para aumento do risco de câncer (RAHMAN, 2014), em contexto predominantemente monogênico. Essas variantes gênicas podem ser alterações de nucleotídeo único (*single nucleotide variant* - SNV), pequenas inserções e deleções (*indels*), ou ainda variantes estruturais (SV), incluindo variações no número de cópias (*copy number variant* - CNV).

No espectro do câncer pediátrico, há a ocorrência de casos em contexto de síndromes de predisposição ao câncer, que apresentam subtipos próprios em relação

aos diferentes tipos de câncer pediátrico, como por exemplo na síndrome de Li-Fraumeni (OMIM #151623). Para se considerar a possibilidade de predisposição hereditária em um caso de câncer infantil, é necessário levar em consideração fatores como: (1) a quantidade de casos de câncer na família, bem como a idade em que os mesmos foram diagnosticados; (2) o tipo de câncer e/ou características que podem ser associadas a uma determinada síndrome de câncer hereditária; (3) presença de variantes germinativas patogênicas de predisposição ao câncer; (4) ocorrência de outras neoplasias malignas; (5) fenótipos clínicos, como anomalias congênitas, dismorfismos faciais, atraso no desenvolvimento ou outras anomalias; (6) reações adversas à terapias no tratamento do câncer (JONGMANS et al., 2016; RIPPERGER et al., 2017).

Zhang e colaboradores (2015) analisaram a presença de mutações germinativas patogênicas ou provavelmente patogênicas (P/PP) em 60 genes de predisposição reconhecidos e com herança autossômica dominante em 1120 pacientes com câncer pediátrico. Variantes patogênicas foram detectadas em 95/1120 pacientes (frequência de 8,5%), sendo *TP53* (53%), *APC* (6%) e *BRCA2* (6%) os genes mais frequentemente identificados. Posteriormente, Gröbner e colaboradores (2018) obtiveram uma prevalência similar de 7,6% avaliando 914 pacientes em uma coorte com sobreposição parcial com o estudo anterior. Após a correção para a incidência relativa dos tipos de câncer pediátrico investigados, foi estimado que aproximadamente 6% (GRÖBNER et al., 2018) dos pacientes com câncer pediátrico apresentam como fator etiológico principal uma variante germinativa patogênica em um gene de predisposição ao câncer reconhecido. Além disso, em comparação com o estudo anterior, três novos genes emergiram como associados com aumento de risco de câncer em crianças (*LZTR1*, *TSC2* e *CHEK2*).

Os genes de predisposição ao câncer observados por Zhang e colaboradores (2015) foram adaptados para uma rede de co-expressão desenvolvida por Savary e colaboradores (2020). Foi observado que a maioria dos genes não se encontrava exclusivamente mutados em um histotipo, porém em diferentes tipos de tumores pediátricos e, assim como nos estudos anteriores (ZHANG et al., 2015; GRÖBNER et al., 2018), as variantes germinativas patogênicas estão em genes associados com a regulação do ciclo celular e o reparo do DNA. Em específico, as leucemias agudas, responsáveis por grande parte dos tumores pediátricos, apresentaram forte

associação com genes responsáveis por processos epigenéticos e pós-transcricionais como metilação do DNA, processamento de mRNA e modificação de histonas (BOLOURI et al., 2018; RAHMANI et al., 2018; SAVARY et al., 2020).

Recentemente, von Seding e colaboradores (2021) encontraram uma frequência menor de variantes germinativas patogênicas na coorte estudada [em 3,8% (30/790 pacientes)], no entanto, a análise foi realizada em apenas 21 genes de predisposição ao câncer (os mesmos nos quais Zhang e colaboradores detectaram mutações P/PP). Outra explicação para a menor frequência identificada seria o fato da coorte de von Seding e colaboradores (2021) possuir apenas um paciente com tumor de córtex adrenal, tipo tumoral com proporção elevada tanto na coorte de Zhang e colaboradores (2015), quanto na coorte de Gröbner e colaboradores (2018). Por outro lado, Newman e colaboradores (2021) identificaram variantes P/PP localizadas em genes de predisposição ao câncer em 18% de uma coorte de 309 pacientes. Outro achado importante desse estudo foi que 55% das variantes afetaram genes de predisposição que não eram associados com o tipo tumoral dos pacientes, por exemplo, um paciente com glioma pontino intrínseco difuso no qual foi detectada uma variante germinativa patogênica em *BRCA2*.

Sylvester e colaboradores (2022), utilizando sequenciamento de exoma completo, analisaram 176 genes de predisposição ao câncer reconhecidos, encontrando uma frequência de 25% de variantes germinativas patogênicas (19 de 76 pacientes). Dentre os 19 casos com variantes patogênicas, mais da metade (10) se tratava de genes de predisposição sem qualquer associação com os respectivos tipos tumorais. Paralelamente, estes autores também pesquisaram variantes em 145 genes candidatos a predisposição ao câncer, 513 genes associados por mutações somáticas com o câncer, e 214 genes de reparo do DNA. Posteriormente, selecionaram 13 variantes para uma análise aprofundada e estabeleceram que a variante Ser321fs, no gene *AXIN1*, seria capaz de alterar a regulação dos níveis de beta-catenina, contribuindo com o desenvolvimento de linfoma em dois irmãos (SYLVESTER et al., 2022).

Como resultado, fica claro que também no âmbito do câncer pediátrico a identificação de variantes patogênicas em genes de predisposição ao câncer pode ter impacto para pacientes e seus familiares, por meio do aconselhamento genético

adequado e manejo clínico, como exames periódicos e eventual direcionamento para terapias específicas.

1.3. Epigenética, fertilização *in vitro* e câncer pediátrico

Epigenética se refere ao estudo das mudanças que modulam a expressão genômica de indivíduos sem alterar a sequência primária do DNA, possibilitando o estabelecimento de programas celulares específicos de expressão em diferentes tecidos (TOLLEFSBOL, 2017), especialmente durante a embriogênese e desenvolvimento infanto-juvenil. As principais modificações epigenéticas associadas com o câncer são: metilação de DNA, desmetilação do DNA, modificações de histonas (acetilação, deacetilação, metilação, desmetilação e fosforilação) e a regulação por RNA's não codificadores (DAWSON; KOUZARIDES, 2012; TOLLEFSBOL, 2017). O padrão epigenético é tecido específico, conferindo a identidade funcional dos diferentes tipos celulares; também está vinculado a um contexto temporal de desenvolvimento tecidual e de organogênese, modificando-se ao longo da vida.

1.3.1. Metilação de DNA

A metilação de DNA, uma das modificações epigenéticas mais estudadas, envolve a atividade de enzimas DNA-metiltransferases, que criam o nucleotídeo 5-metilcitosina pela transferência de um grupo metila da S-adenosilmetionina para o carbono 5 de um resíduo de citosina (MOORE; LE; FAN, 2013). A metilação do DNA é considerada um mecanismo crucial para regulação da expressão gênica e está sob constante influência de fatores ambientais, sendo associada ao metabolismo, diferenciação celular, desenvolvimento embrionário, evolução e adaptação, inativação do cromossomo X, regeneração tecidual, *imprinting* genômico, envelhecimento, e câncer (KULIS; ESTELLER, 2010; BIANCO-MIOTTO et al., 2017; TOLLEFSBOL, 2017; NISHIYAMA; NAKANISHI, 2021). A maior parte da metilação de DNA ocorre em citosinas anteriores a guanina, - também conhecidos como sítios CpG -, que se encontram vastamente distribuídos pelo genoma (BIRD et al., 1985). Dependendo das diferenças nos padrões de metilação, um gene pode ter sua expressão aumentada ou diminuída (WATANABE; MAEKAWA, 2010; SAGHAFINIA et al., 2018).

Cerca de 60% dos genes humanos possuem ilhas CpG em regiões promotoras de transcrição, que ao serem metiladas, bloqueiam a transcrição (KULIS; ESTELLER, 2010). A metilação de ilhas CpG geralmente está restrita à inativação estável de genes que devem estar silenciados por longo período, como por exemplo, genes de *imprinting*, genes do cromossomo X inativo e genes de expressão restrita a células germinativas (JONES, 2012). A metilação também pode ocorrer em outros locais, como no corpo gênico, resultando no aumento da expressão gênica (YANG et al., 2014), em *enhancers*, que modulam a expressão gênica, e também em *insulators*, que são elementos que bloqueiam as interações entre *enhancers* e regiões promotoras (LISTER et al., 2009; JONES, 2012).

Alterações afetando o padrão de metilação de DNA reconhecidamente podem acarretar aumento de risco para doenças, em particular câncer (SAGHAFINIA et al., 2018). Em células normais, as regiões de heterocromatina, constituídas por sequencias repetitivas, em geral, estão metiladas e silenciadas. Entretanto, em muitos tumores, é possível observar a hipometilação de sequencias repetitivas, afetando sua compactação, bem como levando à reativação de elementos de transposição e instabilidade genômica (KULIS; ESTELLER, 2010; NISHIYAMA; NAKANISHI, 2021). Antagonicamente, a hipermetilação também é observada frequentemente em células cancerosas, particularmente em regiões promotoras gênicas, levando à repressão transcricional de genes supressores tumorais (KULIS; ESTELLER, 2010; JONES, 2012; NISHIYAMA; NAKANISHI, 2021).

1.3.2. Origem da saúde e da doença no desenvolvimento (DOHaD)

A origem da saúde e da doença no desenvolvimento (DOHaD, do inglês, *Developmental Origins of Health and Disease*) é uma hipótese na qual fatores ambientais durante o desenvolvimento *in utero* e na infância podem aumentar a suscetibilidade do indivíduo para desenvolvimento de doenças (BARKER, 2007). Essa hipótese foi proposta a partir da observação de que o baixo peso ao nascer, resultante de desnutrição *in utero* e outros fatores ambientais, representa um risco maior no desenvolvimento de doenças cardiovasculares no adulto (BARKER et al., 1989; BARKER, 2007).

A primeira associação de que fatores ambientais durante o período gestacional influenciavam no fenótipo da prole foi documentada por Ravelli e colaboradores (1976). No estudo, foram analisados 307.700 homens de 19 anos que foram expostos, em períodos pré-natais ou pós-natais, a uma época de escassez alimentar na Holanda durante a Segunda Guerra Mundial. Foi observado que indivíduos expostos a desnutrição materna durante o primeiro trimestre de desenvolvimento apresentavam uma maior incidência de obesidade, enquanto indivíduos expostos durante o último trimestre de gestação e primeiros meses de vida apresentavam uma baixa incidência de obesidade (RAVELLI; STEIN; SUSSER, 1976). Na China, também durante um período de escassez alimentar, foi observado que mulheres expostas a desnutrição durante o desenvolvimento pré-natal apresentavam uma maior incidência de diabetes tipo 2, hipertensão e câncer de mama (HE et al., 2017; LIU et al., 2017; MENG et al., 2018).

Do ponto de vista molecular, modificações epigenéticas são responsáveis pela programação do desenvolvimento embrionário no contexto da DOHaD (BIANCO-MIOTTO et al., 2017). Durante a embriogênese, logo após a fertilização, ocorre a reprogramação epigenética. Na reprogramação epigenética, padrões de metilação do DNA e modificações de histona são apagados, com exceção de regiões de *imprinting*, reprogramando as células em totipotentes e pluripotentes; estes padrões epigenéticos são reestabelecidos de maneira diferente, permitindo uma diferenciação celular específica (MORGAN et al., 2005; WALKER; HO, 2012; CANTONE; FISHER, 2013).

A reprogramação epigenética no campo da DOHaD pode ser explicada pela hipótese do fenótipo poupador (*thrifty phenotype hypothesis*), em que o ambiente *in utero* é capaz de promover modificações epigenéticas, em locais onde padrões de metilação foram apagados, preparando a prole para um ambiente específico. No caso da escassez alimentar na Holanda, o epigenoma do embrião teria sido reprogramado/adaptado para um ambiente com desnutrição no futuro; entretanto, após o nascimento havia abundância de alimentos, diferença crucial que provavelmente levou ao desenvolvimento de obesidade e diabetes tipo 2 na idade adulta (WALKER; HO, 2012; HALES; BARKER, 2013).

Os cânceres hormônios-dependentes dos sistemas reprodutores masculino e feminino, assim como o câncer de mama, também apresentam evidências significativas da influência de fatores ambientais pré-natais na reprogramação

epigenética. Diferenças de peso ao nascer, níveis elevados de hormônios como testosterona, estrogênio, somatomedina C e xenoestrógenos podem estar associados a um maior risco de desenvolvimento de câncer de mama, próstata, cérvix e testículo (ERIKSSON et al., 2007; ROHRMANN et al., 2009; WALKER; HO, 2012; HE et al., 2017).

Um outro exemplo a ser citado advém do próprio câncer pediátrico: o baixo peso ao nascer é um fator de risco importante para o desenvolvimento de hepatoblastoma, um câncer embrionário de fígado (MCLAUGHLIN et al., 2006). Portanto, há um acúmulo de evidências de que o ambiente *in utero* é delicado e suscetível a fatores externos, que podem alterar o desenvolvimento embrionário, quando de efeito muito drástico, ou aumentar os riscos de desenvolvimento de diversas doenças, incluindo câncer, após o nascimento (MCLAUGHLIN et al., 2006; BARKER, 2007; WALKER; HO, 2012; MENG et al., 2018).

1.3.3. Tecnologias de reprodução assistida e fertilização *in vitro* (FIV)

O primeiro nascimento pelo uso de tecnologias de reprodução assistida (TRAs), mais especificamente fertilização *in vitro* (FIV), ocorreu em 1978, uma inovação relativamente recente que revolucionou a medicina. Desde então, é estimado que cerca de 9 milhões de bebês nasceram no mundo por FIV (EUROPEAN SOCIETY OF HUMAN REPRODUCTION AND EMBRYOLOGY, 2020). No Brasil, foram congelados 99.112 embriões e realizados 43.956 ciclos de FIV em 2019, sendo apenas o estado de São Paulo responsável por 48% de todos os ciclos de FIV (ANVISA, 2019).

O uso de TRAs ou medicamentos hormonais para fertilização resulta em aumento de risco de complicações perinatais em neonatos, como baixo peso, nascimento prematuro e malformações congênitas (HANSEN et al., 2013; PINBORG et al., 2013; QIN et al., 2016). Uma meta-análise publicada por Hansen e colaboradores (2013) identificou que crianças nascidas após o uso de TRAs apresentam um aumento de 32% no risco de problemas ao nascimento.

Além disso, TRAs podem alterar padrões de *imprinting* durante a reprogramação epigenética na embriogênese (VENTURA-JUNCÁ et al., 2015). Técnicas como a injeção intracitoplasmática de esperma (ICSI) já foram associadas com a síndrome de Beckwith-Wiedemann (DEBAUN; NIEMITZ; FEINBERG, 2003;

CHANG et al., 2005) e a síndrome de Angelman (COX et al., 2002; ØRSTAVIK et al., 2003).

Assim, pode-se argumentar que TRAs poderiam interferir no desenvolvimento embrionário e aumentar também o risco para outras doenças após o nascimento, como o câncer. No entanto, a associação entre tecnologias de reprodução assistida e câncer pediátrico ainda é controversa. Spaan e colaboradores (2019) reportaram não haver aumento no risco de câncer em crianças concebidas por tecnologias de reprodução assistida em geral; entretanto, tecnologias específicas, como ICSI ou criopreservação, apresentavam um pequeno aumento, porém não significativo. Hargreave e colaboradores (2019) também não encontraram associações estatisticamente significantes entre câncer pediátrico e medicamentos para fertilidade, infertilidade materna e outros tipos de tecnologias de reprodução assistida como FIV e ICSI; no entanto, observaram uma associação com criopreservação.

Em contrapartida, Hargreave e colaboradores (2013) indicaram, em um estudo prévio, que tecnologias de reprodução assistida e medicamentos de fertilização estariam associadas com um maior risco de câncer pediátrico, especificamente de leucemias, neuroblastoma e retinoblastoma. Do mesmo modo, outros dois estudos (KÄLLÉN et al., 2010; SPECTOR et al., 2019) identificaram uma associação de nível reduzido, porém estatisticamente significativa, entre FIV e câncer pediátrico.

As duas meta-análises mais recentes, publicadas em 2019, são discordantes. Gilboa e colaboradores (2019) não observaram um aumento no risco de câncer pediátrico em pacientes concebidos por tecnologias de reprodução assistida em geral, ou FIV em particular. Por outro lado, Wang e colaboradores (2019), em seus achados, identificaram que crianças concebidas por tratamentos de fertilidade apresentavam maior risco de desenvolvimento de câncer pediátrico, malignidades hematológicas e tumores sólidos.

Todavia, há limitações na maioria dos estudos utilizados nas meta-análises. Fatores como infertilidade e idade dos pais, sexo, associação entre alterações genéticas e epigenéticas, baixo peso ao nascer e fatores ambientais como tabagismo e consumo de álcool na gestação podem influenciar na variação do risco de câncer pediátrico associado com tecnologias de reprodução assistida (WANG et al., 2019). Considerando que este tópico ainda é debatido na literatura científica, é essencial o

desenvolvimento de estudos complementares para investigar se tecnologias de reprodução assistida específicas, como criopreservação de embriões, ICSI e FIV, contribuem para o aumento do risco de câncer, assim como estudos que abordem potenciais mecanismos epigenéticos subjacentes a tais associações (SPECTOR et al., 2019; WANG et al., 2019).

Este estudo está inserido em projeto de pesquisa realizado sob coordenação da orientadora principal com financiamento FAPESP (FAPESP 2018/21047-9).

Capítulo 2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Este estudo teve por objetivo a avaliação de fatores genômicos e epigenômicos associados ao desenvolvimento de câncer na infância, investigando (1) modificações epigenéticas e (2) variantes genéticas germinativas.

2.2. Objetivos específicos

- a. Investigação de modificações epigenéticas pela análise de metilação de DNA (DNAm) de sangue periférico em grupo de pacientes com câncer na infância que tenham sido concebidos por FIV em comparação a grupo-controle de indivíduos hígidos pareados por sexo e idade - identificação de sítios genômicos CpG e regiões genômicas diferencialmente metiladas por microarranjo de metilação (Infinium MethylationEPIC);
- b. Investigação de variantes germinativas raras e potencialmente patogênicas em grupo de pacientes com câncer na infância, parte deles com anomalias congênitas - avaliação de variantes de número de cópias genômicas (CNVs) por microarranjo genômico e variantes de nucleotídeo único (*single nucleotide variant* - SNV) e pequenas inserções e deleções (indel) por sequenciamento de exoma.

Capítulo 3. Metodologia e casuística

3.1. Aspectos éticos

Este estudo foi conduzido de acordo os critérios da Comissão Nacional de Ética e Pesquisa-CONEP, incluindo a obtenção do consentimento livre e esclarecido dos responsáveis legais, tratando-se de estudo misto (retrospectivo e prospectivo). Parte da casuística já contava com material biológico coletado e armazenado derivado de projetos anteriores do grupo (sob guarda da Dra. Ana Krepischi no IB-USP). Os pacientes foram referidos pelo Instituto de Tratamento do Câncer Infantil - ITACI-FMUSP (grupo do Dr. Vicente Odone Filho e Dra. Sofia Mizuho Miura Sugayama). A inclusão dos pacientes no estudo ocorreu por meio de projeto previamente aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP (CAAE 47277115.0.0000.0068). Os resultados genômicos com relevância médica reconhecida foram avaliados em conjunto com médicos geneticistas da Instituição colaboradora. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição à qual está diretamente vinculado (Instituto de Biociências da USP - CAAE 09163818.4.0000.5464) – **ANEXO A**.

Contamos com a colaboração da Dra. Sofia Mizuho Miura Sugayama e do Dr. Vicente Odone Filho (ITACI-FMUSP), e da Dra Debora Bertola (Instituto da Criança e do Adolescente – ICr-FMUSP) para avaliação clínica dos pacientes encaminhados.

3.2. Caracterização da casuística

A casuística foi composta por 26 indivíduos com câncer (**Tabela 1**), sendo 11 deles pacientes gerados por FIV que desenvolveram neoplasias na infância. A descrição clínica detalhada destes pacientes se encontra nos Capítulos 4 e 5, nos quais os resultados estão descritos.

No estudo de exoma, foram também sequenciadas amostras dos genitores de 16 probandos. Em outros dois probandos, apenas a amostra materna foi sequenciada.

Como primeiro grupo-controle para o estudo de DNAm, foram utilizadas amostras de DNA previamente coletadas e armazenadas no laboratório, com termo

de consentimento para guarda e uso em outros projetos, de 12 indivíduos hígidos, pareados com o grupo FIV por idade e sexo. O segundo grupo-controle foi composto por dados previamente obtidos de metiloma de sangue periférico de cinco indivíduos com neuroblastoma pediátrico (dados fornecidos pelo ITACI-FMUSP) e de 11 crianças com leucemia mieloide aguda (dados recuperados do banco de dados público GEO - EDGAR; DOMRACHEV; LASH, 2002, sob o número de acesso GSE124413).

Critérios de inclusão:

- i. Pacientes com câncer pediátrico com quadro clínico não claramente atribuível a uma síndrome de predisposição a câncer reconhecida; pacientes com câncer pediátrico e sinais clínicos adicionais (sindrômicos); pacientes concebidos por FIV que desenvolveram tumores na infância
- ii. Material adequado disponível (qualidade aceitável de DNA e quantidade suficiente para realização dos estudos);
- iii. Histórico clínico documentado (incluindo as informações referentes à existência de outros casos de câncer na família).

Critério de exclusão:

- i. História de transplante de medula ou outra condição que resulte em diferenças de origem genética entre o DNA de leucócitos obtido e o DNA do paciente no momento da coleta de sangue para o estudo.

Tabela 1. Descrição da casuística

| ID original | ID-1 (Estudo de metilação) | ID-2 (Estudo de predisposição) | Tipo Tumoral | Sexo | Características sindrômicas | História familiar de câncer | Idade no diagnóstico (Anos) | Análise de Microarranjo | Análise de Exoma | Análise de Metilação |
|-------------|-------------------------------|-----------------------------------|--|------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------|
| FIV1 | P4 | P8 | Leucemia mieloide aguda | M | Não | Não | 14.5 | Probando | Probando | Sim |
| FIV2 | P6 | n.a. | Neuroblastoma | F | Não | Não | 1.8 | Não | Não | Sim |
| FIV3 | P11 | P13 | Melanoma | F | Não | Não | 8.5 | Probando/genitores | Probando/genitores | Sim |
| FIV4 | P10 | P21 | Astrocitoma | F | Não | Não | 4.6 | Probando/genitores | Probando/genitores | Sim |
| FIV5 | P5 | n.a. | Leucemia mieloide aguda | M | Não | Não | 10.2 | Não | Não | Sim |
| FIV6 | P1 | n.a. | Leucemia linfóide aguda de células B | F | Não | Não | 7.0 | Não | Não | Sim |
| FIV8 | P7 | P3 | Neuroblastoma | M | Não | Não | 3.6 | Probando/genitores | Probando/genitores | Sim |
| FIV9 | P2 | n.a. | Leucemia linfóide aguda de células B | F | Não | Não | 6.0 | Não | Não | Sim |
| FIV10 | P9 | P17 | Ganglioneuroma | M | Não | Não | 2.7 | Probando | Probando | Sim |
| FIV11 | P8 | P1 | Neuroblastoma | F | Não | Não | 1.4 | Probando/genitores | Probando/genitores | Sim |
| FIV12 | P3 | P6 | Leucemia linfóide aguda de células B | F | Não | Não | 1.9 | Probando/genitores | Probando/genitores | Sim |
| TP1 | n.a. | P9 | Leucemia mieloide aguda | F | Sim | Sim | n.a. | Probando | Não | Não |
| TP2 | n.a. | P10 | Carcinoma de ovário | F | Não | Sim | 2.2 | Probando | Probando | Não |
| TP3 | n.a. | P18 | Ganglioglioma | M | Não | Sim | 2.4 | Probando/genitores | Probando/genitores | Não |
| TP4 | n.a. | P19 | Tumor embrionário do SNC | F | Não | Não | 6 | Probando/genitores | Probando/genitores | Não |
| TP6 | n.a. | P5 | Neuroblastoma | F | Não | n.a. | 2.1 | Probando/genitores | Probando/genitores | Não |
| TP7 | n.a. | P20 | Astrocitoma | M | Sim | n.a. | 14 | Probando/genitores | Probando/genitores | Não |
| TP10 | n.a. | P7 | Leucemia linfóide aguda de células B | M | Sim | Sim | 0.8 | Probando/genitores | Probando/genitores | Não |
| TP13 | n.a. | P14 | Tumor de Wilms | M | Sim | n.a. | 2.8 | Probando/genitores | Probando/genitores | Não |
| TP14 | n.a. | P4 | Neuroblastoma | F | Sim | Sim | 2 | Probando/genitores | Não | Não |
| TP15 | n.a. | P2 | Neuroblastoma | M | Sim | Sim | 1.8 | Probando/mãe | Probando/mãe | Não |
| TP16 | n.a. | P22 | Astrocitoma | M | Sim | Sim | 0.3 | Probando/genitores | Probando/genitores | Não |
| TP17 | n.a. | P16 | Histiocitose de células de Langerhans | M | Sim | Sim | 2.1 | Probando/genitores | Probando/genitores | Não |
| TP18 | n.a. | P12 | Retinoblastoma bilateral | F | Sim | Não | 1.5 | Probando/mãe | Probando/mãe | Não |
| TP19 | n.a. | P15 | Histiocitose de células de Langerhans | M | Não | n.a. | 2.8 | Probando/genitores | Probando/genitores | Não |
| HB87 | n.a. | P11 | Hepatoblastoma | M | Sim | n.a. | 2.1 | Probando/genitores | Probando/genitores | Não |

n.a. = não aplicável

3.3. Delineamento experimental

A estratégia da pesquisa (**Figura 1**) constituiu no direcionamento das amostras de DNA genômico para dois braços de estudo: (a) análise de DNAm diferencial de sangue periférico de coorte de 11 pacientes afetados por neoplasias pediátricas, que foram concebidos por FIV, em comparação a grupos-controle, utilizando microarranjo de metilação (plataforma Infinium MethylationEPIC) - resultados descritos no **Capítulo 4**; (b) *screening* de variantes germinativas potencialmente patogênicas por microarranjo genômico e sequenciamento de exoma em grupo de 22 pacientes com câncer pediátrico e seus genitores (dois genitores em n=16 casos; um genitor em n=2 casos), sendo que dez pacientes exibiam fenótipos clínicos adicionais (sindrômicos – descrição clínica detalhada no **ANEXO B**). Os resultados dessa análise estão descritos nos **Capítulos 5 e 6**.

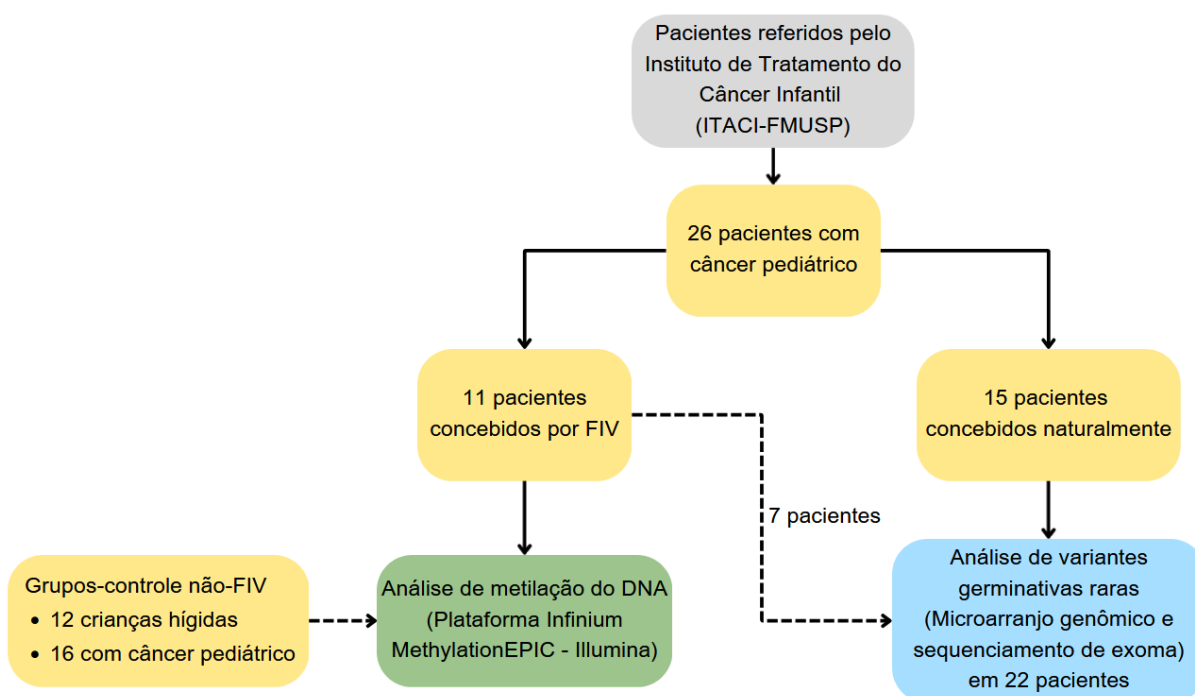


Figura 1. Fluxograma detalhando a casuística e o delineamento experimental.

Fluxograma detalhando a casuística e o delineamento experimental utilizado nos dois braços do presente estudo.

3.4. Metodologia

As metodologias encontram-se abaixo brevemente descritas e também nos respectivos capítulos: análise de DNAm no Capítulo 4 e sequenciamento e análise de exoma no Capítulo 5. A Dra. Mariana Maschietto (Cento de Pesquisa do Hospital Infantil Boldrini) colaborou na análise e interpretação de dados de metilação de DNA; a Dra. Anne Caroline Barbosa colaborou na análise e interpretação dos dados de exoma.

Análise do padrão de metilação de DNA: microarranjo de metilação de DNA - plataforma Infinium MethylationEPIC: Amostras de 500 ng de DNA genômico foram submetidas à conversão por bissulfato de sódio com o kit EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo). Em seguida, iniciou-se o procedimento de hibridação em microarray com a plataforma Infinium MethylationEPIC, de acordo com as especificações do fabricante (Illumina). Posteriormente, o chip foi transformado em imagem pelo iScan (Illumina), permitindo a identificação da base incorporada às réplicas de cada sonda presente na plataforma. O sistema iScan forneceu os dados brutos do microarray, ou seja, a intensidade do sinal obtido para cada sonda, os quais foram utilizados em programas de análise de metilação do DNA. O procedimento de hibridação e escaneamento do microarrays foi realizado como serviço pelo Laboratório Multiusuário de Sequenciamento em Larga Escala e Expressão Gênica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - UNESP - Jaboticabal.

Análise dos dados obtidos pela plataforma Infinium MethylationEPIC (Illumina): A análise dos dados foi semelhante a análises previamente realizadas pelo grupo da Dra. Maschietto, porém considerando a constante atualização da área e as especificidades do projeto. Brevemente, os dados gerados pela plataforma Infinium MethylationEPIC quanto ao nível de metilação global foram analisados utilizando o software *GenomeStudio* (Illumina) e o pacote *Chip Analysis Methylation Pipeline* (ChAMP) (TIAN et al., 2017) na linguagem e ambiente para computação estatística e gráfica R (R CORE TEAM, 2021). O software *GenomeStudio* junto do módulo *Methylation* (Illumina) converteu sinais de fluorescência em valores relativos de metilação para sítios CpG investigados para normalização, visualização e análise dos

dados. Após a obtenção dos dados brutos, etapas posteriores para correção de desvios foram realizadas no ChAMP. Com o uso deste pacote, foi possível obter resultados mais confiáveis por meio de: a) correções em etapas como filtragem de amostras e de sondas (ARYEE et al., 2014; ZHOU; LAIRD; SHEN, 2017); b) ajustes na fluorescência não específica de *background*, nas diferenças entre as sondas Infinium tipo I e II (TESCHENDORFF et al., 2013); c) correção de artefatos gerados entre diferentes batches de amostras (JOHNSON; LI; RABINOVIC, 2007); d) correção da composição de diferentes tipos celulares em uma única amostra (HOUSEMAN et al., 2012). A etapa de interpretação biológica e clínica foi realizada através da comparação de sítios diferencialmente metilados (DMPs) e regiões diferencialmente metiladas (DMRs) entre pacientes e controles (SMYTH, 2004; JAFFE et al., 2012).

Análise de variações de número de cópias (CNVs) pela análise cromossômica por microarranjo (CMA): O CMA foi realizado pela Dra. Sílvia Souza Costa, sob supervisão e análise da Dra. Ana Cristina Victorino Krepischi. Utilizamos a plataforma 180K (Agilent Technologies, Santa Clara – CA, USA) e os procedimentos experimentais seguiram as recomendações do fabricante. A análise foi conduzida de acordo com estudos anteriores de nosso grupo (KREPISCHI et al., 2014).

Sequenciamento massivo paralelo e processamento dos dados: A captura das regiões para o sequenciamento foi realizada pela construção de biblioteca com o kit SureSelect Human All Exon V6 (Agilent) ou xGen Exome Research Panel v1.0 e v2.0 (Integrated DNA Technologies - IDT). O sequenciamento massivo paralelo dos fragmentos de DNA *paired-end* foi feito na plataforma Illumina Hi-Seq 2000 (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). As sequências foram alinhadas ao genoma de referência humano GRCh37/hg19 com o algoritmo BWA_MEM (LI, 2013). A Ferramenta Picard tools (v.1.8, <http://broadinstitute.github.io/picard/>) foi usada para converter o arquivo SAM em BAM e marcar duplicatas de PCR. O Genome Analysis Toolkit (GATK 3.7) (MCKENNA et al., 2010) foi utilizado para realinhar indels, recalibrar as bases (Unified Genotyper) e recalibrar variantes (VQSR). Finalmente, as variantes multialélicas foram divididas em diferentes linhas usando o script `split_multiallelic_rows.rb` do Atlas2 (CHALLIS et al., 2012) para obter os arquivos VCF utilizados na análise.

Análise dos dados de sequenciamento: Utilizamos o software VarSeq (Golden Helix, Inc) para anotação de variantes identificadas e posterior prospecção de variantes de interesse. Os padrões para filtragem de variantes de alta qualidade foram: (1) *read depth* ≥ 20 ; (2) Phred score ≥ 20 ; (3) fração alélica variante ≥ 0.3 ; (4) variantes com frequência populacional < 0.01 em bancos de dados populacionais de genoma e exoma, como o 1000 Genomes (AUTON et al., 2015), gnomAD (KARCZEWSKI et al., 2020) e Arquivo Brasileiro Online de Mutações - ABraOM (NASLAVSKY et al., 2022). Filtramos variantes codificadoras do tipo *missense* e perda de função (loss of function – LoF: frameshift, stop-loss/gain, splice site, nonsense). Também utilizamos bancos de dados de variantes com importância clínica como o NCBI ClinVar (LANDRUM et al., 2018) e OMIM (AMBERGER et al., 2015). Todas as mutações candidatas foram validadas visualmente usando o Integrated Genomics Viewer (IGV; Broad Institute, Cambridge, MA, EUA) (ROBINSON et al., 2011). Priorizamos variantes em 437 genes de predisposição ao câncer (179 reconhecidos e 257 candidatos). As variantes de interesse foram classificadas de acordo com as recomendações do *American College of Medical Genetics e Association for Molecular Pathology* (ACMG/AMP) (RICHARDS et al., 2015; BIESECKER; HARRISON, 2018). Variantes de interesse foram confirmadas utilizando o sequenciamento Sanger.

Capítulo 4. Metilação de DNA em pacientes com câncer pediátrico concebidos por fertilização *in vitro*

LHX6 PROMOTER HYPERMETHYLATION IN ONCOLOGICAL PEDIATRIC PATIENTS CONCEIVED BY IVF

Gustavo Dib Dangoni¹; Anne Caroline Barbosa Teixeira¹; Carolina Sgarioni Camargo Vince²; Estela Maria Novak²; Thamiris Magalhães Gimenez²; Mariana Maschietto³; Vicente Odone Filho^{2*}; Ana Cristina Victorino Krepischi^{1*}

¹Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo-SP, Brazil;

²Institute for the Treatment of Childhood Cancer (ITACI) – Hospital das Clínicas, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo-SP, Brazil.

³Research Center, Boldrini Children's Hospital, Campinas-SP, Brazil;

Journal of Developmental Origins of Health and Disease

www.cambridge.org/doh

Brief Report

Cite this article: Dangoni GD, Teixeira ACB, Vince CSC, Novak EM, Gimenez TM, Maschietto M, Odone Filho V, and Krepischi ACV. *LHX6* promoter hypermethylation in oncological pediatric patients conceived by IVF. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* doi: [10.1017/S2040174422000526](https://doi.org/10.1017/S2040174422000526)



Received: 5 April 2022
Revised: 29 August 2022
Accepted: 1 September 2022

Keywords: Pediatric cancer; epigenetics; DNA methylation; ART; IVF

Address for correspondence: Ana Cristina Victorino Krepischi, Institute of Biosciences - University of São Paulo - Rua do Matão 277, 05508-090, São Paulo, SP, Brazil. Email: ana.krepischi@ib.usp.br

Vicente Odone Filho and Ana Cristina Victorino Krepischi equally contribution last authors.

LHX6 promoter hypermethylation in oncological pediatric patients conceived by IVF

Gustavo Dib Dangoni¹ , Anne Caroline Barbosa Teixeira¹, Carolina Sgarioni Camargo Vince², Estela Maria Novak², Thamiris Magalhães Gimenez², Mariana Maschietto³, Vicente Odone Filho² and Ana Cristina Victorino Krepischi¹ 

¹Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; ²Institute for the Treatment of Childhood Cancer (ITACI) – Hospital das Clínicas, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil and ³Research Center, Boldrini Children's Hospital, Campinas, SP, Brazil

Abstract

The multifactorial etiology of pediatric cancer is poorly understood. Environmental factors occurring during embryogenesis can disrupt epigenetic signaling, resulting in several diseases after birth, including cancer. Associations between assisted reproductive technologies (ART), such as *in vitro* fertilization (IVF), and birth defects, *imprinting* disorders and other perinatal adverse events have been reported. IVF can result in methylation changes in the offspring, and a link with pediatric cancer has been suggested. In this study, we investigated the peripheral blood methylomes of 11 patients conceived by IVF who developed cancer in childhood. Methylation data of patients and paired sex/aged controls were obtained using the Infinium MethylationEPIC Kit (Illumina). We identified 25 differentially methylated regions (DMRs), 17 of them hypermethylated, and 8 hypomethylated in patients. The most significant DMR was a hypermethylated genomic segment located in the promoter region of *LHX6*, a transcription factor involved in the forebrain development and interneuron migration during embryogenesis. An additional control group was included to verify the *LHX6* methylation status in children with similar cancers who were not conceived by ART. The higher *LHX6* methylation levels in IVF patients compared to both control groups (healthy children and children conceived naturally who developed similar pediatric cancers), suggested that hypermethylation at the *LHX6* promoter could be due to the IVF process and not secondary to the cancer itself. Further studies are required to evaluate this association and the potential role of *LHX6* promoter hypermethylation for tumorigenesis.

A etiologia multifatorial do câncer pediátrico ainda é desconhecida. Fatores ambientais que ocorrem durante a embriogênese podem interromper a sinalização epigenética, resultando em diversas doenças após o nascimento, incluindo o câncer. Há relatos de associações entre tecnologias de reprodução assistida (TRAs), como a fertilização *in vitro* (FIV), e malformações congênitas, doenças de alterações do *imprinting* genômico, e outros eventos adversos perinatais. A FIV pode resultar em mudanças do padrão de metilação na prole, e a sua associação com o câncer pediátrico foi sugerida. No presente estudo, investigamos o padrão de DNAm em sangue periférico de 11 pacientes concebidos via FIV que desenvolveram câncer pediátrico. Os dados de metilação dos pacientes e 12 controles hígidos pareados por sexo e idade foram obtidos utilizando o Kit Infinium MethylationEPIC (Illumina). Identificamos 25 regiões diferencialmente metiladas (DMRs) nos pacientes, 17 delas hipermetiladas, e 8 hipometiladas. A DMR mais significativa foi um segmento genômico hipermetilado na região promotora do gene *LHX6*, um fator de transcrição responsável pelo desenvolvimento do prosencéfalo e migração de interneurônios durante a embriogênese. Um grupo controle adicional foi incluído para a verificação do padrão de metilação do gene *LHX6* em crianças com cânceres similares ao grupo de pacientes de nosso estudo, porém que foram concebidas naturalmente. Os níveis de metilação elevados em pacientes gerados por FIV quando comparados com os dois grupos-controle (crianças saudáveis e crianças concebidas naturalmente que desenvolveram cânceres pediátricos similares), sugerem que a hipermetilação na região promotora do gene *LHX6* pode decorrer ao processo de FIV e não de processos oncogênicos. Mais estudos são necessários para avaliar a associação entre FIV e a hipermetilação em *LHX6*, bem como o papel da hipermetilação da região promotora do gene *LHX6* na tumorigênese.

Palavras-chave: câncer pediátrico; epigenética; metilação do DNA; TRA; FIV

Este artigo foi publicado no periódico *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* em setembro de 2022: <https://doi.org/10.1017/S2040174422000526>

Abstract

The multifactorial etiology of pediatric cancer is poorly understood. Environmental factors occurring during embryogenesis can disrupt epigenetic signaling, resulting in several diseases after birth, including cancer. Associations between assisted reproductive technologies (ART), such as in vitro fertilization (IVF), and birth defects, imprinting disorders and other perinatal adverse events have been reported. IVF can result in methylation changes in the offspring, and a link with pediatric cancer has been suggested. In this study, we investigated the peripheral blood methylomes of 11 patients conceived by IVF who developed cancer in childhood. Methylation data of patients and paired sex/aged controls were obtained using the Infinium MethylationEPIC Kit (Illumina). We identified 25 differentially methylated regions (DMRs), 17 of them hypermethylated, and 8 hypomethylated in patients. The most significant DMR was a hypermethylated genomic segment located in the promoter region of LHX6, a transcription factor involved in the forebrain development and interneuron migration during embryogenesis. An additional control group was included to verify the LHX6 methylation status in children with similar cancers who were not conceived by ART. The higher LHX6 methylation levels in IVF patients compared to both control groups (healthy children and children conceived naturally who developed similar pediatric cancers), suggested that hypermethylation at the LHX6 promoter could be due to the IVF process and not secondary to the cancer itself. Further studies are required to evaluate this association and the potential role of LHX6 promoter hypermethylation for tumorigenesis.

Keywords: pediatric cancer; epigenetics; DNA methylation; ART; IVF

Introduction

Assisted reproductive technologies (ART) can increase the risk of birth defects and other perinatal adverse events in the offspring (QIN et al., 2016; LV et al., 2021). Furthermore, there is a positive association between ART, particularly *in vitro* fertilization (IVF), and a higher risk of imprinting disorders, possibly caused by epigenetic modifications in imprinted genes (CORTESSIS et al., 2018; HENNINGSEN et al., 2020).

Considering the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD), some features of ART, like culture media, incubation conditions and embryo manipulation, can have impact in the embryo development and epigenome (FEUER; RINAUDO, 2017; GARDNER; KELLEY, 2017). This notion has raised concerns about health problems in IVF individuals during infancy or adulthood, such as low birth weight, diabetes, obesity and cancer (FEUER; RINAUDO, 2017; GARDNER; KELLEY, 2017). A yet controversial link between ART and pediatric cancer has been suggested. In 2005, a meta-analysis based on 11 cohort studies found no relation between increased risk of childhood cancer and ART patients (RAIMONDI; PEDOTTI; TAIOLI, 2005). In 2013, another meta-analysis that evaluated 25 cohort and case-control studies reported that ART and/or fertility treatment increased the risk for specific cancer types, namely leukemia, neuroblastoma, and retinoblastoma (HARGREAVE et al., 2013).

More recently, two additional large meta-analyses have been published. Following the analysis of 327,884 children conceived after fertility treatment, in which 578 were diagnosed with cancer, Wang *et al* (2019) found an increased risk of developing cancer, especially leukemia and hepatic tumors. The cancer risk is further increased when ART alone is considered, without the use of fertility drugs. Contradicting these findings, a meta-analysis based on 750,138 ART conceived children and 21,400,800 controls did not find an overall increase in risk of pediatric cancer in either ART or IVF (GILBOA et al., 2019).

The investigation of possible epigenetic alterations caused by IVF may offer insights about its potential association with malignancies (WANG et al., 2019). Here, we investigated epimutations in the methylomes of a small cohort of eleven patients conceived by IVF who developed pediatric cancer.

Patients and Methods

Samples

DNA was extracted from peripheral blood of eleven individuals conceived by IVF who developed pediatric cancer (**Table 1**). Individuals who underwent bone-marrow transplantation or who were diagnosed with hereditary cancer syndromes were excluded. Patients were referred from the ITACI - Childhood Cancer Treatment Institute (FMUSP), which is a reference pediatric cancer hospital in São Paulo, Brazil. Samples were provided after parents have signed the informed consent.

Table 1. Clinical features of 11 individuals conceived by IVF who developed pediatric cancer.

| ID | Tumor type | Sex | Age at diagnosis (years) |
|-----|-------------------------------------|-----|--------------------------|
| P1 | B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia | F | 7.0 |
| P2 | B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia | F | 6.0 |
| P3 | B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia | F | 1.9 |
| P4 | Acute Myeloid Leukemia | M | 14.6 |
| P5 | Acute Myeloid Leukemia | M | 10.2 |
| P6 | Neuroblastoma | F | 1.8 |
| P7 | Neuroblastoma | M | 3.6 |
| P8 | Neuroblastoma | F | 1.4 |
| P9 | Ganglioneuroma | M | 2.7 |
| P10 | Astrocytoma | F | 4.6 |
| P11 | Melanoma | F | 8.5 |

A control group was composed by peripheral blood samples collected from 12 children without cancer history matched by age and sex with patients (Control group 1 – C1) (**Supplemental Table S1a**).

A second group was added to this study in order to control the methylation status of children with similar diagnosis of cancer who were not conceived by IVF (Control group 2 – C2) (**Supplemental Table S1b**). This additional group was based on the recovery of germline Illumina 850K methylation data previously obtained from 16 children who developed pediatric cancer and were naturally conceived: five children with neuroblastoma (NB - peripheral blood methylomes provided by the ITACI center; data not published) and 11 children with acute myeloid leukemia (AML - bone marrow

or peripheral blood methylomes public available on GEO accession GSE124413) (EDGAR; DOMRACHEV; LASH, 2002).

Infinium MethylationEPIC (850K) array hybridization

Genomic DNA samples were obtained from standard extraction procedures using the phenol/chloroform method. Evaluation of peripheral blood DNA methylation (DNAm) was performed using the Infinium MethylationEPIC (850K) array, according to the manufacturer's instructions. A total of 500ng of bisulfite-converted DNA samples (EZ DNA Methylation-Gold Kit; Zymo Research) were hybridized in the Infinium MethylationEPIC BeadChip array (Illumina). The raw image data with signal intensities were captured with the iScan SQ scanner (Illumina) and collected as IDAT files.

DNA Methylation analysis

We applied the Chip Analysis Methylation Pipeline (ChAMP) package (version 2.20.1) (TIAN et al., 2017) in the R environment (version 4.0.4) (R CORE TEAM, 2021) for the methylation analysis. The quality filters removed 3,960 probes with a detection *P*-value above 0.01, 34,605 probes with a bead count <3 in at least 5% of samples, and non-CG sites (2,865). In addition, 94,529 SNP-related probes and 18 probes that aligned to multiple locations were removed. Lastly, 15,818 probes located on the X or Y chromosomes were excluded (ARYEE et al., 2014; FORTIN; TRICHE; HANSEN, 2017).

The beta-mixture quantile normalization (BMIQ) method (TESCHENDORFF et al., 2013) resulted in better Infinium I/II normalization compared to PBC (DEDEURWAERDER et al., 2011) or SWAN (MAKSIMOVIC; GORDON; OSHLACK, 2012). Singular value decomposition (SVD) (TESCHENDORFF et al., 2009) reported the need for array and slide correction, made by ComBat (JOHNSON; LI; RABINOVIC, 2007; LEEK JT et al., 2017). We adjusted the cell-type heterogeneity using the Refbase EWAS method (HOUSEMAN et al., 2012).

Differential DNAm analysis

Methylation differences were identified by comparing patients and controls and using algorithms implemented by ChAMP (TIAN et al., 2017). Differentially methylated positions (DMPs) analysis, i.e., methylation difference for a single CpG site, was performed using Limma (SMYTH, 2004; WETTENHALL; SMYTH, 2004). Differentially methylated regions (DMRs) analysis was performed using the Bumphunter algorithm (JAFFE et al., 2012), based on the detection of methylation differences in stretches of the genome in which there are several consecutive CpG sites exhibiting similar methylation alterations. Both analyses were performed considering P -value <0.05 . In addition, DMRs should have a minimum of seven consecutive probes with changes in DNAm in the same direction (hypo or hypermethylated).

Results

Eleven patients with pediatric cancer who were conceived by IVF were evaluated (**Table 1**). Cancer types were hematological malignancies (three patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia, and two with acute myeloid leukemia), and nervous system tumors (three patients with neuroblastoma, one with astrocytoma, and one with ganglioneuroma). One patient developed melanoma.

Following exclusion of probes during quality control steps, the methylation analysis proceeded with 714,443 probes for data correction and normalization. The differential methylation analysis compared the group of 11 patients conceived by IVF who developed childhood cancer (IVF/cancer) with 12 unrelated healthy controls (group C1); the goal of this analysis was to detect differences in the blood methylomes of IVF/cancer group possibly related to patient's phenotypes. However, no significant differential methylated position - DMP (adjusted P -value <0.05) was found after Benjamini-Hochberg adjustment for multiple testing (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995).

The methylation analysis detected 25 DMRs (**Supplemental Table S2**), 17 of which were hypermethylated and 8 were hypomethylated in patients. The most relevant DMR was hypermethylated in patients compared to healthy individuals from control C1 ($\Delta\beta = 0.07$). This DMR is located in the promoter region of the *LHX6* gene,

mapped to 9q33.2. The *LHX6* DMR encompassed nine CpG sites (**Fig. 1**), extending on a genomic segment of 803 bp. This genomic segment included only CpGs mapped to transcription start sites 1500 and 200 (TSS1500 and TSS200); four of these CpGs (cg00774728, cg00485681, cg17434149, cg21237939) map to a CpG island (chr9: CpG island 254, hg19), and five CpGs (cg06347782, cg04201727, cg11328695, cg22254104, cg02539128) to the shore (**Table 2**).

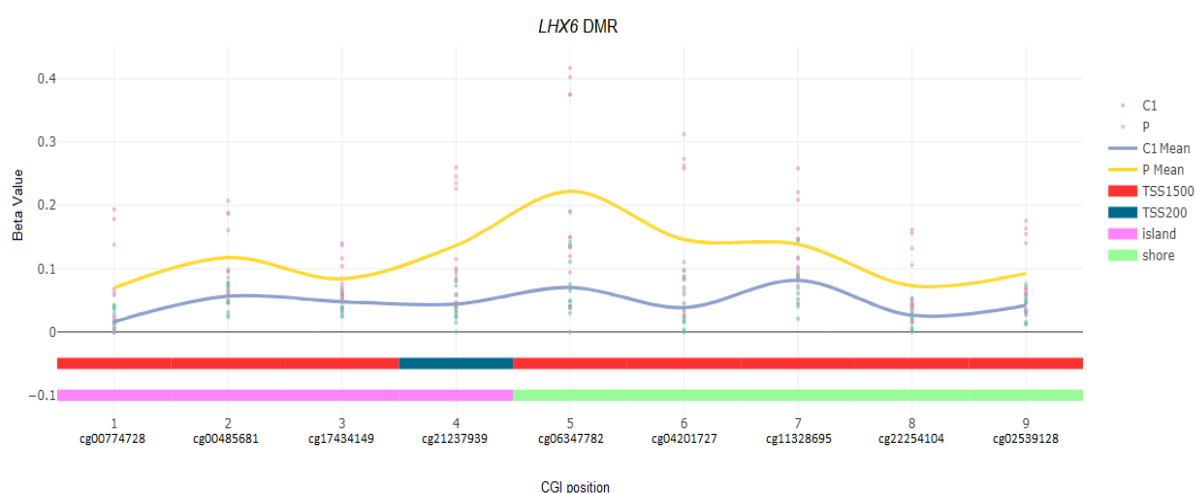


Fig. 1. Hypermethylated DMR at the promoter region of the *LHX6* gene. Plot (image extracted from ChAMP) (TIAN et al., 2017) showing the beta values of methylation of each CpG site mapped to the *LHX6* gene. Green dots: individuals from the healthy control group (C1); Pink dots: individuals from the patient group (P); C1 mean: average beta value from the control group; P mean: average beta value from the patient group; TSS1500: transcription start site 1500; TSS200: transcription start site 200; island: CpG island; shore: CpG shore

Table 2. Promoter region of the *LHX6* gene and its DMR genomic features.

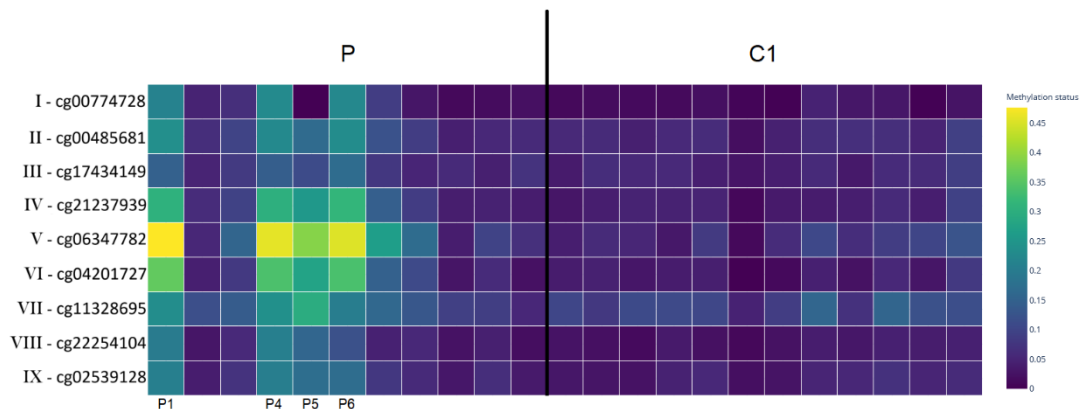
| ID | Chromosome | Genomic coordinates (hg19) | Strand | Probe type (1) | Gene | Location in the gene (2) | CGI location (2) |
|------------|------------|----------------------------|--------|----------------|------|--------------------------|------------------|
| cg00774728 | 9 | 124990632 | F | I | LHX6 | TSS1500 | island |
| cg00485681 | 9 | 124990761 | R | II | LHX6 | TSS1500 | island |
| cg17434149 | 9 | 124990763 | R | II | LHX6 | TSS1500 | island |
| cg21237939 | 9 | 124991047 | R | II | LHX6 | TSS200 | island |
| cg06347782 | 9 | 124991182 | F | I | LHX6 | TSS1500 | shore |
| cg04201727 | 9 | 124991209 | F | I | LHX6 | TSS1500 | shore |
| cg11328695 | 9 | 124991348 | F | I | LHX6 | TSS1500 | shore |
| cg22254104 | 9 | 124991432 | F | II | LHX6 | TSS1500 | shore |
| cg02539128 | 9 | 124991435 | F | II | LHX6 | TSS1500 | shore |

(¹) Probe type according to different probe designs (Infinium I and Infinium II) in the Illumina Methylation chip

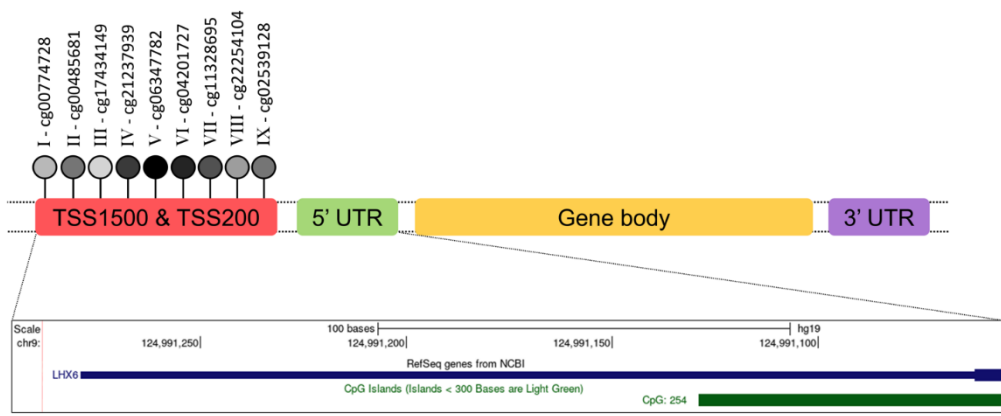
(²) Annotations for the CGIs genomic location in relation to gene sequence were done according to Illumina's CpG loci database.

The heatmap using the beta values of the CpGs mapped to *LHX6* of patients and controls C1 (**Fig. 2a**) revealed that mostly, four patients in the IVF group (P1, P4, P5, and P6) contributed to the identification of the DMR, although patients P3, P7 and P8 also contributed to this pattern of increased methylation. Considering this observation, we added a second control group to this study (control C2), based on the recovery of Illumina Infinium MethylationEPIC germline data previously obtained from 16 children who developed pediatric cancer and were naturally conceived: five children with neuroblastoma and 11 children with acute myeloid leukemia. Methylation levels of the nine CpG sites mapped to *LHX6* were retrieved from all cases for comparison between the three groups: the four IVF patients, the control C1 (healthy children) and the cancer control C2 groups (**Fig. 2b**). Seven out of nine CpGs (cg00485681, cg17434149, cg21237939, cg06347782, cg04201727, cg22254104, and cg02539128) exhibited higher methylation levels in the subgroup of patients when compared to both control groups (**Fig. 2c** and **Supplemental Table S3**).

A



B



C

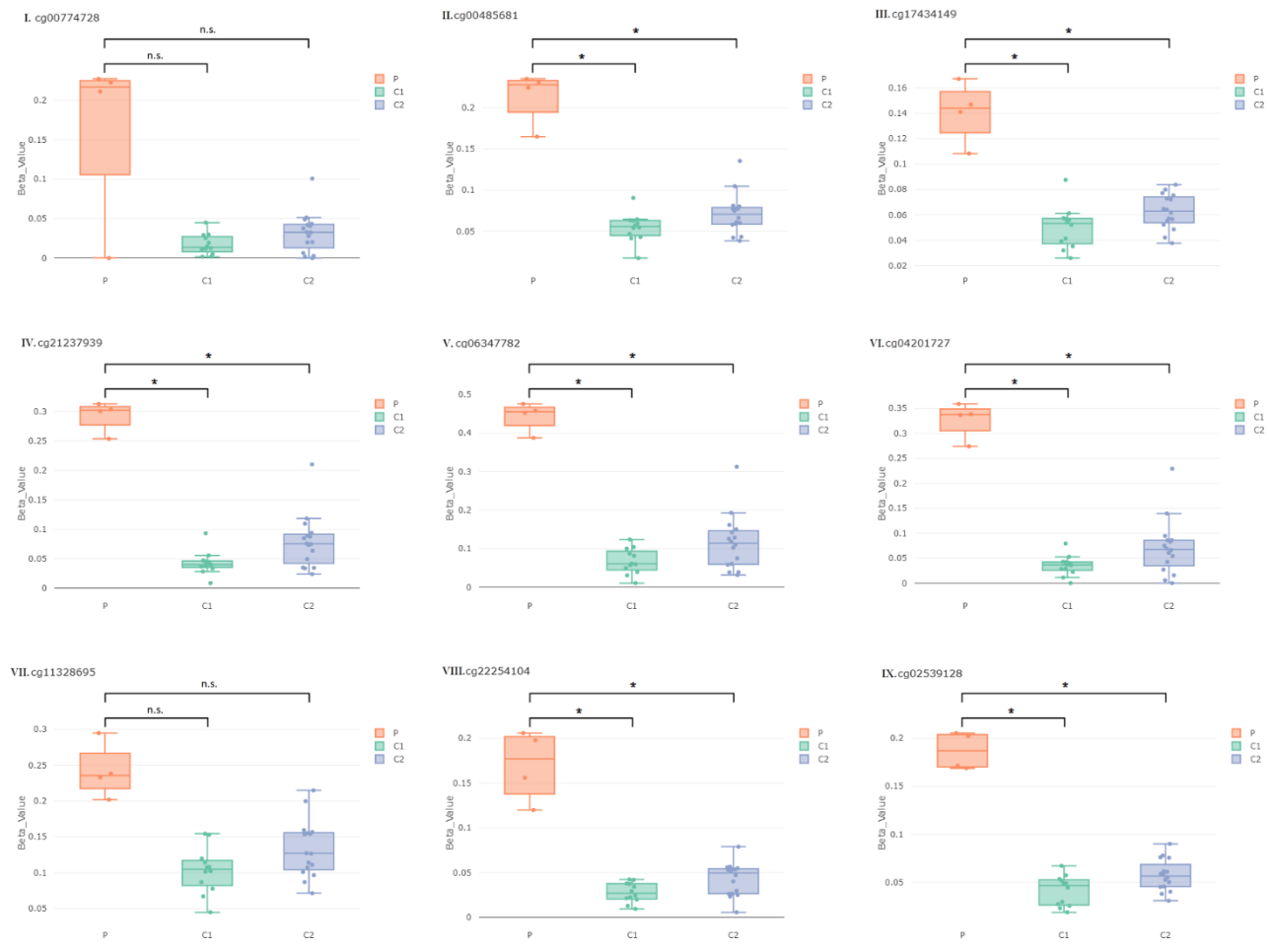


Fig. 2. DNA methylation (DNAm) pattern from the CpGs located in the LHX6 DMR that was found in all analyses. a. Heatmap (image extracted from Plotly) (PLOTLY TECHNOLOGIES INC., 2015) showing the DNAm level of nine DMPs located in the original DMR revealed in the analysis (P and C1 groups separated by the black line). b. Regions of the LHX6 gene with the CpG sites from the DMR depicted as numbered lollipops. Promoter region image extracted from UCSC genome browser. c. Boxplots (images extracted from ChAMP) (TIAN et al., 2017) of each CpG site with the respective methylation level for the three groups (orange: 4 patients - P, green: healthy controls - C1, blue: cancer controls - C2). n.s. are non-significant DMPs. *Statistically significant DMPs.

Discussion

Parental subfertility, parental age at conception, children sex, low birth weight, and other environmental factors, such as tobacco and alcohol consumption during pregnancy, can result in a biased risk of childhood cancer associated with ART (LATINO-MARTEL et al., 2010; HARGREAVE et al., 2013; WANG et al., 2019). Thus, a link between ART and pediatric cancer remains controversial. Considering the yet disputed association between pediatric cancer and ART (RAIMONDI; PEDOTTI; TAIOLI, 2005; HARGREAVE et al., 2013; GILBOA et al., 2019; WANG et al., 2019), in which ART is suggested to cause epigenetic modifications that could increase the risk of cancer, it is crucial to investigate DNA methylation in these patients (CORTESSIS et al., 2018; WANG et al., 2019). In previous studies, increased risk rates for specific types of cancer such as leukemia and neuroblastoma were detected among children born following fertility treatment (HARGREAVE et al., 2013; WANG et al., 2019). Likewise, our study IVF cohort included eight patients diagnosed with leukemias or neuroblastoma.

Current research regarding epigenetic alterations associated with ART are generally related to imprinting disorders (CORTESSIS et al., 2018; HENNINGSEN et al., 2020). Previous studies that investigated the association between ART and pediatric cancer did not explore the presence of DNAm changes in patients conceived by IVF that developed pediatric cancer.

DMPs were not detected after multiple testing adjustments. A possible explanation for this situation can be the small number of patients. Small group analysis may not identify real changes because they do not reach statistical power when evaluating hundreds of thousands of sites simultaneously (MANSELL et al., 2019). In

addition, one could argue that robust DNAm changes were not detected because the methylation analysis was done in peripheral leukocytes obtained from patients and not on tumor tissues which presents a higher specificity (MOORE et al., 2008; TESCHENDORFF et al., 2009). Even though DNAm changes in blood samples are generally small, most epigenetic alterations related to diseases occurring during development can be detected in surrogate tissues (WOO; KIM, 2012). Recently, a large study evaluated the cord blood DNAm from 205 ART cases and 2,439 naturally conceived controls revealing two CpG sites associated with ART, as well as related to cancer, aging and HIV infection by EWAS studies (WOZNIAK et al., 2013; GROSS et al., 2016; XU et al., 2017; CARAMASCHI et al., 2021). Therefore, the use of peripheral blood samples seems to be a suitable strategy for searching for epigenetic variations, which may serve as good biomarkers for cancer risk.

The most significant DMR found in this study maps to the promoter region of the transcriptional factor *LHX6*, which is involved in embryogenesis and head development (GRIGORIOU et al., 1998; LIODIS et al., 2007). Thus, an additional control group was included to verify the *LHX6* methylation status in children with similar cancers who were not conceived by ART. These analyses excluded the possibility that this DMR was driven by the occurrence of the cancer and not the IVF itself. The higher *LHX6* methylation levels in IVF patients compared to both control groups, healthy children and children conceived naturally who developed similar pediatric cancers (neuroblastoma and leukemia), suggested that hypermethylation at the promoter of the *LHX6* is likely due to the IVF process and not secondary to the cancer itself. During neurodevelopment, *LHX6* is expressed in the ventral forebrain and in tangentially migrating GABAergic interneurons from the neocortex and hippocampus (LIODIS et al., 2007; YUAN et al., 2020). This gene is a potential tumor suppressor gene in glioma (YAN et al., 2018), pancreatic (ABUDUREXITI et al., 2020), head and neck (ESTÉCIO et al., 2006), breast (HU; XIE, 2015), lung (LIU et al., 2013), and cervical (JUNG et al., 2011) cancer. Particularly, *LHX6* may affect signaling pathways such as the Wnt/ β -catenin in breast (HU; XIE, 2015), lung (YANG et al., 2017) and liver cancer (CHEN et al., 2019), *TP53* in hepatocarcinoma (CHEN et al., 2019) and PI3K/Akt/mTOR in breast cancer (BI et al., 2018). *LHX6* promoter hypermethylation has already been related to transcriptional silencing, and it is described as either hypermethylated or partially methylated in cervical, head and neck, pancreatic, lung and liver cancers (ESTÉCIO

et al., 2006; JUNG et al., 2011; LIU et al., 2013; NATHALIA et al., 2018; CHEN et al., 2019; ABUDUREXITI et al., 2020). Likewise, the DMR we found is hypermethylated in the promoter region.

Therefore, the *LHX6* promoter hypermethylation previously associated with cancer and detected in this study, can be suggested as an epimutation that increases the risk of cancer in the patients herein reported. There are possible confounding factors such as low birth weight, parental age, type of infertility leading to IVF, use of fertility drugs, maternal smoking, and patient tumor, which can result in methylation alterations (WANG et al., 2019). Another aspect not investigated here was the genetic susceptibility to cancer of this group of patients. A recent study that analyzed the methylation profile of 23,116 individuals (GARG et al., 2020) reported that 2/3 of the epivariations segregated according to underlying sequence variants, while the other 1/3 occurred post-zygotically. Therefore, the identified epimutations in these patients could also be attributed to genetic variants, driving both the methylation pattern and increased cancer risk.

In conclusion, we searched for possible variations in DNAm that could be linked to increased risk of childhood cancer in children conceived by IVF. A hypermethylated DMR in patients was detected in the promoter region of *LHX6*, a gene previously associated with cancer when its promoter region is hypermethylated. Therefore, this DMR can be an epimutation contributing to increased cancer risk in some children conceived by IVF and thus deserves additional investigation.

Acknowledgments

We would like to thank the patients and their families for participating in this study.

Financial Support

This research was carried out with financial support from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (grant number 88887.606266/2021-00); and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, São Paulo Research Foundation (A.C.B.T., grant numbers: 2018/21047-9, 2018/05961-2).

Conflict of Interest Statement

None

Ethical Standards

The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national guidelines on human experimentation (Resolution 466/12) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008, and has been approved by the Ethics and Research Committee of ITACI (CAAE 47277115.0.0000.0068), and Institute of Biosciences (University of São Paulo, São Paulo, Brazil) (CAAE: 09163818.4.0000.5464).

Bibliography

ABUDUREXITI, Yakefujiang; GU, Zhaodi; CHAKMA, Kanchan; HATA, Tatsuo; MOTOI, Fuyuhiko; UNNO, Michiaki; HORII, Akira; FUKUSHIGE, Shinichi. Methylation-mediated silencing of the LIM homeobox 6 (LHX6) gene promotes cell proliferation in human pancreatic cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 526, n. 3, p. 626–632, 2020. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.03.120. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.120>.

ARYEE, Martin J.; JAFFE, Andrew E.; CORRADA-BRAVO, Hector; LADD-ACOSTA, Christine; FEINBERG, Andrew P.; HANSEN, Kasper D.; IRIZARRY, Rafael A. Minfi: A flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 30, n. 10, p. 1363–1369, 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu049.

BENJAMINI, Yoav; HOCHBERG, Yosef. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995. DOI: 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/2346101>.

BI, Q. J.; MEN, X. J.; HAN, R.; LI, G. L. LHX6 inhibits the proliferation, invasion and migration of breast cancer cells by modulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 10, p. 3067–3073, 2018. DOI: 10.26355/eurrev_201805_15066.

CARAMASCHI, Doretta et al. Association of medically assisted reproduction with offspring cord blood DNA methylation across cohorts. **Human reproduction (Oxford, England)**, [S. l.], v. 36, n. 8, p. 2403–2413, 2021. DOI: 10.1093/humrep/deab137.

CHEN, Hong-qiang et al. Epigenetic inactivation of LHX6 mediated microcystin-LR induced hepatocarcinogenesis via the Wnt/ β -catenin and P53 signaling pathways. **Environmental Pollution**, [S. l.], v. 252, p. 216–226, 2019. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.05.049. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.049>.

CORTESSIS, Victoria K. et al. Comprehensive meta-analysis reveals association between multiple imprinting disorders and conception by assisted reproductive technology. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 943–952, 2018. DOI: 10.1007/s10815-018-1173-x.

DEDEURWAERDER, Sarah; DEFRANCE, Matthieu; CALONNE, Emilie; DENIS, Hélène; SOTIRIOU, Christos; FUKS, François. Evaluation of the Infinium Methylation 450K technology. **Epigenomics**, [S. l.], v. 3, n. 6, p. 771–784, 2011. DOI: 10.2217/epi.11.105. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/epi.11.105>.

EDGAR, Ron; DOMRACHEV, Michael; LASH, Alex E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. **Nucleic Acids**

Research, [S. I.], v. 30, n. 1, p. 207–210, 2002. DOI: 10.1093/nar/30.1.207.

ESTÉCIO, M. R. H.; YOUSSEF, E. M.; RAHAL, P.; FUKUYAMA, E. E.; GÓIS-FILHO, J. F.; MANIGLIA, J. V.; GOLONI-BERTOLLO, E. M.; ISSA, J. P. J.; TAJARA, E. H. LHX6 is a sensitive methylation marker in head and neck carcinomas. **Oncogene**, [S. I.], v. 25, n. 36, p. 5018–5026, 2006. DOI: 10.1038/sj.onc.1209509.

FEUER, S. K.; RINAUDO, P. F. Physiological, metabolic and transcriptional postnatal phenotypes of in vitro fertilization (IVF) in the mouse. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, [S. I.], v. 8, n. 4, p. 403–410, 2017. DOI: 10.1017/S204017441700023X.

FORTIN, Jean Philippe; TRICHE, Timothy J.; HANSEN, Kasper D. Preprocessing, normalization and integration of the Illumina HumanMethylationEPIC array with minfi. **Bioinformatics**, [S. I.], v. 33, n. 4, p. 558–560, 2017. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw691.

GARDNER, D. K.; KELLEY, R. L. Impact of the IVF laboratory environment on human preimplantation embryo phenotype. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, [S. I.], v. 8, n. 4, p. 418–435, 2017. DOI: 10.1017/S2040174417000368.

GARG, Paras et al. A Survey of Rare Epigenetic Variation in 23,116 Human Genomes Identifies Disease-Relevant Epivariations and CGG Expansions. **American Journal of Human Genetics**, [S. I.], v. 107, n. 4, p. 654–669, 2020. DOI: 10.1016/j.ajhg.2020.08.019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.08.019>.

GILBOA, Daniella; KOREN, Gideon; BARER, Yael; KATZ, Rachel; ROTEM, Ram; LUNENFELD, Eitan; SHALEV, Varda. Assisted reproductive technology and the risk of pediatric cancer: A population based study and a systematic review and meta analysis. **Cancer Epidemiology**, [S. I.], v. 63, p. 101613, 2019. DOI: 10.1016/j.canep.2019.101613. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2019.101613>.

GRIGORIOU, M.; TUCKER, A. S.; SHARPE, P. T.; PACHNIS, V. Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. **Development**, [S. I.], v. 125, n. 11, p. 2063–2074, 1998. DOI: 10.1242/dev.125.11.2063. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570771>.

GROSS, Andrew M. et al. Methylome-wide Analysis of Chronic HIV Infection Reveals Five-Year Increase in Biological Age and Epigenetic Targeting of HLA. **Molecular Cell**, [S. I.], v. 62, n. 2, p. 157–168, 2016. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.03.019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276516300028>.

HARGREAVE, Marie; JENSEN, Allan; TOENDER, Anita; ANDERSEN, Klaus Kaae; KJAER, Susanne Krüger. Fertility treatment and childhood cancer risk: A systematic meta-analysis. **Fertility and Sterility**, [S. I.], v. 100, n. 1, p. 150–161, 2013. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.03.017.

HENNINGSEN, A. A. et al. Imprinting disorders in children born after ART: A Nordic

study from the CoNARTaS group. **Human Reproduction**, [S. l.], v. 35, n. 5, p. 1178–1184, 2020. DOI: 10.1093/humrep/deaa039.

HOUSEMAN, Eugene Andres; ACCOMANDO, William P.; KOESTLER, Devin C.; CHRISTENSEN, Brock C.; MARSIT, Carmen J.; NELSON, Heather H.; WIENCKE, John K.; KELSEY, Karl T. DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. **BMC Bioinformatics**, [S. l.], v. 13, p. 86, 2012. DOI: 10.1186/1471-2105-13-86. Disponível em: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-13-86>.

HU, Zhuang; XIE, Lingling. LHX6 inhibits breast cancer cell proliferation and invasion via repression of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Molecular Medicine Reports**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 4634–4639, 2015. DOI: 10.3892/mmr.2015.3997.

JAFFE, Andrew E.; MURAKAMI, Peter; LEE, Hwajin; LEEK, Jeffrey T.; FALLIN, M. Daniele; FEINBERG, Andrew P.; IRIZARRY, Rafael A. Bump hunting to identify differentially methylated regions in epigenetic epidemiology studies. **International Journal of Epidemiology**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 200–209, 2012. DOI: 10.1093/ije/dyr238.

JOHNSON, W. Evan; LI, Cheng; RABINOVIC, Ariel. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. **Biostatistics**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 118–127, 2007. DOI: 10.1093/biostatistics/kxj037.

JUNG, Samil et al. Epigenetic regulation of the potential tumor suppressor gene, hLHX6.1, in human cervical cancer. **International Journal of Oncology**, [S. l.], v. 38, n. 3, p. 859–869, 2011. DOI: 10.3892/ijo.2011.904.

LATINO-MARTEL, Paule; CHAN, Doris S. M.; DRUESNE-PECOLLO, Nathalie; BARRANDON, Emilie; HERCBERG, Serge; NORAT, Teresa. Maternal Alcohol Consumption during Pregnancy and Risk of Childhood Leukemia: Systematic Review and Meta-analysis. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 1238–1260, 2010. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-09-1110. Disponível em: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-09-1110>.

LEEK JT; JOHNSON WE; PARKER HS; FERTIG EJ; JAFFE AE; ZHANG Y; STOREY JD; TORRES, LC. **sva: Surrogate Variable Analysis. R package version 3.40.0.**, 2017.

LIODIS, Petros; DENAXA, Myrto; GRIGORIOU, Marirena; AKUFO-ADDO, Cynthia; YANAGAWA, Yuchio; PACHNIS, Vassilis. Lhx6 activity is required for the normal migration and specification of cortical interneuron subtypes. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 27, n. 12, p. 3078–3089, 2007. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3055-06.2007.

LIU, W-b; JIANG, X.; HAN, F.; LI, Y-h; CHEN, H-q; LIU, Y.; CAO, J.; LIU, J-y. LHX6 acts as a novel potential tumour suppressor with epigenetic inactivation in lung cancer. **Cell Death & Disease**, [S. l.], v. 4, n. 10, p. e882, 2013. DOI: 10.1038/cddis.2013.366. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/cddis2013366>.

LV, Hong et al. Assisted reproductive technology and birth defects in a Chinese birth

cohort study. **The Lancet Regional Health - Western Pacific**, [S. l.], v. 7, p. 100090, 2021. DOI: 10.1016/j.lanwpc.2020.100090. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2666606520300900>.

MAKSIMOVIC, Jovana; GORDON, Lavinia; OSHLACK, Alicia. SWAN: Subset-quantile Within Array Normalization for Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChips. **Genome Biology**, [S. l.], v. 13, n. 6, p. R44, 2012. DOI: 10.1186/gb-2012-13-6-r44. Disponível em: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2012-13-6-r44>.

MANSELL, Georgina; GORRIE-STONE, Tyler J.; BAO, Yanchun; KUMARI, Meena; SCHALKWYK, Leonard S.; MILL, Jonathan; HANNON, Eilis. Guidance for DNA methylation studies: Statistical insights from the Illumina EPIC array. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 1–15, 2019. DOI: 10.1186/s12864-019-5761-7.

MOORE, Lee E. et al. Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. **The Lancet Oncology**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 359–366, 2008. DOI: 10.1016/S1470-2045(08)70038-X.

NATHALIA, Evelyn; THEARDY, Madelaine Skolastika; ELVIRA, Sharleen; ROSELLINNY, Graciella; LIYANTO, Andrew Steven; UTAMA, Michael Putra; SUMARPO, Anton. Downregulation of tumor-suppressor gene LHX6 in cancer: a systematic review. **Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de médecine interne**, [S. l.], v. 56, n. 3, p. 135–142, 2018. DOI: 10.2478/rjim-2018-0008.

PLOTLY TECHNOLOGIES INC. **Collaborative data science** Montreal, QC Plotly Technologies Inc., , 2015. Disponível em: <https://plot.ly>.

QIN, Jiabi; LIU, Xiaoying; SHENG, Xiaoqi; WANG, Hua; GAO, Shiyong. Assisted reproductive technology and the risk of pregnancy-related complications and adverse pregnancy outcomes in singleton pregnancies: a meta-analysis of cohort studies. **Fertility and Sterility**, [S. l.], v. 105, n. 1, p. 73–85, 2016. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.09.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.09.007>.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing** Vienna, Austria, 2021. Disponível em: <https://www.r-project.org/>.

RAIMONDI, S.; PEDOTTI, P.; TAIOLI, E. Meta-analysis of cancer incidence in children born after assisted reproductive technologies. **British Journal of Cancer**, [S. l.], v. 93, n. 9, p. 1053–1056, 2005. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602838.

SMYTH, Gordon K. Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments. **Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1–25, 2004. DOI: 10.2202/1544-6115.1027. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.2202/1544-6115.1027/html>.

TESCHENDORFF, Andrew E. et al. An Epigenetic Signature in Peripheral Blood Predicts Active Ovarian Cancer. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 4, n. 12, p. e8274, 2009. DOI:

10.1371/journal.pone.0008274. Disponível em:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0008274>.

TESCHENDORFF, Andrew E.; MARABITA, Francesco; LECHNER, Matthias; BARTLETT, Thomas; TEGNER, Jesper; GOMEZ-CABRERO, David; BECK, Stephan. A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 189–196, 2013. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts680.

TIAN, Yuan; MORRIS, Tiffany J.; WEBSTER, Amy P.; YANG, Zhen; BECK, Stephan; FEBER, Andrew; TESCHENDORFF, Andrew E. ChAMP: Updated methylation analysis pipeline for Illumina BeadChips. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 33, n. 24, p. 3982–3984, 2017. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx513.

WANG, Tingting et al. Cancer risk among children conceived by fertility treatment. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 144, n. 12, p. 3001–3013, 2019. DOI: 10.1002/ijc.32062.

WETTENHALL, J. M.; SMYTH, G. K. limmaGUI: A graphical user interface for linear modeling of microarray data. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 20, n. 18, p. 3705–3706, 2004. DOI: 10.1093/bioinformatics/bth449. Disponível em:
<https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/bth449>.

WOO, Hae Dong; KIM, Jeongseon. Global DNA Hypomethylation in Peripheral Blood Leukocytes as a Biomarker for Cancer Risk: A Meta-Analysis. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. e34615, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0034615. Disponível em:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0034615>.

WOZNIAK, Magdalena B. et al. Integrative Genome-Wide Gene Expression Profiling of Clear Cell Renal Cell Carcinoma in Czech Republic and in the United States. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. e57886, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0057886. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0057886>.

XU, Cheng-Jian et al. The emerging landscape of dynamic DNA methylation in early childhood. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 25, 2017. DOI: 10.1186/s12864-016-3452-1. Disponível em:
<http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-016-3452-1>.

YAN, Lei; CAI, Kerui; SUN, Kai; GUI, Jinqiu; LIANG, Jun. MiR-1290 promotes proliferation, migration, and invasion of glioma cells by targeting LHX6. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 233, n. 10, p. 6621–6629, 2018. DOI: 10.1002/jcp.26381.

YANG, Juntang et al. LHX6, an independent prognostic factor, inhibits lung adenocarcinoma progression through transcriptional silencing of β -catenin. **Journal of Cancer**, [S. l.], v. 8, n. 13, p. 2561–2574, 2017. DOI: 10.7150/JCA.19972.

YUAN, Fang; FANG, Kai Heng; HONG, Yuan; XU, Shi Bo; XU, Min; PAN, Yufeng; LIU, Yan. LHX6 is essential for the migration of human pluripotent stem cell-derived GABAergic interneurons. **Protein and Cell**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 286–291, 2020. DOI: 10.1007/s13238-019-00686-6.

Supplementary materials

Supplemental Table S1a. Control group 1 description

| ID | Sex | Age at blood extraction (years) |
|-----------|------------|--|
| C1 | M | 1 |
| C2 | M | 10 |
| C3 | M | 11 |
| C4 | M | 5 |
| C5 | M | 8 |
| C6 | M | 10 |
| C7 | F | 2 |
| C8 | F | 7 |
| C9 | F | 5 |
| C10 | F | 6 |
| C11 | F | 10 |
| C12 | F | 6 |

M = Male. F = Female

Supplemental Table S1b. Control group 2 description

| ID | Sex | Age at blood extraction (years) |
|--------------------|------------|--|
| NB1 | M | 5 |
| NB2 | M | 2 |
| NB3 | F | 7 |
| NB4 | F | 3 |
| NB5 | M | 2.5 |
| AML1 (GSM3532210) | F | 6.8 |
| AML2 (GSM3532392) | F | 5.6 |
| AML3 (GSM3532243) | F | 1.9 |
| AML4 (GSM3532249) | M | 14.3 |
| AML5 (GSM3532204) | M | 10.2 |
| AML6 (GSM3532212) | F | 1.9 |
| AML7 (GSM3532350) | M | 9.3 |
| AML8 (GSM3532258) | F | 3.2 |
| AML9 (GSM3532425) | M | 3 |
| AML10 (GSM3532203) | F | 3.9 |
| AML11 (GSM3532269) | F | 8.8 |

M = Male. F = Female

Supplemental Table S2a. DMRs found and their respective information.

| DMR ID | chromosome | genomic position (start) (hg19) | genomic position (end) (hg19) | DMR width (bp) | CpG number | pvalue | family-wise error rate | Gene |
|--------|------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------|------------|-------------|------------------------|---------------------------------|
| DMR_1 | 9 | 124990632 | 124991435 | 803 | 9 | 0.000491591 | 0.224 | LHX6 |
| DMR_2 | 2 | 30669385 | 30670170 | 785 | 9 | 0.000560586 | 0.24 | LCLAT1 |
| DMR_3 | 6 | 33084479 | 33085063 | 584 | 14 | 0.001578266 | 0.484 | HLA-DPB2 |
| DMR_4 | 6 | 24910720 | 24911615 | 895 | 15 | 0.002138853 | 0.608 | FAM65B |
| DMR_5 | 6 | 33560953 | 33561264 | 311 | 7 | 0.002690815 | 0.692 | C6orf227 |
| DMR_6 | 7 | 27170241 | 27170994 | 753 | 13 | 0.003536007 | 0.732 | HOXA4 |
| DMR_7 | 6 | 32118204 | 32118457 | 253 | 13 | 0.004510565 | 0.808 | PRRT1 |
| DMR_8 | 9 | 124989052 | 124990276 | 1224 | 11 | 0.005062527 | 0.864 | LHX6 |
| DMR_9 | 5 | 135415693 | 135416613 | 920 | 12 | 0.005743855 | 0.904 | MIR886 |
| DMR_10 | 6 | 151646540 | 151647133 | 593 | 7 | 0.011030617 | 0.936 | AKAP12 |
| DMR_11 | 5 | 157079404 | 157079825 | 421 | 8 | 0.011410091 | 0.948 | SOX30 |
| DMR_12 | 6 | 31148332 | 31148666 | 334 | 12 | 0.008063821 | 0.952 | <i>n.a. (intergenic region)</i> |
| DMR_13 | 17 | 7253308 | 7253720 | 412 | 7 | 0.012031048 | 0.956 | KCTD11; ACAP1 |
| DMR_14 | 5 | 102898463 | 102898733 | 270 | 8 | 0.013540319 | 0.964 | NUDT12 |
| DMR_15 | 18 | 77623199 | 77623598 | 399 | 8 | 0.018197499 | 0.968 | KCNG2 |
| DMR_16 | 7 | 142494148 | 142494595 | 447 | 9 | 0.014118154 | 0.972 | <i>n.a. (intergenic region)</i> |
| DMR_17 | 2 | 43903227 | 43904011 | 784 | 9 | 0.016179388 | 0.972 | PLEKHH2; C1GALT1C1L |
| DMR_18 | 12 | 122356033 | 122356852 | 819 | 10 | 0.013764554 | 0.976 | WDR66 |
| DMR_19 | 16 | 14402939 | 14403425 | 486 | 8 | 0.021129797 | 0.976 | MIR365A; MIR365-1 |
| DMR_20 | 5 | 132113601 | 132114055 | 454 | 10 | 0.014877102 | 0.984 | SEPT8 |
| DMR_21 | 19 | 46998786 | 46999307 | 521 | 9 | 0.021931867 | 0.988 | PNMAL2 |
| DMR_22 | 12 | 130821962 | 130822674 | 712 | 9 | 0.024381199 | 0.988 | PIWIL1 |
| DMR_23 | 6 | 31650735 | 31651158 | 423 | 11 | 0.014454506 | 0.992 | <i>n.a. (intergenic region)</i> |
| DMR_24 | 6 | 31760521 | 31761055 | 534 | 8 | 0.025545494 | 0.992 | VARS |
| DMR_25 | 21 | 36259067 | 36259623 | 556 | 8 | 0.029814575 | 0.996 | RUNX1 |

Supplemental Table S2b. ANEXO C.

Supplemental Table S3a. P x C1 - Statistically significant CpG differences and their respective individual information.

| CGI ID | chromosome | genome location (hg19) | gene | DMP location (in relation to gene) | DMP location (in relation to CpG) | pvalue | pvalue (Adjusted) | Average beta value (P group) | Average beta value (C1 group) | $\Delta\beta$ |
|------------|------------|------------------------|------|------------------------------------|-----------------------------------|----------|-------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------|
| cg00485681 | 9 | 124990761 | LHX6 | TSS1500 | island | 6.83E-10 | 8.23E-05 | 0.213955569 | 0.054686233 | 0.159269337 |
| cg17434149 | 9 | 124990763 | LHX6 | TSS1500 | island | 2.36E-07 | 1.76E-02 | 0.140839906 | 0.050040469 | 0.090799438 |
| cg21237939 | 9 | 124991047 | LHX6 | TSS200 | island | 6.31E-13 | 2.28E-07 | 0.292814295 | 0.042700771 | 0.250113523 |
| cg06347782 | 9 | 124991182 | LHX6 | TSS1500 | shore | 1.18E-12 | 2.83E-07 | 0.44355872 | 0.067031034 | 0.376527685 |
| cg04201727 | 9 | 124991209 | LHX6 | TSS1500 | shore | 4.50E-13 | 2.28E-07 | 0.327284874 | 0.035137422 | 0.292147452 |
| cg22254104 | 9 | 124991432 | LHX6 | TSS1500 | shore | 2.23E-09 | 2.31E-04 | 0.169926509 | 0.027793116 | 0.142133393 |
| cg02539128 | 9 | 124991435 | LHX6 | TSS1500 | shore | 7.64E-11 | 1.10E-05 | 0.187014555 | 0.041197246 | 0.145817308 |

Supplemental Table S3b. P x C2 - Statistically significant CpG differences and their respective individual information.

| CGI ID | chromosome | genome location (hg19) | gene | DMP location (in relation to gene) | DMP location (in relation to CpG) | pvalue | pvalue (Adjusted) | Average beta value (P group) | Average beta value (C2 group) | $\Delta\beta$ |
|------------|------------|------------------------|------|------------------------------------|-----------------------------------|----------|-------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------|
| cg00485681 | 9 | 124990761 | LHX6 | TSS1500 | island | 6.09E-09 | 1.27E-03 | 0.213955569 | 0.071110667 | 0.142844903 |
| cg17434149 | 9 | 124990763 | LHX6 | TSS1500 | island | 9.44E-08 | 6.82E-03 | 0.140839906 | 0.062625577 | 0.078214329 |
| cg21237939 | 9 | 124991047 | LHX6 | TSS200 | island | 1.74E-08 | 2.09E-03 | 0.292814295 | 0.07861953 | 0.214194765 |
| cg06347782 | 9 | 124991182 | LHX6 | TSS1500 | shore | 2.37E-08 | 2.45E-03 | 0.44355872 | 0.115451584 | 0.328107135 |
| cg04201727 | 9 | 124991209 | LHX6 | TSS1500 | shore | 3.07E-08 | 2.47E-03 | 0.327284874 | 0.070945082 | 0.256339792 |
| cg22254104 | 9 | 124991432 | LHX6 | TSS1500 | shore | 8.55E-09 | 1.27E-03 | 0.169926509 | 0.042641443 | 0.127285067 |
| cg02539128 | 9 | 124991435 | LHX6 | TSS1500 | shore | 4.83E-11 | 3.49E-05 | 0.187014555 | 0.057203841 | 0.129810714 |

Capítulo 6. *JAG1* como gene de predisposição a hepatoblastoma - relato de caso

A RARE CASE OF HEPATOBLASTOMA IN A SYNDROMIC CHILD WITH A DE NOVO JAG1 MUTATION

Gustavo Dib Dangoni¹; Anne Caroline Barbosa Teixeira^{1,2}; Talita Ferreira Aguiar^{1,3}; Sofia Mizuho Miura Sugayama⁵; Vicente Odone Filho⁵; Débora Romeo Bertola^{1,4*}; Ana Cristina Victorino Krepschi^{1*}

¹Department of Genetics and Evolutionary Biology, Human Genome and Stem Cell Research Center, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

²Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brazil

³Columbia Center for Translational Immunology, Columbia University Irving Medical Center, New York, New York, USA

⁴Genetics Unit, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁵Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Instituto de Tratamento do Câncer Infantil (ITACI), University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Received: 5 February 2023 | Revised: 2 March 2023 | Accepted: 3 March 2023

DOI: 10.1002/pbc.30311

LETTER TO THE EDITOR

Pediatric
Blood &
Cancer



aspho
The American Society of
Pediatric Hematology/Oncology

WILEY

A rare case of hepatoblastoma in a syndromic child with a de novo germline *JAG1* mutation

O hepatoblastoma é um tipo raro de tumor pediátrico com etiologia desconhecida e geralmente associado com diversos fatores de risco, como malformações congênitas e baixo peso ao nascer. Por outro lado, há poucas síndromes genéticas que são associadas com aumento no risco de hepatoblastoma. No presente estudo, reportamos o caso de um paciente com hepatoblastoma, atraso global do desenvolvimento, dismorfismos craniofaciais e drenagem anômala total de veias pulmonares. Após o sequenciamento do exoma completo do probando e seus genitores, identificamos a presença de uma variante germinativa frameshift *de novo* no gene *JAG1*, classificada como provavelmente patogênica. O gene *JAG1* geralmente está associado com a síndrome de Alagille, dentre outras condições clínicas. Essa síndrome, além da escassez dos ductos biliares intra-hepáticos, está associada com um aumento e risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Além disso, a proteína jagged-1 é crucial para o desenvolvimento dos sistemas cardiovascular, renal, esquelético e nervoso. Portanto, o presente estudo sugere o gene *JAG1* como candidato para o fenótipo de drenagem anômala total de veias pulmonares, além de reforçar a associação do gene *JAG1* com tumores hepáticos, em especial hepatoblastomas.

Palavras-chave: hepatoblastoma; *JAG1*; Jagged1; drenagem anômala total de veias pulmonares; síndrome de Alagille

Este artigo foi publicado no periódico *Pediatric Blood & Cancer* em março de 2023:
<https://doi.org/10.1002/pbc.30311>

To the Editor:

Hepatoblastoma is a rare type of embryonal tumor with unknown etiology, associated with several risk factors, including congenital malformations, low birth weight (<2,500 g), preterm birth, and parental smoking (SPECTOR; BIRCH, 2012; CHEN et al., 2021; NUSSBAUMER; BENESCH, 2022). A few genetic syndromes increase the risk for hepatoblastoma development, although the full mutational spectrum remains poorly elucidated (TAN et al., 2014; TROBAUGH-LOTRARIO et al., 2018; AGUIAR et al., 2022; SOBEL NAVEH et al., 2022).

Herein, we describe a male child presenting with global developmental delay, facial dysmorphisms and a complex congenital heart defect (scimitar syndrome with total anomalous pulmonary venous return) who developed hepatoblastoma, evolving to a fatal outcome (detailed clinical data available in Supporting Information). Physical examination at age 2 years revealed craniofacial dysmorphisms (**Figure 1A**), holosystolic heart murmur, abdominal distention, umbilical hernia, and prominent calcanei. Tumor analysis disclosed a high risk mixed epithelial-mesenchymal hepatoblastoma, PRETEXT 4; he died after a month of etoposide treatment. A male twin brother (diamniotic and dichorionic pregnancy; **Figure 1B**), who presented the same cardiac anomaly, died during the cardiac surgery; no DNA was available. Exome analysis of the proband identified a heterozygous *de novo* frameshift 4bp deletion in exon 26 of the *JAG1* gene (c.3445_3448delATAA) (**Supplemental Figure S1**), classified as likely pathogenic according to American College of Medical Genetics and Genomics and Association for Molecular Pathology guidelines (RICHARDS et al., 2015; BIESECKER; HARRISON, 2018).

Cardiovascular manifestations are present in 77% of individuals with *JAG1* mutations (MCELHINNEY et al., 2002; MENON et al., 2022). Germline *JAG1* mutations are commonly associated with tetralogy of Fallot (OMIM#187500), (MORGENTHAU; FRISHMAN, 2018) and Alagille syndrome (OMIM#118450), which is a multisystem disorder mostly caused by *JAG1* truncating variants (83%), through a haploinsufficiency mechanism (GROCHOWSKI; LOOMES; SPINNER, 2016; GILBERT et al., 2019). The majority (60-70%) of *JAG1* mutations are *de novo* (CROSNIER et al., 1999; SPINNER et al., 2001).

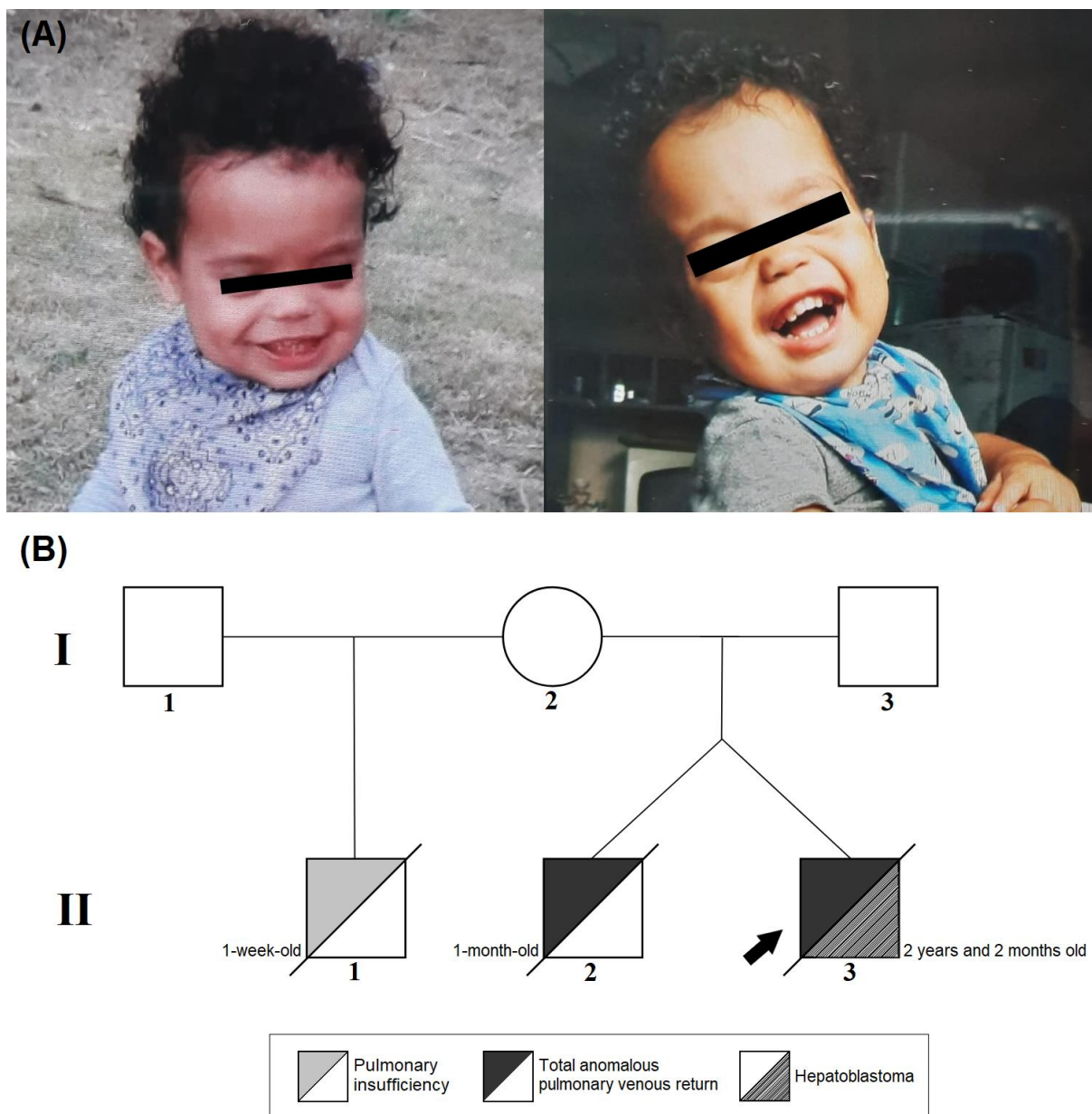


Figure 1. Patient images and family pedigree (parental permission was obtained to publish these images). (A) Patient craniofacial features at the age of 2 years, showing turricephaly, with a prominent forehead, downslanting palpebral fissures, short nose, depressed nasal bridge, anteverted nares, low-set ears, thin upper lip, and a short neck. (B) Family pedigree

In addition to other clinical signs, the proband had a rare complex cardiac anomaly, scimitar syndrome with total anomalous pulmonary venous return, which exhibits genetic heterogeneity (WANG et al., 2018; FICK et al., 2022). A similar occurrence of total anomalous pulmonary venous return was reported in a case of

Alagille syndrome with a frameshift mutation affecting exon 25 (ZENG et al., 2022). Taken together, these cases point to *JAG1* as a candidate gene for total anomalous pulmonary venous return and/or scimitar syndrome, perhaps associated with variants located in the last exons.

Bile duct paucity was not observed in the patient; however, this feature, even though considered the most frequent characteristic of Alagille syndrome, is not observed in ~10% of cases and is not always present in infancy (SPINNER et al., 2019). Because of his critical condition, a complete investigation of associated anomalies, including those seen in Alagille syndrome, could not be performed. Nonetheless, analysis of chest X-rays did not reveal butterfly vertebrae or other spine anomalies. The proband's twin brother was born with the same cardiac defect; while this finding suggests a shared genetic basis, the lack of DNA hampered confirmation. Although dichorionic twins, there is still a possibility that they were identical and therefore shared the genome. Alternatively, in the hypothesis of being fraternal twins, parental mosaicism for the *JAG1* mutation should be considered, as has been reported in ~8% of Alagille syndrome cases (GIANNAKUDIS et al., 2001).

JAG1 encodes a protein with a large extracellular component, a transmembrane domain and a small intracellular domain, which plays a critical role in Notch signaling, which is important in the development of the cardiovascular, renal, skeletal and nervous systems (GROCHOWSKI; LOOMES; SPINNER, 2016). The majority of *JAG1* pathogenic variants associated with Alagille syndrome are mapped to the extracellular or transmembrane domains (exons 2–25). Variants in exon 26, as detected here, affecting the intracellular domain, are rare (YUAN; KOHSAKA; KOBAYASHI, 1997; GIANNAKUDIS et al., 2001; BAUER et al., 2010; JURKIEWICZ et al., 2014; LI et al., 2015; HUANG et al., 2017; MORGENTHAU; FRISHMAN, 2018; GILBERT et al., 2019). *JAG1* upregulation has been associated with several types of cancer (GROCHOWSKI; LOOMES; SPINNER, 2016; KIM et al., 2022). It is noteworthy that Alagille syndrome is associated with hepatocellular carcinoma risk, with 21 reported pediatric patients (KAMATH; SPINNER; PICCOLI, 2014; VALAMPARAMPIL et al., 2020; SCHINDLER et al., 2021). Furthermore, rare pediatric cases of Alagille syndrome with hepatoblastoma, hepatic adenomas and giant hepatic regenerative nodules have also been described (RAPP et al., 2017; PACHECO; MONROE; HORSLEN, 2018; SAHOO et al., 2022).

Molecular mechanisms related to hepatoblastoma involves oncogenic signaling pathways such as Wnt, Sonic Hedgehog, PI3K/AKT, MAPK, IGF and Notch, the latter considered crucial in the JAG1-NOTCH interaction (GROCHOWSKI; LOOMES; SPINNER, 2016; SHARMA; SUBBARAO; SAXENA, 2017). The *JAG1* intracellular domain, here found to be germline mutated, was reported to act as a transcriptional cofactor, establishing an oncogenic transcriptional complex that promotes cancer cell stemness and aggressiveness (KIM et al., 2022). Considering the location of the germline mutation in the last exon, the mRNA could escape from the nonsense-mediated RNA decay, resulting in a truncated protein with an oncogenic signal that could contribute to hepatoblastoma development.

In the absence of paucity of bile ducts and other extracardiac features, the patient here described did not fulfill the full clinical spectrum of Alagille syndrome. However, the detection of a *de novo* mutation in the intracellular domain of the JAG1 protein in a patient with hepatoblastoma and the clinical overlap with Alagille syndrome is intriguing, since mutations within this domain are rare. Therefore, this case implicates *JAG1* as a candidate gene for scimitar syndrome and/or total anomalous pulmonary venous return, and reinforces the association of *JAG1* with hepatoblastoma risk, thus expanding the set of genes linked to hepatoblastoma susceptibility.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the patient and parents for participating in this study.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest.

FUNDING

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (grant number 88887.606266/2021-00); and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, São Paulo Research Foundation (grant numbers: 2018/21047-9, 2018/05961-2).

ETHICS APPROVAL STATEMENT

The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national guidelines on human experimentation (Resolution 466/12) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008, and have been approved by the Ethics and Research Committee of ITACI (CAAE 47277115.0.0000.0068) and Institute of Biosciences (CAAE: 09163818.4.0000.5464) (University of São Paulo, São Paulo, Brazil).

PATIENT CONSENT STATEMENT

Written informed consent from the parents was provided to publish the patient's information and images.

Bibliography

AGUIAR, Talita et al. Unraveling the Genetic Architecture of Hepatoblastoma Risk: Birth Defects and Increased Burden of Germline Damaging Variants in Gastrointestinal/Renal Cancer Predisposition and DNA Repair Genes. **Frontiers in Genetics**, [S. l.], v. 13, n. April, 2022. DOI: 10.3389/fgene.2022.858396. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2022.858396/full>.

BAUER, Robert C. et al. Jagged1 (JAG1) mutations in patients with tetralogy of fallot or pulmonic stenosis. **Human Mutation**, [S. l.], v. 31, n. 5, p. 594–601, 2010. DOI: 10.1002/humu.21231. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu.21231>.

BIESECKER, Leslie G.; HARRISON, Steven M. The ACMG/AMP reputable source criteria for the interpretation of sequence variants. **Genetics in Medicine**, [S. l.], v. 20, n. 12, p. 1687–1688, 2018. DOI: 10.1038/gim.2018.42. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1098360021000162>.

CHEN, Huitong; GUAN, Qian; GUO, Huiqin; MIAO, Lei; ZHUO, Zhenjian. The Genetic Changes of Hepatoblastoma. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 11, n. July, p. 1–9, 2021. DOI: 10.3389/fonc.2021.690641.

CROSNIER, C.; DRIANCOURT, C.; RAYNAUD, N.; DHORNE-POLLET, S.; POLLET, N.; BERNARD, O.; HADCHOUEL, M.; MEUNIER-ROTIVAL, M. Mutations in JAGGED1 gene are predominantly sporadic in Alagille syndrome. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 116, n. 5, p. 1141–1148, 1999. DOI: 10.1016/S0016-5085(99)70017-X.

FICK, Tyler A.; SCOTT, Daryl A.; LUPO, Philip J.; WEIGAND, Justin; MORRIS, Shaine A. The frequency and efficacy of genetic testing in individuals with scimitar syndrome. **Cardiology in the Young**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 550–557, 2022. DOI: 10.1017/S1047951121002535.

GIANNAKUDIS, Joannis et al. Parental mosaicism of JAG1 mutations in families with Alagille syndrome. **European Journal of Human Genetics**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 209–216, 2001. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200613.

GILBERT, Melissa A. et al. Alagille syndrome mutation update: Comprehensive overview of JAG1 and NOTCH2 mutation frequencies and insight into missense variant classification. **Human Mutation**, [S. l.], v. 40, n. 12, p. 2197–2220, 2019. DOI: 10.1002/humu.23879. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/humu.23879>.

GROCHOWSKI, Christopher M.; LOOMES, Kathleen M.; SPINNER, Nancy B. Jagged1 (JAG1): Structure, expression, and disease associations. **Gene**, [S. l.], v. 576, n. 1, p. 381–384, 2016. DOI: 10.1016/j.gene.2015.10.065. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.065>.

HUANG, Tianhong; YANG, Guilin; DANG, Xiao; AO, Feijian; LI, Jiankang; HE, Yizhou; TANG, Qiyuan; HE, Qing. Implementing targeted region capture sequencing for the clinical detection of Alagille syndrome: An efficient and cost-effective method. **Molecular Medicine Reports**, [S. l.], v. 16, n. 5, p. 6876–6881, 2017. DOI: 10.3892/mmr.2017.7429.

JURKIEWICZ, Dorota et al. Spectrum of JAG1 gene mutations in Polish patients with Alagille syndrome. **Journal of Applied Genetics**, [S. l.], v. 55, n. 3, p. 329–336, 2014. DOI: 10.1007/s13353-014-0212-2.

KAMATH, Binita M.; SPINNER, Nancy B.; PICCOLI, David A. Alagille syndrome. *In: Liver Disease in Children*. [s.l.] : Cambridge University Press, 2014. v. 22p. 216–233. DOI: 10.1017/CBO9781139012102.015. Disponível em: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/CBO9781139012102A024/type/book_part.

KIM, Eun-jung et al. Article The oncogenic JAG1 intracellular domain is a transcriptional cofactor that acts in concert with II II The oncogenic JAG1 intracellular domain is a transcriptional cofactor that acts in concert with DDX17 / SMAD3 / TGIF2. **CellReports**, [S. l.], v. 41, n. 8, p. 111626, 2022. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111626. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111626>.

LI, Liting; DONG, Jibin; WANG, Xiaohong; GUO, Hongmei; WANG, Huijun; ZHAO, Jing; QIU, Yiling; ABUDUXIKUER, Kuerbanjiang; WANG, Jianshe. JAG1 mutation spectrum and origin in Chinese children with clinical features of alagille syndrome. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 1–11, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0130355.

MCELHINNEY, Doff B.; KRANTZ, Ian D.; BASON, Lynn; PICCOLI, David A.; EMERICK, Karan M.; SPINNER, Nancy B.; GOLDMUNTZ, Elizabeth. Analysis of cardiovascular phenotype and genotype-phenotype correlation in individuals with a JAG1 mutation and/or Alagille syndrome. **Circulation**, [S. l.], v. 106, n. 20, p. 2567–2574, 2002. DOI: 10.1161/01.CIR.0000037221.45902.69.

MENON, Jagadeesh; SHANMUGAM, Naresh; VIJ, Mukul; RAMMOHAN, Ashwin; RELA, Mohamed. Multidisciplinary Management of Alagille Syndrome. **Journal of Multidisciplinary Healthcare**, [S. l.], v. 15, n. January, p. 353–364, 2022. DOI: 10.2147/JMDH.S295441.

MORGENTHAU, Ari; FRISHMAN, William H. Genetic Origins of Tetralogy of Fallot. **Cardiology in Review**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 86–92, 2018. DOI: 10.1097/CRD.000000000000170. Disponível em: <https://journals.lww.com/00045415-201803000-00005>.

NUSSBAUMER, Gunther; BENESCH, Martin. Hepatoblastoma in molecularly defined, congenital diseases. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, [S. l.], v. 188, n. 9, p. 2527–2535, 2022. DOI: 10.1002/ajmg.a.62767.

PACHECO, M. Cristina; MONROE, Eric J.; HORSLEN, Simon P. Hepatic Adenoma Arising in a Patient With Alagille Syndrome: A Case Report. **Pediatric and Developmental Pathology**, [S. l.], v. 21, n. 6, p. 585–589, 2018. DOI: 10.1177/1093526618762550.

RAPP, Jordan B.; BELLAH, Richard D.; MAYA, Carolina; PAWEL, Bruce R.; ANUPINDI, Sudha A. Giant hepatic regenerative nodules in Alagille syndrome. **Pediatric Radiology**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 197–204, 2017. DOI: 10.1007/s00247-016-3728-2. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00247-016-3728-2>.

RICHARDS, Sue et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**, [S. l.], v. 17, n. 5, p. 405–424, 2015. DOI: 10.1038/gim.2015.30.

SAHOO, Bishnupriya; AGRAWAL, Sumit; KUMAR, Karunesh; MALHOTRA, Smita; SIBAL, Anupam. Hepatoblastoma in Alagille Syndrome. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, [S. l.], v. 12, p. S57, 2022. DOI: 10.1016/j.jceh.2022.07.146. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2022.07.146>.

SCHINDLER, Emma A.; GILBERT, Melissa A.; PICCOLI, David A.; SPINNER, Nancy B.; KRANTZ, Ian D.; LOOMES, Kathleen M. Alagille syndrome and risk for hepatocellular carcinoma: Need for increased surveillance in adults with mild liver phenotypes. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, [S. l.], v. 185, n. 3, p. 719–731, 2021. DOI: 10.1002/ajmg.a.62028.

SHARMA, Divya; SUBBARAO, Girish; SAXENA, Romil. Hepatoblastoma. **Seminars in Diagnostic Pathology**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 192–200, 2017. DOI: 10.1053/j.semmp.2016.12.015.

SOBEL NAVEH, Natali S.; TRAXLER, Emily M.; DUFFY, Kelly A.; KALISH, Jennifer M. Molecular networks of hepatoblastoma predisposition and oncogenesis in Beckwith-Wiedemann syndrome. **Hepatology Communications**, [S. l.], v. 6, n. 8, p. 2132–2146, 2022. DOI: 10.1002/hep4.1972. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep4.1972>.

SPECTOR, Logan G.; BIRCH, Jill. The epidemiology of hepatoblastoma. **Pediatric Blood & Cancer**, [S. l.], v. 59, n. 5, p. 776–779, 2012. DOI: 10.1002/pbc.24215. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pbc.24215>.

SPINNER, Nancy B.; COLLITON, Raymond P.; CROSNIER, Cécile; KRANTZ, Ian D.; HADCHOUEL, Michelle; MEUNIER-ROTIVAL, Michèle. Jagged1 mutations in Alagille syndrome. **Human Mutation**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 18–33, 2001. DOI: 10.1002/1098-1004(2001)17:1<18::AID-HUMU3>3.0.CO;2-T.

SPINNER, Nancy B.; GILBERT, Melissa A.; LOOMES, Kathleen M.; KRANTZ, Ian D. **Alagille Syndrome**. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1273/>.

TAN, Zhen Han; LAI, Angeline; CHEN, Ching Kit; CHANG, Kenneth T. E.; TAN, Ah Moy. Association of trisomy 18 with hepatoblastoma and its implications. **European Journal of Pediatrics**, [S. l.], v. 173, n. 12, p. 1595–1598, 2014. DOI: 10.1007/s00431-013-2147-8. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00431-013-2147-8>.

TROBAUGH-LOTRARIO, Angela D.; LÓPEZ-TERRADA, Dolores; LI, Peng; FEUSNER, James H. Hepatoblastoma in patients with molecularly proven familial adenomatous polyposis: Clinical characteristics and rationale for surveillance screening. **Pediatric Blood & Cancer**, [S. l.], v. 65, n. 8, p. e27103, 2018. DOI: 10.1002/pbc.27103. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pbc.27103>.

VALAMPARAMPIL, Joseph J.; SHANMUGAM, Naresh; VIJ, Mukul; REDDY, Mettu Srinivas; RELA, Mohamed. Hepatocellular Carcinoma in Paediatric Patients with Alagille Syndrome: Case Series and Review of Literature. **Journal of Gastrointestinal Cancer**, [S. l.], v. 51, n. 3, p. 1047–1052, 2020. DOI: 10.1007/s12029-020-00391-2.

WANG, Hanjay; KALFA, David; ROSENBAUM, Marlon S.; GINNS, Jonathan N.; LEWIS, Matthew J.; GLICKSTEIN, Julie S.; BACHA, Emile A.; CHAI, Paul J. Scimitar Syndrome in Children and Adults: Natural History, Outcomes, and Risk Analysis. **The Annals of Thoracic Surgery**, [S. l.], v. 105, n. 2, p. 592–598, 2018. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2017.06.061. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000349751730961X>.

YUAN, Zeng Rong; KOHSAKA, Takao; KOBAYASHI, Noboru. Linkage analysis and identification of deletion in Alagille syndrome gene. **Pediatrics International**, [S. l.], v. 39, n. 6, p. 647–652, 1997. DOI: 10.1111/j.1442-200X.1997.tb03661.x.

ZENG, Han-Shi; ZHANG, Zhan-Hui; HU, Yan; ZHENG, Gui-Lang; WANG, Jing; ZHANG, Jing-Wen; GUO, Yu-Xiong. Alagille syndrome associated with total anomalous pulmonary venous connection and severe xanthomas: A case report. **World Journal of Clinical Cases**, [S. l.], v. 10, n. 25, p. 8932–8938, 2022. DOI: 10.12998/wjcc.v10.i25.8932. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/2307-8960/full/v10/i25/8932.htm>.

Supporting Information

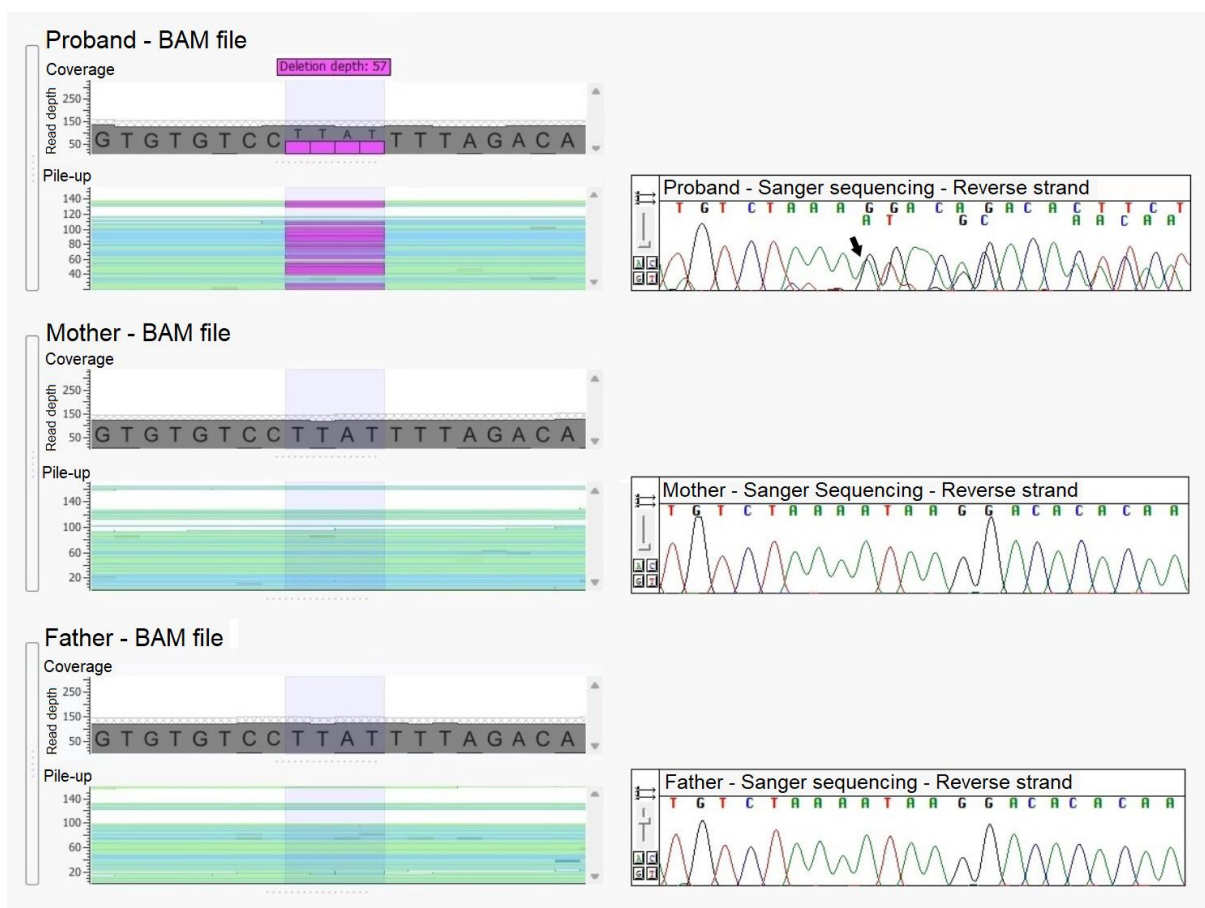
Detailed clinical data

This patient was enrolled in a research protocol aiming to characterize the molecular aspects of syndromic pediatric cancer after written informed consent was signed by parents.

Herein, we describe a male child presenting with facial dysmorphisms and a complex congenital heart defect who developed a hepatoblastoma at the age of 2 years, evolving to a fatal outcome. His parents are healthy and nonconsanguineous and had a previous premature child who died in the first week of life because of respiratory distress. The proband is the product of a diamniotic and dichorionic twin pregnancy, born at 32 3/7 weeks, with a birth weight of 1,820 g. He evolved with respiratory distress soon after birth, followed by apneic episodes on the second day of life requiring mechanical ventilation, as well as peritoneal dialysis, the latter for three days because of renal failure. Complementary exams revealed a normal renal ultrasound and an echocardiogram with scimitar syndrome with total anomalous pulmonary venous return, restrictive atrial septal defect, and pulmonary hypertension, which required two cardiac surgical procedures in a period of three months. He was released from the hospital after six months, with oxygen supplementation. His male twin brother presented the same cardiac anomaly and died during the surgical procedure. At the age of two years, showing developmental delay, the proband evolved with worsening of the respiratory pattern and abdominal distension. Physical examination revealed an abdominal mass in the right liver quadrant, with an extremely high level of α -fetoprotein (32,417 ng/mL). Abdominal computed tomography scan showed hepatomegaly and hypoattenuating hepatic lesions with progressive heterogeneous enhancement, the largest one measuring 7.3 X 6.8 X 5.7 cm in liver segments VIII/IV. Histopathological

analysis disclosed a mixed epithelial-mesenchymal hepatoblastoma, with staging PRETEXT 4, classified as a high-risk tumor. At that time, no abnormalities of the intra- and extrahepatic bile ducts were observed. The physical examination at the age of 2 years and one month, under orotracheal intubation and mechanical ventilation in the intensive care unit, showed a weight of 9,800 g and a length of 77 cm (Z scores of -2 and -3, respectively); craniofacial dysmorphisms, such as turricephaly, with a prominent forehead, downslanting palpebral fissures, short nose, depressed nasal bridge, anteverted nares, low-set ears, thin upper lip, and a short neck; holosystolic heart murmur, a sternal scar; abdominal distention, umbilical hernia; and prominent calcanei. As the child was critically ill, the oncology team decided to start etoposide treatment, but he died after one month.

Analysis of chest X-rays did not reveal butterfly vertebrae or other spine anomalies. Chromosomal microarray analysis (CMA; Agilent 180K array-based comparative genomic hybridization) was performed using genomic DNA extracted from the patient's peripheral blood. No clinically relevant copy number variant was identified. Genomic libraries for whole-exome analysis were constructed with the xGen Exome Research Panel V2.0 - Integrated DNA Technologies, Inc. The analysis was based on a trio approach (patient and parents) and a heterozygous *de novo* frameshift 4bp deletion in exon 26 of the *JAG1* gene (c.3445_3448delATAA) was identified.



Supplementary Figure S1. BAM file images (left) of whole exome sequencing of the proband and his parents, and at right, Sanger sequencing (reverse strand) segregation analysis of the region of the mutation. The mutation was classified as likely pathogenic according to American College of Medical Genetics and Genomics and Association for Molecular Pathology guidelines (PVS1_Moderate: null variant in a gene where loss of function is a known mechanism of disease; PM2: absent from controls in population databases; PS2_Moderate: *de novo* variant, both maternity and paternity confirmed, in a patient with the disease and without family history).

Capítulo 7. Discussão Geral e Conclusões

O câncer pediátrico apresenta sobrevida de 80%, a considerar a condição como um grupo e avaliando países desenvolvidos. Entretanto, é uma das principais causas de morte em crianças no mundo e tem previsão de incidência de 7.930 crianças brasileiras por ano no triênio de 2023 a 2025 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2023). Adicionalmente, existem inúmeros efeitos secundários nocivos decorrentes do próprio tratamento do câncer, que é baseado em drogas antigas e estratégias que pouco evoluíram para a maioria dos subtipos, cujo impacto num organismo em desenvolvimento é grande.

A etiologia do câncer pediátrico permanece pouco elucidada; embora muitos fatores de risco já tenham sido associados ao desenvolvimento do câncer pediátrico, dentre eles fatores genéticos, poucos fatores ambientais apresentam significância estatística robusta (SPECTOR; PANKRATZ; MARCOTTE, 2015; PLON; LUPO, 2019; SCHRAW et al., 2020). Além da predisposição ao câncer causada pela presença de variantes genéticas patogênicas em modelo monogênico, alterações epigenéticas podem ser postuladas como mediadoras da atuação de fatores ambientais, resultando em aumento de risco. Dessa forma, o presente estudo foi direcionado para a investigação de duas vertentes de mecanismos genômicos que podem aumentar o risco de desenvolvimento de câncer na infância: a presença de variantes patogênicas em genes de predisposição a câncer (conhecidos ou candidatos), bem como a etiologia genética subjacente de casos sindrômicos, e a ocorrência de modificações epigenéticas, especificamente DNAm, derivadas da FIV.

Alterações epigenéticas aberrantes durante o desenvolvimento embrionário podem estar associadas a aumento de risco de câncer pediátrico. Nessa hipótese, os procedimentos relacionados às tecnologias de reprodução assistida são candidatos a gerar tais alterações epigenéticas. Visando explorar essa hipótese, utilizamos o chip Infinium MethylationEPIC (Illumina) para análise de metiloma de sangue periférico de 11 pacientes que desenvolveram câncer pediátrico e foram concebidos por FIV, em comparação ao metiloma de crianças concebidas naturalmente, sendo 12 delas clinicamente saudáveis e 16 pacientes com câncer pediátrico (dados obtidos de cinco crianças com neuroblastoma e 11 crianças com leucemia mieloide aguda). O principal

objetivo deste braço do estudo foi a identificação de sítios CpG ou regiões diferencialmente metiladas potencialmente associadas à FIV. Identificamos 25 regiões diferencialmente metiladas no grupo de pacientes com câncer pediátrico concebidos por FIV em comparação ao grupo de crianças híginas. A alteração mais significativa foi a hipermetilação da região promotora do gene *LHX6*, contendo nove sítios CpGs diferencialmente metilados. O gene *LHX6* é um provável supressor tumoral reconhecidamente associado com diversos tipos de câncer, como de cabeça e pescoço, células gliais, pâncreas, mama, colo do útero, e de pulmão (ESTÉCIO et al., 2006; JUNG et al., 2011; LIU et al., 2013; HU; XIE, 2015; YAN et al., 2018; ABUDUREXITI et al., 2020). A hipermetilação da região promotora de *LHX6* já foi descrita em câncer de cabeça e pescoço, pâncreas, pulmão, do colo do útero, e fígado (ESTÉCIO et al., 2006; JUNG et al., 2011; LIU et al., 2013; NATHALIA et al., 2018; CHEN et al., 2019; ABUDUREXITI et al., 2020).

Posteriormente, comparamos o padrão de metilação de pacientes com câncer pediátrico concebidos por FIV com pacientes com câncer pediátrico de subtipos similares concebidos naturalmente, para verificar se a hipermetilação identificada seria um efeito da FIV ou do próprio câncer. Como resultado, a diferença de metilação identificada entre pacientes FIV e grupo de crianças híginas se manteve estatisticamente significativa também nessa comparação, sugerindo que a hipermetilação da região promotora do gene *LHX6* seria decorrente do processo de FIV, e não do câncer pediátrico.

Portanto, a hipermetilação da região promotora do gene *LHX6*, que já foi previamente associada com câncer, foi sugerida em nosso estudo como uma epimutação que pode ter contribuído para aumento do risco de câncer na infância no grupo de pacientes concebidos por FIV aqui avaliado. Esse achado é preliminar e baseia-se em grupo pequeno, embora raro de pacientes; a investigação do padrão de metilação da região promotora do gene *LHX6* em grupo maior de crianças concebidas por FIV em comparação a controles poderia determinar se devida modificação epigenética é um fenômeno que ocorre com frequência neste procedimento. Há variáveis que não foram avaliadas em nosso estudo, como idade dos genitores e uso de medicamentos de fertilização, que também podem resultar em alterações nos níveis de metilação (WANG et al., 2019). Outra limitação a ser mencionada foi a utilização de microarranjo de metilação, que, embora abrangente, não compreende

todos os sítios CpG do genoma; o microarranjo de metilação utilizado possui 850 mil sondas, contendo apenas 58% dos *enchancers* do projeto FANTOM5, 7% dos elementos regulatórios distais e 27% dos elementos regulatórios proximais do projeto ENCODE (PIDSLEY et al., 2016). O sequenciamento de bissulfito em escala genômica, embora de alto custo, continua sendo considerado o padrão-ouro na detecção de DNAm. Adicionalmente, outros mecanismos epigenéticos, além da metilação do DNA, como modificações de histona, estrutura da cromatina e arquitetura do núcleo, devem ser analisados para obter uma visão ampla do epigenoma humano (RIVERA; REN, 2013).

Cerca de 8% dos casos de câncer em adultos são decorrentes de variantes germinativas patogênicas altamente penetrantes em genes de predisposição ao câncer (HUANG et al., 2018). De maneira similar, a frequência de variantes germinativas patogênicas em genes de predisposição a câncer em crianças e adolescentes tem sido estimada entre 6-25%, a depender do estudo, da composição da coorte de pacientes averiguada e também do painel de genes avaliado (ZHANG et al., 2015; GRÖBNER et al., 2018; NEWMAN et al., 2021; VON STEDINGK et al., 2021; SYLVESTER et al., 2022). Se considerarmos que parte dos estudos de predisposição a câncer baseia-se em avaliação apenas de painel restrito de genes reconhecidos de predisposição a câncer, e que parte da etiologia genética do câncer pediátrico ainda não foi elucidada, é possível inferir que essa prevalência pode estar subestimada. Dessa forma, avaliações mais abrangentes, como sequenciamento de exoma ou genoma, visando a prospecção de variantes germinativas patogênicas em genes reconhecidos e candidatos de predisposição a câncer, bem como pesquisa de novos genes, podem revelar frequências mais altas em alguns subgrupos de pacientes, associações novas entre tipos tumorais e genes específicos, com identificação de novos mecanismos moleculares subjacentes.

Por meio da análise de microarranjo genômico e de sequenciamento de exoma completo de 22 pacientes com câncer pediátrico, sendo dez deles síndromicos com fenótipos clínicos adicionais, foi possível identificar em 14% dos pacientes (3/22) variantes germinativas patogênicas/provavelmente patogênicas em genes com padrão de herança dominante e reconhecidos de predisposição ao câncer, compatíveis com o respectivo tipo tumoral. Tais genes são: *TP53*, em uma paciente com carcinoma de ovário; *RB1*, em uma paciente síndromica com retinoblastoma

bilateral; e *APC*, em uma paciente com tumor embrionário do sistema nervoso central. No entanto, se considerarmos também variantes monoalélicas em genes reconhecidos de predisposição com padrão de herança recessivo (*MUTYH* e *RECQL4*), em genes candidatos para a predisposição ao câncer (*JAG1*, *KAT6A*, *SETD5* e *TNFRSF13*) e/ou tumores que não são associados com o respectivo gene de predisposição, a taxa de detecção de variantes clinicamente relevantes foi de 45%.

Do mesmo modo que em estudos recentes e similares (NEWMAN et al., 2021; SYLVESTER et al., 2022), uma porção significativa dos casos avaliados tinha variantes em genes sem associação prévia com o respectivo tipo tumoral. Foi possível estabelecer novas associações entre o gene *JAG1* e hepatoblastoma; *KAT6A* em astrocitoma; *PTEN* e leucemia mieloide aguda; *SETD5* com o neuroblastoma; *TNFRSF13B* e histiocitose de células de Langherans.

Além disso, dez pacientes com câncer pediátrico exibiam fenótipos clínicos adicionais (sindrômicos), para os quais pudemos identificar em quatro deles (40%) variantes associadas ao quadro clínico completo. Portanto, em 60% dos pacientes sindrômicos, o fenótipo não foi totalmente elucidado, mesmo após a realização da análise de microarranjo e sequenciamento de exoma completo. Considerando as limitações dos testes utilizados, como o fato da análise ter sido restrita a variantes do tipo CNVs e SNV/indels codificadoras, é provável que outras variantes de alta penetrância ainda não identificadas existam. Além disso, mecanismos mais complexos, em modelos oligogênicos ou poligênicos de predisposição a câncer, não foram explorados em nosso estudo. A identificação de mecanismos causais de condições raras pela aplicação de testes genéticos com melhores taxas de detecção é crucial. Como exemplo de outras estratégias, o sequenciamento do genoma completo permite a avaliação de uma gama maior de variantes genéticas, incluindo variantes estruturais além das CNVs, assim como a análise de variantes não codificadoras que podem ser responsáveis pela regulação epigenética (SEABY; ENNIS, 2020). Adicionalmente, análises de transcrição envolvendo amostras tumorais, como realizado por Newman e colaboradores (2021), podem contribuir na elucidação da causa molecular subjacente.

Como conclusão, a identificação de variantes germinativas deletérias em genes de predisposição ao câncer (*APC*, *JAG1*, *KAT6A*, *LZTR1*, *MUTYH*, *PTEN*, *RB1*, *RECQL4*, *SETD5*, *SQSTM1*, *TNFRSF13B* e *TP53*), bem como a análise de alterações

do epigenoma (hipermetilação no gene *LHX6* em crianças com câncer geradas por FIV), contribuíram respectivamente para o diagnóstico molecular de parte dos casos, elucidação de possíveis causas do câncer pediátrico, com proposição de novas associações gene/subtipo tumoral, bem como proposição de novos mecanismos biológicos (modificações epigenéticas na embriogênese). Abaixo estão listados os principais achados e conclusões do presente estudo:

- Detecção de 25 regiões diferencialmente metiladas após a análise de DNAm em amostras de sangue periférico de 11 pacientes com câncer pediátricos gerados por FIV em comparação a grupos-controle.
- Identificação de hipermetilação da região promotora do gene supressor tumoral *LHX6* no grupo de pacientes com câncer pediátrico gerados por FIV, com significância estatística, em comparação a grupos controle de crianças concebidas naturalmente (sem câncer e com câncer pediátrico).
- Taxa de detecção de variantes genéticas germinativas potencialmente patogênicas em 45% na casuística de 22 pacientes.
- Na análise por CMA de 22 pacientes, identificação de duas CNVs patogênicas abrangendo genes reconhecidos de predisposição a câncer.
- Na análise por sequenciamento de exoma, identificação no grupo de 20 pacientes, dez variantes classificadas como patogênicas/provavelmente patogênicas.
- Novas associações entre genes de predisposição e subtipos tumorais.
- Proposição do gene *TNFRSF13B* como novo candidato a aumento de risco para histiocitose de células de Langherans.

Referências Bibliográficas

ABUDUREXITI, Yakefujiang; GU, Zhaodi; CHAKMA, Kanchan; HATA, Tatsuo; MOTOI, Fuyuhiko; UNNO, Michiaki; HORII, Akira; FUKUSHIGE, Shinichi. Methylation-mediated silencing of the LIM homeobox 6 (LHX6) gene promotes cell proliferation in human pancreatic cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 526, n. 3, p. 626–632, 2020. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.03.120. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.120>.

ALEJANDRO SWEET-CORDERO, E.; BIEGEL, Jaclyn A.; SWEET-CORDERO, E. Alejandro; BIEGEL, Jaclyn A. The genomic landscape of pediatric cancers: Implications for diagnosis and treatment. **Science**, [S. l.], v. 363, n. 6432, p. 1170–1175, 2019. DOI: 10.1126/science.aaw3535. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/>.

AMBERGER, Joanna S.; BOCCHINI, Carol A.; SCHIETTECATTE, François; SCOTT, Alan F.; HAMOSH, Ada. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 43, n. D1, p. D789–D798, 2015. DOI: 10.1093/nar/gku1205. Disponível em: <http://academic.oup.com/nar/article/43/D1/D789/2439148/OMIMorg-Online-Mendelian-Inheritance-in-Man-OMIM>.

ANVISA. **13º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões (SisEmbrio)**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrljoiYmYxM2M1MTctNGE5ZC00ODdhLTk3ZTkYTBhMzBkMjhjYjM1IiwidCI6ImI2N2FmMjNmLWMzZjMtNGQzNS04MGM3LWI3MDg1ZjVIZGQ4MSJ9>.

ARMENIAN, Saro H.; MEADOWS, Anna T.; BHATIA, Smita. Late effects of childhood cancer and its treatment. In: **Pizzo PA, Poplack, DG. Principles and Practice of Pediatric Oncology**. 7th. ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer, 2015.

ARYEE, Martin J.; JAFFE, Andrew E.; CORRADA-BRAVO, Hector; LADD-ACOSTA, Christine; FEINBERG, Andrew P.; HANSEN, Kasper D.; IRIZARRY, Rafael A. Minfi: A flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 30, n. 10, p. 1363–1369, 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu049.

AUTON, Adam et al. A global reference for human genetic variation. **Nature**, [S. l.], v. 526, n. 7571, p. 68–74, 2015. DOI: 10.1038/nature15393.

BARKER, D. J. .. J. P.; OSMOND, C.; WINTER, P. .. D.; MARGETTS, B.; SIMMONDS, S. .. J. WEIGHT IN INFANCY AND DEATH FROM ISCHAEMIC HEART DISEASE. **The Lancet**, [S. l.], v. 334, n. 8663, p. 577–580, 1989. DOI: 10.1016/S0140-6736(89)90710-1. Disponível em: <https://www.jnma.com.np/jnma/index.php/jnma/article/view/1018>.

BARKER, D. J. P. The origins of the developmental origins theory. **Journal of**

Internal Medicine, [S. I.], v. 261, n. 5, p. 412–417, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x.

BIANCO-MIOTTO, T.; CRAIG, J. M.; GASSER, Y. P.; VAN DIJK, S. J.; OZANNE, S. E. Epigenetics and DOHaD: From basics to birth and beyond. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, [S. I.], v. 8, n. 5, p. 513–519, 2017. DOI: 10.1017/S2040174417000733.

BIESECKER, Leslie G.; HARRISON, Steven M. The ACMG/AMP reputable source criteria for the interpretation of sequence variants. **Genetics in Medicine**, [S. I.], v. 20, n. 12, p. 1687–1688, 2018. DOI: 10.1038/gim.2018.42. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1098360021000162>.

BIRD, Adrian; TAGGART, Mary; FROMMER, Marianne; MILLER, Orlando J.; MACLEOD, Donald. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. **Cell**, [S. I.], v. 40, n. 1, p. 91–99, 1985. DOI: 10.1016/0092-8674(85)90312-5.

BOLOURI, Hamid et al. The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. **Nature Medicine**, [S. I.], v. 24, n. 1, p. 103–112, 2018. DOI: 10.1038/nm.4439. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nm.4439>.

CANTONE, Irene; FISHER, Amanda G. Epigenetic programming and reprogramming during development. **Nature Publishing Group**, [S. I.], v. 20, n. 3, p. 282–289, 2013. DOI: 10.1038/nsmb.2489. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2489>.

CHALLIS, Danny; YU, Jin; EVANI, Uday S.; JACKSON, Andrew R.; PAITHANKAR, Sameer; COARFA, Cristian; MILOSAVLJEVIC, Aleksandar; GIBBS, Richard A.; YU, Fuli. An integrative variant analysis suite for whole exome next-generation sequencing data. **BMC Bioinformatics**, [S. I.], v. 13, n. 1, 2012. DOI: 10.1186/1471-2105-13-8.

CHANG, Aimee S.; MOLEY, Kelle H.; WANGLER, Michael; FEINBERG, Andrew P.; DEBAUN, Michael R. Association between Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproductive technology: A case series of 19 patients. **Fertility and Sterility**, [S. I.], v. 83, n. 2, p. 349–354, 2005. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2004.07.964. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028204028559>.

CHEN, Hong-qiang et al. Epigenetic inactivation of LHX6 mediated microcystin-LR induced hepatocarcinogenesis via the Wnt/ β -catenin and P53 signaling pathways. **Environmental Pollution**, [S. I.], v. 252, p. 216–226, 2019. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.05.049. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.049>.

COX, Gerald F.; BÜRGER, Joachim; LIP, Va; MAU, Ulrike A.; SPERLING, Karl; WU, Bai Lin; HORSTHEMKE, Bernhard. Intracytoplasmic sperm injection may increase, the risk of imprinting defects. **American Journal of Human Genetics**, [S. I.], v. 71, n. 1, p. 162–164, 2002. DOI: 10.1086/341096.

DAWSON, Mark A.; KOUZARIDES, Tony. Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. **Cell**, [S. I.], v. 150, n. 1, p. 12–27, 2012. DOI: 10.1016/j.cell.2012.06.013.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>.

DEBAUN, Michael R.; NIEMITZ, Emily L.; FEINBERG, Andrew P. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. **American Journal of Human Genetics**, [S. l.], v. 72, n. 1, p. 156–160, 2003. DOI: 10.1086/346031.

EDGAR, Ron; DOMRACHEV, Michael; LASH, Alex E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 207–210, 2002. DOI: 10.1093/nar/30.1.207.

ERIKSSON, Margaretha; WEDEL, Hans; WALLANDER, Mari-Ann; KRAKAU, Ingvar; HUGOSSON, Jonas; CARLSSON, Sture; SVÄRDSUDD, Kurt. The impact of birth weight on prostate cancer incidence and mortality in a population-based study of men born in 1913 and followed up from 50 to 85 years of age. **The Prostate**, [S. l.], v. 67, n. 11, p. 1247–1254, 2007. DOI: 10.1002/pros.20428. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/pros.20428>.

ESTÉCIO, M. R. H.; YOUSSEF, E. M.; RAHAL, P.; FUKUYAMA, E. E.; GÓIS-FILHO, J. F.; MANIGLIA, J. V.; GOLONI-BERTOLLO, E. M.; ISSA, J. P. J.; TAJARA, E. H. LHX6 is a sensitive methylation marker in head and neck carcinomas. **Oncogene**, [S. l.], v. 25, n. 36, p. 5018–5026, 2006. DOI: 10.1038/sj.onc.1209509.

EUROPEAN SOCIETY OF HUMAN REPRODUCTION AND EMBRYOLOGY. **ART fact sheet**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.eshre.eu/Press-Room/Resources.aspx>.

FILBIN, Mariella; MONJE, Michelle. Developmental origins and emerging therapeutic opportunities for childhood cancer. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 367–376, 2019. DOI: 10.1038/s41591-019-0383-9. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41591-019-0383-9>.

FISHER, Paul Graham; REYNOLDS, Peggy; VON BEHREN, Julie; CARMICHAEL, Suzan L.; RASMUSSEN, Sonja A.; SHAW, Gary M. Cancer in children with nonchromosomal birth defects. **Journal of Pediatrics**, [S. l.], v. 160, n. 6, p. 978–983, 2012. DOI: 10.1016/j.jpeds.2011.12.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2011.12.006>.

FORCE, Lisa M. et al. The global burden of childhood and adolescent cancer in 2017: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet Oncology**, [S. l.], v. 20, n. 9, p. 1211–1225, 2019. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30339-0.

GILBOA, Daniella; KOREN, Gideon; BARER, Yael; KATZ, Rachel; ROTEM, Ram; LUNENFELD, Eitan; SHALEV, Varda. Assisted reproductive technology and the risk of pediatric cancer: A population based study and a systematic review and meta analysis. **Cancer Epidemiology**, [S. l.], v. 63, p. 101613, 2019. DOI: 10.1016/j.canep.2019.101613. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2019.101613>.

GRÖBNER, Susanne N. et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. **Nature**, [S. l.], v. 555, n. 7696, p. 321–327, 2018. DOI:

10.1038/nature25480.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **International Journal of Epidemiology**, [S. l.], v. 42, n. 5, p. 1215–1222, 2013. DOI: 10.1093/ije/dyt133.

HANSEN, Michéle; KURINCZUK, Jennifer J.; MILNE, Elizabeth; DE KLERK, Nicholas; BOWER, Carol. Assisted reproductive technology and birth defects: A systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction Update**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 330–353, 2013. DOI: 10.1093/humupd/dmt006.

HARGREAVE, Marie; JENSEN, Allan; HANSEN, Merete Kjær; DEHLENDORFF, Christian; WINTHER, Jeanette Falck; SCHMIEGELow, Kjeld; KJÆR, Susanne K. Association Between Fertility Treatment and Cancer Risk in Children. **JAMA**, [S. l.], v. 322, n. 22, p. 2203, 2019. DOI: 10.1001/jama.2019.18037. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2757228>.

HARGREAVE, Marie; JENSEN, Allan; TOENDER, Anita; ANDERSEN, Klaus Kaae; KJÆR, Susanne Krüger. Fertility treatment and childhood cancer risk: A systematic meta-analysis. **Fertility and Sterility**, [S. l.], v. 100, n. 1, p. 150–161, 2013. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.03.017.

HE, Dandan; FANG, Yuan; GUNTER, Marc J.; XU, Dongli; ZHAO, Yanping; ZHOU, Jie; FANG, Hong; XU, Wang Hong. Incidence of breast cancer in Chinese women exposed to the 1959-1961 great Chinese famine. **BMC Cancer**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–9, 2017. DOI: 10.1186/s12885-017-3794-3.

HOUSEMAN, Eugene Andres; ACCOMANDO, William P.; KOESTLER, Devin C.; CHRISTENSEN, Brock C.; MARSIT, Carmen J.; NELSON, Heather H.; WIENCKE, John K.; KELSEY, Karl T. DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. **BMC Bioinformatics**, [S. l.], v. 13, p. 86, 2012. DOI: 10.1186/1471-2105-13-86. Disponível em: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-13-86>.

HU, Zhuang; XIE, Lingling. LHX6 inhibits breast cancer cell proliferation and invasion via repression of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Molecular Medicine Reports**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 4634–4639, 2015. DOI: 10.3892/mmr.2015.3997.

HUANG, Kuan lin et al. Pathogenic Germline Variants in 10,389 Adult Cancers. **Cell**, [S. l.], v. 173, n. 2, p. 355–370.e14, 2018. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.039.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Incidência, mortalidade e morbidade hospitalar por câncer em crianças, adolescentes e adultos jovens no Brasil: Informações dos registros de câncer e do sistema de mortalidade**. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/wcm/incidencia/2017/pdf/versao-completa.pdf>.

JAFFE, Andrew E.; MURAKAMI, Peter; LEE, Hwajin; LEEK, Jeffrey T.; FALLIN, M. Daniele; FEINBERG, Andrew P.; IRIZARRY, Rafael A. Bump hunting to identify differentially methylated regions in epigenetic epidemiology studies. **International Journal of Epidemiology**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 200–209, 2012. DOI: 10.1093/ije/dyr238.

JOHNSON, W. Evan; LI, Cheng; RABINOVIC, Ariel. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. **Biostatistics**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 118–127, 2007. DOI: 10.1093/biostatistics/kxj037.

JOHNSTON, W. T.; ERDMANN, Friederike; NEWTON, Robert; STELIAROVA-FOUCHER, Eva; SCHÜZ, Joachim; ROMAN, Eve. Childhood cancer: Estimating regional and global incidence. **Cancer Epidemiology**, [S. l.], n. December, p. 12, 2020. DOI: 10.1016/j.canep.2019.101662. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2019.101662>.

JONES, Peter A. Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature Reviews Genetics**, [S. l.], v. 13, n. 7, p. 484–492, 2012. DOI: 10.1038/nrg3230. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3230>.

JONGMANS, Marjolijn C. J.; LOEFFEN, Jan L. C. M.; WAANDERS, Esmé; HOOGERBRUGGE, Peter M.; LIGTENBERG, Marjolijn J. L.; KUIPER, Roland P.; HOOGERBRUGGE, Nicoline. Recognition of genetic predisposition in pediatric cancer patients: An easy-to-use selection tool. **European Journal of Medical Genetics**, [S. l.], v. 59, n. 3, p. 116–125, 2016. DOI: 10.1016/j.ejmg.2016.01.008.

JUNG, Samil et al. Epigenetic regulation of the potential tumor suppressor gene, hLHX6.1, in human cervical cancer. **International Journal of Oncology**, [S. l.], v. 38, n. 3, p. 859–869, 2011. DOI: 10.3892/ijo.2011.904.

KÄLLÉN, Bengt; FINNSTRÖM, Orvar; LINDAM, Anna; NILSSON, Emma; NYGREN, Karl Gösta; OLAUSSON, Petra Otterblad. Cancer risk in children and young adults conceived by in vitro fertilization. **Pediatrics**, [S. l.], v. 126, n. 2, 2010. DOI: 10.1542/peds.2009-3225.

KANDOTH, Cyriac et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. **Nature**, [S. l.], v. 502, n. 7471, p. 333–339, 2013. DOI: 10.1038/nature12634.

KARCZEWSKI, Konrad J. et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. **Nature**, [S. l.], v. 581, n. 7809, p. 434–443, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2308-7.

KATTNER, Patricia et al. Compare and contrast: pediatric cancer versus adult malignancies. **Cancer and Metastasis Reviews**, [S. l.], v. 38, n. 4, p. 673–682, 2019. DOI: 10.1007/s10555-019-09836-y.

KRATZ, Christian P. et al. Predisposition to cancer in children and adolescents. **The Lancet Child and Adolescent Health**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 142–154, 2021. DOI: 10.1016/S2352-4642(20)30275-3. Disponível em: www.thelancet.com/child-adolescent.

KREPISCHI, Ana Cristina Victorino; CAPELLI, Leonardo Pires; SILVA, Amanda Gonçalves; DE ARAÚJO, Érica Sara Souza; PEARSON, Peter Lees; HECK, Benjamin; DA COSTA, Cecília Maria Lima; DE CAMARGO, Beatriz; ROSENBERG, Carla. Large germline copy number variations as predisposing factor in childhood neoplasms. **Future Oncology**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 1627–1633, 2014. DOI: 10.2217/fon.14.41.

KULIS, Marta; ESTELLER, Manel. DNA Methylation and Cancer. **Advances in Genetics**, [S. l.], v. 70, n. C, p. 27–56, 2010. DOI: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2.

LANDRUM, Melissa J. et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 46, n. D1, p. D1062–D1067, 2018. DOI: 10.1093/nar/gkx1153. Disponível em: <http://academic.oup.com/nar/article/46/D1/D1062/4641904>.

LI, Heng. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. [S. l.], v. 00, n. 00, p. 1–3, 2013. Disponível em: <http://arxiv.org/abs/1303.3997>.

LISTER, Ryan et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **Nature**, [S. l.], v. 462, n. 7271, p. 315–322, 2009. DOI: 10.1038/nature08514. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature08514>.

LIU, Lingli et al. Increase in the prevalence of hypertension among adults exposed to the Great Chinese Famine during early life. **Environmental Health and Preventive Medicine**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 1–7, 2017. DOI: 10.1186/s12199-017-0671-2.

LIU, W-b; JIANG, X.; HAN, F.; LI, Y-h; CHEN, H-q; LIU, Y.; CAO, J.; LIU, J-y. LHX6 acts as a novel potential tumour suppressor with epigenetic inactivation in lung cancer. **Cell Death & Disease**, [S. l.], v. 4, n. 10, p. e882, 2013. DOI: 10.1038/cddis.2013.366. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/cddis2013366>.

LUPO, Philip J. et al. Association between Birth Defects and Cancer Risk among Children and Adolescents in a Population-Based Assessment of 10 Million Live Births. **JAMA Oncology**, [S. l.], v. 5, n. 8, p. 1150–1158, 2019. DOI: 10.1001/jamaoncol.2019.1215.

MA, Xiaotu et al. Pan-cancer genome and transcriptome analyses of 1,699 paediatric leukaemias and solid tumours. **Nature**, [S. l.], v. 555, n. 7696, p. 371–376, 2018. DOI: 10.1038/nature25795. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature25795>.

MCKENNA, Aaron et al. The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Research**, [S. l.], v. 20, n. 9, p. 1297–1303, 2010. DOI: 10.1101/gr.107524.110.

MCLAUGHLIN, Colleen C.; BAPTISTE, Mark S.; SCHYMURA, Maria J.; NASCA, Philip C.; ZDEB, Michael S. Maternal and Infant Birth Characteristics and Hepatoblastoma. **American Journal of Epidemiology**, [S. l.], v. 163, n. 9, p. 818–828, 2006. DOI: 10.1093/aje/kwj104. Disponível em:

<http://academic.oup.com/aje/article/163/9/818/108789/Maternal-and-Infant-Birth-Characteristics-and>.

MENG, Ruogu et al. Prenatal famine exposure, adulthood obesity patterns and risk of type 2 diabetes. **International Journal of Epidemiology**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 399–408, 2018. DOI: 10.1093/IJE/DYX228.

MOORE, Lisa D.; LE, Thuc; FAN, Guoping. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 23–38, 2013. DOI: 10.1038/npp.2012.112. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2012.112>.

MORGAN, Hugh D.; SANTOS, Fátima; GREEN, Kelly; DEAN, Wendy; REIK, Wolf. Epigenetic reprogramming in mammals. **Human Molecular Genetics**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 47–58, 2005. DOI: 10.1093/hmg/ddi114.

NASLAVSKY, Michel S. et al. Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from Brazil. **Nature Communications**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 1004, 2022. DOI: 10.1038/s41467-022-28648-3. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-28648-3>.

NATHALIA, Evelyn; THEARDY, Madelaine Skolastika; ELVIRA, Sharleen; ROSELLINNY, Graciella; LIYANTO, Andrew Steven; UTAMA, Michael Putra; SUMARPO, Anton. Downregulation of tumor-suppressor gene LHX6 in cancer: a systematic review. **Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de médecine interne**, [S. l.], v. 56, n. 3, p. 135–142, 2018. DOI: 10.2478/rjim-2018-0008.

NEWMAN, Scott et al. Genomes for kids: The scope of pathogenic mutations in pediatric cancer revealed by comprehensive dna and rna sequencing. **Cancer Discovery**, [S. l.], v. 11, n. 12, p. 3008–3027, 2021. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-1631.

NISHIYAMA, Atsuya; NAKANISHI, Makoto. Navigating the DNA methylation landscape of cancer. **Trends in Genetics**, [S. l.], v. 37, n. 11, p. 1012–1027, 2021. DOI: 10.1016/j.tig.2021.05.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016895252100130X>.

O'NEILL, Kate A. et al. Infant birthweight and risk of childhood cancer: International population-based case control studies of 40 000 cases. **International Journal of Epidemiology**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 153–168, 2015. DOI: 10.1093/ije/dyu265.

ØRSTAVIK, K. H.; EIKLID, K.; VAN DER HAGEN, C. B.; SPETALEN, S.; KIERULF, K.; SKJELDAL, O.; BUITING, K. Another Case of Imprinting Defect in a Girl with Angelman Syndrome Who Was Conceived by Intracytoplasmic Sperm Injection. **The American Journal of Human Genetics**, [S. l.], v. 72, n. 1, p. 218–219, 2003. DOI: 10.1086/346030. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707605230>.

PIDSLEY, Ruth et al. Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. **Genome Biology**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–17, 2016. DOI: 10.1186/s13059-016-1066-1. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-016-1066-1>.

PINBORG, A.; WENNERHOLM, U. B.; ROMUNDSTAD, L. B.; LOFT, A.; AITTO MAKI, K.; SÖ DERSTRÖM-ANTTILA, V.; NYGREN, K. G.; HAZEKAMP, J.; BERGH, C. **Why do singletons conceived after assisted reproduction technology have adverse perinatal outcome? Systematic review and meta-analysis.** *Human Reproduction Update*, 2013. DOI: 10.1093/humupd/dms044. Disponível em: <https://academic.oup.com/humupd/article-lookup/doi/10.1093/humupd/dms044>.

PLON, Sharon E.; LUPO, Philip J. Genetic Predisposition to Childhood Cancer in the Genomic Era. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, [S. l.], v. 20, p. 241–263, 2019. DOI: 10.1146/annurev-genom-083118-015415. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083118->.

QIN, Jiabi; LIU, Xiaoying; SHENG, Xiaoqi; WANG, Hua; GAO, Shiyu. Assisted reproductive technology and the risk of pregnancy-related complications and adverse pregnancy outcomes in singleton pregnancies: a meta-analysis of cohort studies. **Fertility and Sterility**, [S. l.], v. 105, n. 1, p. 73–85, 2016. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.09.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.09.007>.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing.** Vienna, Austria, 2021. Disponível em: <https://www.r-project.org/>.

RAHMAN, Nazneen. Realizing the promise of cancer predisposition genes. **Nature**, [S. l.], v. 505, n. 7483, p. 302–308, 2014. DOI: 10.1038/nature12981. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature12981>.

RAHMANI, Mina; TALEBI, Mehdi; HAGH, Majid Farshdousti; FEIZI, Abbas A. Hosseinpou.; SOLALI, Saeed. Aberrant DNA methylation of key genes and Acute Lymphoblastic Leukemia. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 97, n. October 2017, p. 1493–1500, 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.11.033. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.033>.

RAVELLI, Gian-Paolo; STEIN, Zena A.; SUSSER, Mervyn W. Obesity in Young Men after Famine Exposure in Utero and Early Infancy. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 295, n. 7, p. 349–353, 1976. DOI: 10.1056/NEJM197608122950701. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM197608122950701>.

RICHARDS, Sue et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**, [S. l.], v. 17, n. 5, p. 405–424, 2015. DOI: 10.1038/gim.2015.30.

RIPPERGER, Tim et al. Childhood cancer predisposition syndromes—A concise review and recommendations by the Cancer Predisposition Working Group of the Society for Pediatric Oncology and Hematology. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, [S. l.], v. 173, n. 4, p. 1017–1037, 2017. DOI: 10.1002/ajmg.a.38142.

RIVERA, Chloe M.; REN, Bing. Mapping Human Epigenomes. **Cell**, [S. l.], v. 155, n. 1, p. 39–55, 2013. DOI: 10.1016/j.cell.2013.09.011. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.011>.

ROBINSON, James T.; THORVALDSDÓTTIR, Helga; WINCKLER, Wendy; GUTTMAN, Mitchell; LANDER, Eric S.; GETZ, Gad; MESIROV, Jill P. Integrative Genome Viewer. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 24–6, 2011. DOI: 10.1038/nbt.1754.Integrative.

ROHRMANN, Sabine et al. Racial variation in sex steroid hormones and the insulin-like growth factor axis in umbilical cord blood of male neonates. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 1484–1491, 2009. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0817.

SAGHAFINIA, Sadegh; MINA, Marco; RIGGI, Nicolo; HANAHAN, Douglas; CIRIELLO, Giovanni. Pan-Cancer Landscape of Aberrant DNA Methylation across Human Tumors. **Cell Reports**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 1066- 1080.e8, 2018. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.09.082. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.082>.

SAVARY, Clara et al. Depicting the genetic architecture of pediatric cancers through an integrative gene network approach. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-58179-0.

SCHRAW, Jeremy M. et al. Cancer diagnostic profile in children with structural birth defects: An assessment in 15,000 childhood cancer cases. **Cancer**, [S. l.], v. 126, n. 15, p. 3483–3492, 2020. DOI: 10.1002/cncr.32982.

SEABY, Eleanor G.; ENNIS, Sarah. Challenges in the diagnosis and discovery of rare genetic disorders using contemporary sequencing technologies. **Briefings in Functional Genomics**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 243–258, 2020. DOI: 10.1093/bfpg/elaa009.

SMYTH, Gordon K. Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments. **Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1–25, 2004. DOI: 10.2202/1544-6115.1027. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.2202/1544-6115.1027/html>.

SPAAN, Mandy et al. Risk of cancer in children and young adults conceived by assisted reproductive technology. **Human Reproduction**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 740–750, 2019. DOI: 10.1093/humrep/dey394.

SPECTOR, Logan G. et al. Association of in Vitro Fertilization with Childhood Cancer in the United States. **JAMA Pediatrics**, [S. l.], v. 173, n. 6, p. 1–8, 2019. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2019.0392.

SPECTOR, Logan G.; PANKRATZ, Nathan; MARCOTTE, Erin L. Genetic and nongenetic risk factors for childhood cancer. **Pediatric Clinics of North America**, [S. l.], v. 62, n. 1, p. 11–25, 2015. DOI: 10.1016/j.pcl.2014.09.013.

SUNG, Hyuna; FERLAY, Jacques; SIEGEL, Rebecca L.; LAVERSANNE, Mathieu; SOERJOMATARAM, Isabelle; JEMAL, Ahmedin; BRAY, Freddie. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36

Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. DOI: 10.3322/caac.21660.

SYLVESTER, Dianne E. et al. Rare germline variants in childhood cancer patients suspected of genetic predisposition to cancer. **Genes, Chromosomes and Cancer**, [S. l.], v. 61, n. 2, p. 81–93, 2022. DOI: 10.1002/gcc.23006. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/gcc.23006>.

TESCHENDORFF, Andrew E.; MARABITA, Francesco; LECHNER, Matthias; BARTLETT, Thomas; TEGNER, Jesper; GOMEZ-CABRERO, David; BECK, Stephan. A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 189–196, 2013. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts680.

TIAN, Yuan; MORRIS, Tiffany J.; WEBSTER, Amy P.; YANG, Zhen; BECK, Stephan; FEBER, Andrew; TESCHENDORFF, Andrew E. ChAMP: Updated methylation analysis pipeline for Illumina BeadChips. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 33, n. 24, p. 3982–3984, 2017. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx513.

TOLLEFSBOL, Trygve O. **Handbook of epigenetics: The new molecular and medical genetics**. [s.l.: s.n.].

VENTURA-JUNCA, Patricio; IRARRAZAVAL, Isabel; ROLLE, Augusto J.; GUTIÉRREZ, Juan I.; MORENO, Ricardo D.; SANTOS, Manuel J. In vitro fertilization (IVF) in mammals: Epigenetic and developmental alterations. Scientific and bioethical implications for IVF in humans. **Biological Research**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 1–13, 2015. DOI: 10.1186/s40659-015-0059-y.

VON STEDINGK, Kristoffer et al. Prevalence of germline pathogenic variants in 22 cancer susceptibility genes in Swedish pediatric cancer patients. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–10, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-84502-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84502-4>.

WALKER, Cheryl Lyn; HO, Shuk Mei. Developmental reprogramming of cancer susceptibility. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 12, n. 7, p. 479–486, 2012. DOI: 10.1038/nrc3220.

WANG, Tingting et al. Cancer risk among children conceived by fertility treatment. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 144, n. 12, p. 3001–3013, 2019. DOI: 10.1002/ijc.32062.

WARD, Zachary J.; YEH, Jennifer M.; BHAKTA, Nickhill; FRAZIER, A. Lindsay; ATUN, Rifat. Estimating the total incidence of global childhood cancer: a simulation-based analysis. **The Lancet Oncology**, [S. l.], v. 20, n. 4, p. 483–493, 2019. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30909-4. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30909-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30909-4).

WATANABE, Yoshihisa; MAEKAWA, Masato. **Methylation of DNA in cancer**. 1. ed. [s.l.]: Elsevier Inc, 2010. v. 52 DOI: 10.1016/S0065-2423(10)52006-7. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2423\(10\)52006-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2423(10)52006-7).

YAN, Lei; CAI, Kerui; SUN, Kai; GUI, Jinqiu; LIANG, Jun. MiR-1290 promotes

proliferation, migration, and invasion of glioma cells by targeting LHX6. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 233, n. 10, p. 6621–6629, 2018. DOI: 10.1002/jcp.26381.

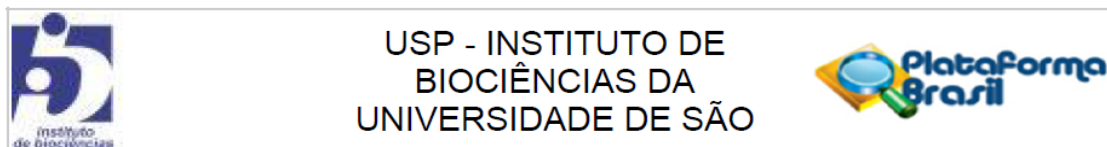
YANG, Xiaojing; HAN, Han; DE CARVALHO, Daniel D.; LAY, Fides D.; JONES, Peter A.; LIANG, Gangning. Gene Body Methylation Can Alter Gene Expression and Is a Therapeutic Target in Cancer. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 577–590, 2014. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.07.028. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S153561081400316X>.

ZHANG, Jinghui et al. Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 373, n. 24, p. 2336–2346, 2015. DOI: 10.1056/nejmoa1508054. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1508054>.

ZHOU, Wanding; LAIRD, Peter W.; SHEN, Hui. Comprehensive characterization, annotation and innovative use of Infinium DNA methylation BeadChip probes. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 45, n. 4, p. e22, 2017. DOI: 10.1093/nar/gkw967.

ANEXOS

ANEXO A. Parecer consubstanciado do CEP (CAAE: 09163818.4.0000.5464).



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Câncer na infância: predisposição genética e mecanismos de origem

Pesquisador: Ana Cristina Victorino Krepschi

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 09163818.4.0000.5464

Instituição Proponente: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - IBUSP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.305.596

Apresentação do Projeto:

O presente projeto investiga câncer na infância: predisposição genética e mecanismos de origem.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar fatores genômicos e epigenômicos que atuam no desenvolvimento de câncer na infância, por meio da investigação de variantes genéticas germinativas e somáticas e da investigação das alterações epigenéticas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O único desconforto é a coleta de sangue periférico das crianças, ou jovens, e seus progenitores. Há potencial em resultar no aconselhamento genético adequado das famílias nas quais forem encontradas variantes genéticas que resultem em predisposição aumentada a câncer.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Análise do projeto:

- a) Amostra a ser analisada: 50 pacientes afetados por tumores infantis e seus progenitores.
- b) Procedimentos a que as pessoas serão submetidas: coleta de sangue periférico para extração do material genético.
- c) Infraestrutura disponível: Laboratório da proponente e equipamento do Centro de Pesquisa sobre o

Endereço: Rua do Matão, Travessa 14, nº 321

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-090

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-8761

E-mail: cepibusp@ib.usp.br



USP - INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 3.305.596

Genoma Humano e Células-tronco.

d) Armazenamento da amostra: A coleção de amostras ficará sob os cuidados da proponente, a pesquisadora responsável, em seu laboratório.

e) Apoio financeiro: É relatado que foi pedido apoio financeiro à FAPESP para execução do projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Cabe à pesquisadora responsável encaminhar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Respostas referentes ao parecer do CEP nº 3.206.345, emitido em 18/03/2019.

(1) explicitar se haverá entrega de relatórios com resultados dos exames genéticos, como e onde será feito o aconselhamento genético das famílias participantes e se a pesquisadora principal será responsável por essa etapa; (2) esclarecer se será realizado sequenciamento de nova geração somente do DNA de sangue periférico, somente do DNA tumoral, ou de ambos, para comparação; (3) no item sobre metodologia é referido que o sequenciamento do exoma será realizado com o Kit One Seq, que permite avaliação do número de cópias; no entanto, no cronograma há menção a array-CGH, técnica que não foi abordada na metodologia; esclarecer se ambas serão utilizadas. (4) deixar claro se a avaliação das alterações epigenéticas será feita em amostras dos tumores ou de DNA extraído de sangue periférico, se há necessidade de amostras controle para comparação entre padrões e, em caso afirmativo, quais amostras serão utilizadas como controle.

Resposta: A pesquisadora responsável encaminhou as respostas às pendências apontadas acima. Foram esclarecidas as dúvidas sobre o delineamento experimental e na versão revista do projeto foram acrescentadas informações referentes às dúvidas levantadas, incluindo as questões relacionadas à constituição de um grupo controle para os estudos de metilação.

A esse respeito convém destacar que as amostras controle já coletadas ou que serão coletadas se destinam somente a avaliação de padrões de metilação, avaliamos que os termos de consentimento e de assentimento já apresentados são adequados para esse estudo.

Análise: Pendências atendidas.

Endereço: Rua do Matão, Travessa 14, nº 321

Bairro: Butantã

UF: SP

Telefone: (11)3091-8761

Município: SAO PAULO

CEP: 05.508-090

E-mail: cepibusp@ib.usp.br



USP - INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 3.305.596

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - Seres Humanos do Instituto de Biociências - USP, na reunião realizada em 09/04/2019.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|----------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1270416.pdf | 03/04/2019 16:34:25 | | Aceito |
| Brochura Pesquisa | Projeto_de_Pesquisa_Detalhado_resposta_parecer.pdf | 03/04/2019 16:32:55 | Ana Cristina Victorino Krepischi | Aceito |
| Outros | Resposta_ao_CEP.pdf | 03/04/2019 16:31:43 | Ana Cristina Victorino Krepischi | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Termo_de_Assentimento.pdf | 07/12/2018 11:46:16 | ANNE CAROLINE BARBOSA TEIXEIRA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_maior_de_18_anos_area_de_genetica.pdf | 07/12/2018 11:45:57 | ANNE CAROLINE BARBOSA TEIXEIRA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_menor_de_18_anos_area_de_genetica.pdf | 07/12/2018 11:45:38 | ANNE CAROLINE BARBOSA TEIXEIRA | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Declaracao_de_Compromisso_do_Pesquisador_Responsavel_area_de_genetica.pdf | 07/12/2018 11:45:21 | ANNE CAROLINE BARBOSA TEIXEIRA | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_rosto.pdf | 07/12/2018 11:44:42 | ANNE CAROLINE BARBOSA TEIXEIRA | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_de_Pesquisa_Detalhado.pdf | 05/12/2018 13:27:38 | ANNE CAROLINE BARBOSA TEIXEIRA | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua do Matão, Travessa 14, nº 321

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-090

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-8761

E-mail: cepibusp@ib.usp.br



USP - INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 3.305.596

SAO PAULO, 06 de Maio de 2019

Assinado por:
CELIA PRISZKULNIK KOIFFMANN
(Coordenador(a))

Endereço: Rua do Matão, Travessa 14, nº 321

Bairro: Butantã

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 05.508-090

Telefone: (11)3091-8761

E-mail: cepibusp@ib.usp.br

ANEXO B. Características clínicas dos pacientes sindrômicos (redigida por colaboradores).

TP1

Criança portadora de quadro sindrômico que tem relação com Cowden-Lhermitte-Duclos. Fenótipos clínicos: Hidrocefalia, hipotonia, macrocefalia, déficit de atenção e aprendizagem. História familiar: meia-irmã paterna com 32 anos e quadro similar.

TP7

O quadro clínico do paciente é composto por atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, deficiência intelectual com atraso de fala, convulsões, baixa estatura, assimetria craniana com afundamento direito, microcefalia e plagiocefalia, hipertelorismo ocular, palato alto, estreitamento bitemporal, orelhas baixas e giradas posteriormente, estrabismo, raiz nasal proeminente com ponte nasal ampla proeminente, lábio superior fino e canos da boca virados para baixo, escoliose, prega palmar única bilateral, ceratocone, pé torto, hipotonia neonatal e defeito cardíaco congênitos. Aos 14 anos, houve diagnóstico de glioblastoma de células gigantes grade IV (OMS 2007). A mãe e o tio materno apresentavam pé torto congênito, enquanto o pai e o tio paterno apresentavam ceratocone.

TP10

Exame clínico-genético aos 09 meses de idade e 27 dias:

Peso=8,800 kg (p50), Comprimento=73,0 cm (p50), PC=44,5 cm (p50). Regular estado geral, gemente, afebril, eupnéico, hipocorado +/4, hidratado, anictérico, acianótico, sem sinais meníngeos, boa perfusão periférica. (OBS: Durante a avaliação, a criança sugou seio materno várias vezes). Fácies peculiar, dolicocefalia, fronte ampla e proeminente, cabelos lisos castanho claros e ressecados, epicanto bilateral; olhos amendoados e levemente assimétricos, DICl=2,3 cm (~p25), DICE=8,0 cm (~p97); fendas palpebrais D=E=2,8 cm (p>97); ausência de fixação do olhar; estrabismo divergente à E, nistagmo horizontal bilateral; nariz bem formado, ponta nasal levemente bulbosa; filtro nasal bem delineado, orelhas bem formadas simétricas, normoimplantadas, orelha D=E=4,5cm (25<p<50); palato íntegro; pescoço pouco encurtado; tórax simétrico; distância intermamilar=12,0 cm (75<p<97); ausculta

cárdio-pulmonar sem alterações; abdome globoso, indolor e agrave; palpação; MMSS aparentemente simétricos e proporcionais; desproporção palmo digital com predomínio da palma, comprimento total da mão D=E=9,0 cm ($50 < p < 75$); dedo médio D= E=3,0 cm ($3 < p < 25$); braquidactilia com dedos fusiformes; pés D=E=11,0 cm ($p < < 3$); ausência de equimoses, ou petéquias; unhas sem alterações.

Sumário dos principais achados clínicos:

- LLA em lactente tipo B com SNC negativo; cardiopatia congênita (ecocardiograma demonstrou aumento da trabeculação do miocárdio do ventrículo esquerdo)
- Atraso de DNPM
- Dismorfismos craniofaciais menores-epicanto bilateral, braquidactila, dedos fusiformes
- Nistagmo horizontal bilateral, estrabismo divergente à E
- Avos maternos e bisavos maternos primos de 1º grau; bisavô materno falecido de leucemia; duas primas de 2º grau da mãe do paciente desenvolveram leucemia (SIC).

TP13

Exame clínico-genético aos 03 anos e 04 meses de idade:

Peso=9 kg ($p < < < 3$), Estatura=82,0 cm ($p < < < 3$); PC= 43,5 cm ($p < < < 3$). Regular estado geral, consciente, contatando com a mãe e ambiente, gemente e chorosa, afebril, taquidispnéica+++/4; hipocorada ++/4, hidratada, anictérica, acianótica, sem sinais meníngeos, regular perfusão periférica. Fácies peculiar, dolicocefalia, fronte bastante ampla, alongada e proeminente, região da glabella saliente, cabelos lisos castanho claros, longos, esparsos e muito ressecados; hipertricose na fronte e regiões laterais da face, epicanto bilateral; DICl=2,3 cm ($3 < p < 25$), DICE=7,5 cm (p50); fendas palpebrais com inclinação para cima, D=E=2,5 cm; ponte nasal rebaixada, nariz bem formado, ponta nasal levemente bulbosa; narinas antevertidas, filtro nasal bem delineado e alongado, orelhas simétricas posteriorizadas, anti-hélice e escapa da hélice proeminentes, orelha D=E=5,0 cm (p25); retrognatia; palato íntegro e ogival sem fissuras; dentes em bom aspecto geral aparentemente; pescoço encurtado; tórax simétrico e encurtado; PT=48,5 cm ($3 < p < 25$), distância intermamilar= 9,0 cm ($p < < 3$), pectus excavatum; ausculta cárdio-pulmonar: BRNF taquicárdicas, sem sopros; abdome extremamente globoso, volumoso, e doloroso à palpação; hérnia umbilical pequena; presença de circulação venosa colateral evidente; genitália externa

feminina, proeminência dos grandes lábios. Membros extremamente emagrecidos com subcutâneo escasso e hipotrofia generalizada da musculatura; MMSS aparentemente simétricos; contratura articular em MMSS com deformidades em flexão, limitação à prono-supinação e extensão dos antebraços bilateralmente; desproporção palmo-digital com predomínio da palma, mãos pequenas, comprimento total da mão D=9,8 cm (p3), E=10,3 cm (p3); dedo médio D= 3,5 (p<3), E=3,8 cm (p<3); camptodactilia dos 3º, 4º, e 5º dedos à D e E, prega palmar única transversal bilateralmente; pés pequenos em aspecto de mata-borrão com calcâneos proeminentes, pés planos adutos, pés D=E= ~12,5 cm (p<<3); sulcos plantares profundos; sulco plantar entre hálus e 2º artelho D profundo; ausência de equimoses, ou petéquias; unhas sem alterações; ausência de gânglios supra-claviculares e axilares. OBS: não foi possível examinar regiões inguinais e genitália externa (pequenos lábios não foram observados) e região anal, e sacral em DDH, pois a paciente estava sentada devido a desconforto respiratório.

Sumário dos principais achados clínicos:

- Tumor de Wilms de grandes dimensões originário no rim E
- Déficit de crescimento acentuado (*failure to thrive*), déficit-pondero-estatural e microcefalia acentuados
- Atraso global de DNPM
- Dismorfismos craniofaciais (epicanto bilateral, orelhas posteriorizadas, etc)
- Contraturas articulares congênitas em MMSS com deformidades em flexão
- Pés em mata-borrão

TP14

O probando é uma menina de 4 anos, filha única de pais não consaguíneos. Sua mãe foi diagnosticada com hipertensão arterial sistêmica (HAS) aos 22 anos, sendo necessário o uso de medicamentos para seu controle. Ela apresentou um aborto espontâneo anterior por conta de insuficiência cervical. Durante a gravidez do probando, foi realizada cerclagem e a HAS foi bem controlada. A ultrassonografia fetal revelou aumento da translucência nucal; exames de cariótipo e hibridização fluorescente in situ (FISH) para aneuploidias cromossômicas comuns apresentaram resultados normais. Ela nasceu a termo (39 semanas), de parto vaginal, com peso de 3.070 g (50º percentil), comprimento de 47 cm (25º percentil), circunferência occipito-

frontal (COF) de 33 cm (25º a 50º percentil) e Apgar de 8 e 9 no 1º e 5º minutos, respectivamente. A paciente evoluiu com desconforto respiratório leve e icterícia, sendo necessário fototerapia por um dia. A triagem auditiva neonatal foi anormal e a Audiometria de Tronco Cerebral (BERA) foi inconclusiva naquele momento. A menina evoluiu com atraso no desenvolvimento psicomotor: sentava sem apoio aos 9 meses, deambulava aos 20 meses e proferiu as primeiras palavras aos 21 meses. Ela foi encaminhada para um neurologista e geneticista clínico com os seguintes resultados: ressonância magnética cerebral (MRI) mostrou mega cisterna magna; cariótipo convencional, FISH para síndrome de Williams e triagem para distúrbios de armazenamento lisossômico eram normais. Aos 2 anos de idade, começaram os tremores nas mãos, além de calafrios. Ela foi internada apresentando progressão dos sintomas e regressão dos marcos adquiridos, sem diagnóstico adequado. Mais tarde naquele ano, uma massa torácica foi identificada e a paciente foi diagnosticada com neuroblastoma. A análise tumoral foi compatível com ganglioneuroblastoma misturado, consistindo em aproximadamente 30% de áreas imaturas (neuroblastos). Após a ressecção do tumor, a paciente evoluiu com melhora progressiva. Entretanto, ela ainda apresenta dificuldade para realizar atividades cotidianas, comportamento agitado e fala infantilizada. A mãe refere que a paciente tem tido dores de ouvido ocasionais na ausência de otorreia. O BERA foi repetido recentemente e apresentou perda auditiva condutiva unilateral leve. Não foram detectadas anomalias no ecocardiograma, ultrassonografia abdominal e avaliação oftalmológica. Foi avaliada em nossa Instituição pela última vez aos 3 anos e 5 meses de idade e o exame físico revelou: peso de 13,3 kg (10º – 25º percentil), estatura de 92,0 cm (5º – 10º percentil), COF de 49,0 cm (50º percentil); linha do cabelo frontal baixa, sobrancelhas arqueadas, sinofris, cílios longos, dobras epicânticas, nariz curto com ponte nasal baixa, filtro profundo e longo, orelhas com hélice dobrada; pescoço curto; camptodactilia do 5º dedo direito, geno valgo e pés planos com 3º e 5º dedos desviados.

TP15

Exame clínico-genético aos 01 anos e 10 meses de idade:

Peso=8,560 kg ($p<3$), Estatura=85 cm ($25<p<50$); PC=45,0 cm ($P<3$). Regular estado geral, geralmente consciente, contatando bem, afebril, taquipneico +4, hipocorado ++/4, hidratado, anictérico, acianótico, sem sinais meníngeos, regular perfusão

periférica. Fácies encaracterístico, crânio de conformação dolicocefálica, fronte ampla e proeminente, cabelos lisos castanhos claros, ressecado; olhos amendoados e simétricos, epicanto bilateral; fendas palpebrais simétricas=2,3 cm ($25 < p < 50$); DICI=2,5 cm ($25 < p < 50$); DICE=8,0 cm ($75 < p < 97$); nariz bem formado, filtro nasal bem delineado; ponte nasal rebaixada, narinas antevertidas; orelhas simétricas, orelha D=E=5,0 cm ($\sim p 50$); presença de mucosite; palato íntegro, sem fissuras; dentes em regular aspecto geral; tórax simétrico; diminuição do tecido subcutâneo acentuado com costelas salientes e afiladas; distância intermamilar=12,0 cm ($p 75$); ausculta cardíco-pulmonar: BRNF, sem sopros; MV presentes bilateralmente, sem ruídos adventícios, broncofonia diminuída em bases; abdome extremamente globoso, volumoso, doloroso à palpação, hipertimpânico; PA=52,2 cm genitália externa masculina, pênis 3cm (em repouso) ($25 < p < 50$), testículos palpáveis bilateralmente, indolores. Membros muito emagrecidos, MMSS e MMII aparentemente simétricos; polissindactilia pré-axial completa a D; comprimento total da mão D=10,0 cm ($25 < p < 50$), dedo médio D=4,0 cm ($p 25$); pé D=E=11,0 cm ($p 3$); descamação fina da palma das mãos, e das regiões plantares dos pés; ausência de equimoses, ou petéquias; unhas sem alterações.

História familiar de câncer: bisavô paterno era tabagista e faleceu aos 60 anos com câncer na região cervical; três primos da avó paterna apresentaram câncer (de mama aos 66 anos, estômago aos 60 anos e renal aos 60 anos). A tia avó materna foi diagnosticada com linfoma aos 48 anos. A mãe do paciente foi diagnosticada com neuroblastoma aos 31 anos.

Sumário dos principais achados clínicos:

- Neuroblastoma abdominal; mielograma sem infiltração neoplásica
- Catecolaminas séricas elevadas
- Hipertensão arterial sistêmica em investigação
- Antecedente de anoxia neonatal grave (APGAR 1-5; submetido a protocolo de hipotermia)
- Microcefalia pós natal, dolicocefalia
- Baixo peso acentuado (consumptivo pela doença de base e QT)
- Polissindactilia pré-axial completa a D
- Dismorfismos craniofaciais menores (epicanto)
- Vários familiares com histórico de câncer
- Uso materno de antidepressivos durante toda a gestação

TP16

- Astrocitoma Pilocítico grau I
- Tumor de SNC (imagens sugerem origem glial como hipótese diagnóstica)
- Clinidactilia do 4° dedo bilateralmente com leve camptodactilia
- Disfagia de origem central
- Dolicocefalia acentuada, dismorfismos craniofaciais menores
- Anomalias esqueléticas menores; hiperextensibilidade articular generalizada, principalmente dos punhos e mãos
- Vômitos frequentes e diários desde 2 meses
- Tio paterno do pai do paciente faleceu com câncer com idade >30 anos

TP17**Exame clínico-genético aos 02 anos de idade:**

Peso=9,5 Kg ($-2 < Z < -3$), Estatura=85,0 cm ($0 < Z < -2$); PC=48,0 cm ($2 < p < 50$). OBS: o PC deve ser inferior a medida aferida que incluiu a tumoração no couro cabeludo. Regular estado geral, consciente, contatando bem, afebril, eupnéico, hipocorado ++/4, hidratado, anictérico, acianótico, sem sinais meníngeos, boa perfusão periférica. Fácies peculiar, crânio de conformação dolicocefálica: fronte bastante ampla e proeminente, tumoração em região occipital, de ~4 cm, e na região parietal E (~1,5 cm), ambas de consistência amolecida; tumoração em região mandibular à D, endurecida e dolorosa (~4 cm); cabelos lisos castanho escuros, sobrancelhas espessas e bem delineadas; epicanto bilateral; fendas palpebrais de inclinação para cima; cílios longos e evertidos; fenda palpebral D=E=2,6 cm ($75 < p < 90$); DICI=2,9 cm ($75 < p < 97$); DICE=8,0 cm ($75 < p < 97$); ponte nasal rebaixada, nariz bem formado, narinas antevértidas, filtro nasal bem delineado, longo e concavo; orelhas assimétricas orelha D normoimplantada D=5,8 cm (p97), orelha E de baixa implantação=5,5 cm ($75 < p < 97$); lábio superior fino; orofaringe e palato íntegro; dentes irregulares; tórax simétrico e em sino; PT=46 cm; *pectus excavatum* discreto, costelas salientes, distância intermamilar=9,5 cm (~p3); ausculta cardíaco-pulmonar: BRNF, sopro sistólico +/4 em todos os focos; MV presentes bilateralmente, sem ruídos adventícios; abdome globoso, indolor à palpação; hérnia umbilical anel 1,5 cm; fígado palpável a 1,5 cm RCD, consistência fibroelástica; genitália externa masculina, testículos tópicos

bilateralmente, sobre de pele das regiões testiculares; pênis em repouso 2,5 cm ($p < 10$); ânus bem posicionado; coluna sem deformidades; fosseta sacral em fundo cego sem secreção de 1,5 cm de comprimento; MMSS e MMII aparentemente simétricos; subcutâneo diminuído e musculatura hipotrofiada; sem contraturas articulares ou artrites; comprimento da palma da mão E=5,6 cm ($3 < p < 25$), dedo médio D=E=3,2 cm ($p < 3$), mão D não foi mensurado devido presença de cateter e curativo extenso até punho; pés D=E=13,0 cm ($3 < p < 25$); calcâneo proeminente bilateralmente; sulco profundo entre os hálux e 2º artelhos bilateralmente; presença de linha hiperpigmentada desde a região umbilical até pelve; ausência de máculas *café-au-lait* ou hipopigmentadas, ausência de equimoses, ou petéquias; unhas sem alterações; ausência de gânglios supra-claviculares, axilares; gânglios inguinais múltiplos em tamanho de grão de arroz, fibroelásticos e indolores à palpação.

História familiar de câncer: Primo paterno faleceu aos 12 anos devido a leucemia e o avô materno faleceu de câncer na boca (SIC).

Sumário dos principais achados clínicos:

- Nódulos em região de cabeça e pescoço: Nódulo sólido e heterogêneo, de aspecto insuflativo, localizado na região occipital direita, de provável origem óssea, apresentando vascularização central exuberante e na mandíbula - Anátomo-patológico: *HISTIOCILOSE DE CÉLULAS DE LANGERHANS*.
- Malformações de SNC - disgenesia parcial do corpo caloso caracterizada por ausência de rostro e esplênio, associado a discreta hipertrofia de comissura anterior e discreto dismorfismo dos cornos frontais dos ventrículos laterais (na RNM de crânio).
- Atraso global de DNPM e atraso de desenvolvimento de linguagem
- Alteração auditiva a esclarecer
- Fácies peculiar
- Cardiopatia congênita-FOP, veia cava superior E persistente, valva P espessada sem gradiente, hipertrofia concêntrica moderada do VE (no Ecocardiograma com doppler)
- Cisto de úraco (na US abdome)
- Micropênis
- Fosseta sacral em fundo cego
- Familiares de 2º e 3º grau pelo lado paterno com câncer

TP18

Exame clínico-genético aos 01 anos e 10 meses de idade:

Peso= 9,75 kg (p15), Estatura=83,0 cm (15<p<50); PC= 45,5 cm (p15). Regular estado geral, consciente, afebril, eupnéica, hipocorada +/4, hidratada, anictérica, acianótica, sem sinais meníngeos, boa perfusão periférica. Paciente extremamente chorosa e irritada ao exame. Fácies peculiar, dolicocefalia, fronte ampla e proeminente, sobrancelhas bem delineadas, pouco espessas; fendas palpebrais assimétricas (E>D), de inclinação para cima; epicanto bilateral, olho D com leucocoria a D, olho E com opacidade corneana acentuada, buftalmia, exoftalmia, presença de massa tumoral esbranquiçada, hiperemia conjuntival acentuada, com secreção ocular, cílios longos fenda palpebral D=3,0 cm; E=3,3 cm (ambas p>95); DICI=2,3 cm (p<3); DICE=8,0 cm (75<p<97); ponte nasal rebaixada, nariz bem formado e bulboso, narinas antevertidas, filtro nasal bem delineado; orelhas simétricas orelha D=E=4,5 cm (3<p<25); lábio superior fino; tórax simétrico; pectus excavatum discreto, costelas salientes, PT=47,5 cm (25<p<50), distância intermamilar=12,5 cm (75<p<97); ausculta cardíaco-pulmonar: BRNF, sem sopros; MV presentes bilateralmente, sem ruídos adventícios; abdome levemente globoso, flácido, indolor à palpação, RHA presentes, fígado a 2 cm RCD; genitália externa feminina; ânus bem posicionado; coluna sem deformidades; MMSS e MMII aparentemente simétricos; sem contraturas articulares ou artrites; sinal do polegar e punho presentes; comprimento da palma da mão D=6,0 cm (25<p<50), dedo médio D= 3,7 cm (3<p<25); pés D=E=14,0 cm (~p75). Gânglios supra-claviculares, axilares não palpáveis; gânglios inguinais bilaterais de tamanho de grãos de arroz, sem sinais flogísticos. Pele: lesões hipocrômicas e hiperocrômicas de bordas irregulares e aspecto rendilhado no tronco, no abdome, regiões axilares; presença de lesão hiperocrômica linear na região proximal da face dorsal da coxa E, com interrupção na região média, e contínua em face ântero-lateral da perna E até tornozelo e região medial do calcanhar; ausência de máculas café-au-lait, ausência de equimoses, ou petéquias; unhas sem alterações.

Sumário dos principais achados clínicos:

- Retinoblastoma bilateral
- Atraso de DNPM, atraso de desenvolvimento de linguagem.
- Lesões hiperpigmentadas e hipopigmentadas em tronco, abdome e membros que seguem as linhas de Blaschko

HB87**Exame clínico-genético aos 02 anos de idade:**

Peso= 9,800 kg (-3<Z<-2); Comprimento=77,0 cm (-3<Z<-2); PC=não mensurado devido EOT e fixações. Mau estado geral, inconsciente, sem contacto, sob EOT e VM, hipocorado ++/4, hidratado, icterico++, acianótico, regular perfusão periférica, anasarca acentuada. Fácies peculiar, turricefalia acentuada; fronte ampla e proeminente e alta, sobrancelhas bem delineadas; fendas palpebrais de inclinação levemente para baixo; DICI=2,8 cm (75<p<97); DICE=9,5 cm (p>97); ponte nasal baixa, nariz pequeno/hipoplásico, narinas antevertidas, SNG em narina D, filtro nasal bem delineado, côncavo e alongado; orelhas simétricas de baixa implantação, orelha D=E=4,7 cm (p25); lábio superior fino; tórax simétrico; cicatriz cirúrgica extensa em região medial do esterno; pescoço aparentemente encurtado; distância intermamilar=11,0 cm (25<0<50); ausculta cardíaco-pulmonar: BRNF, sopro pancardíaco; MV presentes bilateralmente, com ruídos adventícios; abdome bastante globoso com massa palpável descrita no EF do Resumo Clínico; hérnia umbilical; genitália externa masculina, testículos palpáveis na bolsa escrotal, pênis com sonda uretral 2,5 cm (<<p2,5); ânus bem posicionado; coluna sem deformidades; MMSS e MMII aparentemente simétricos; sem contraturas articulares ou artrites; comprimento da palma da mão D=5,3 cm (p<3); palma E=5,0 cm (p<3); dedo médio D= E=3,5 cm (p<<3); pés em aspecto de cadeira de balanço com calcâneos proeminentes, pés planos, pés D=E=10,5 cm (p<<3); gânglios supra-claviculares e axilares não palpáveis; ausência de máculas café-au-lait ou hipopigmentadas, presença de equimoses e petéquias nos locais de venopunção prévias em MMSS, regiões inguinais e calcanhares; unhas sem alterações.

Sumário dos principais achados clínicos:

- RNPT-AIG (2º gemelar fraterno-diamniótico e dicoriônico)
- Cardiopatia congênita complexa: drenagem anômala total de veias pulmonares subdiafragmática/infra-cardíaca; CIA restritiva; PCA
- Atraso de DNPM (devido a hospitalização prolongada)
- Hepatoblastoma
- Irmão gemelar (diamniótica e dicoriônica) falecido com uma semana de vida após correção cirúrgica da mesma cardiopatia congênita do paciente

ANEXO C. Supplemental Table S2b.

Supplemental Table S2b. CGIs located in the DMRs above and their respective individual information.

| DMR index | CGI ID | chromosome | genome location (hg19) | gene | DMP location (in relation to gene) | DMP location (in relation to CpG) | t-value | pvalue (Adjusted) | P group is hypermethylated or hypomethylated |
|-----------|------------|------------|------------------------|----------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------|-------------------|--|
| DMR_1 | cg04201727 | 9 | 124991209 | LHX6 | TSS1500 | shore | 3,549852122 | 0,245873297 | Hypermethylated |
| DMR_1 | cg00774728 | 9 | 124990632 | LHX6 | TSS1500 | island | 2,803342228 | 0,325440009 | Hypermethylated |
| DMR_1 | cg11328695 | 9 | 124991348 | LHX6 | TSS1500 | shore | 2,492948847 | 0,370156814 | Hypermethylated |
| DMR_1 | cg06347782 | 9 | 124991182 | LHX6 | TSS1500 | shore | 3,72569975 | 0,233810841 | Hypermethylated |
| DMR_1 | cg22254104 | 9 | 124991432 | LHX6 | TSS1500 | shore | 2,931384185 | 0,308529528 | Hypermethylated |
| DMR_1 | cg02539128 | 9 | 124991435 | LHX6 | TSS1500 | shore | 3,208517207 | 0,276260234 | Hypermethylated |
| DMR_1 | cg00485681 | 9 | 124990761 | LHX6 | TSS1500 | island | 3,566803807 | 0,245208641 | Hypermethylated |
| DMR_1 | cg21237939 | 9 | 124991047 | LHX6 | TSS200 | island | 3,723464889 | 0,233810841 | Hypermethylated |
| DMR_1 | cg17434149 | 9 | 124990763 | LHX6 | TSS1500 | island | 3,324818694 | 0,265243344 | Hypermethylated |
| DMR_1 | cg03838327 | 9 | 124991656 | LHX6 | TSS1500 | shore | 1,136905346 | 0,696264581 | Hypermethylated |
| DMR_2 | cg19033026 | 2 | 30670022 | LCLAT1 | TSS200 | island | 2,526780811 | 0,364678748 | Hypermethylated |
| DMR_2 | cg15652532 | 2 | 30669759 | LCLAT1 | TSS1500 | shore | 2,703753497 | 0,337730039 | Hypermethylated |
| DMR_2 | cg10326673 | 2 | 30669757 | LCLAT1 | TSS1500 | shore | 3,144723883 | 0,283357824 | Hypermethylated |
| DMR_2 | cg12454169 | 2 | 30669597 | LCLAT1 | TSS1500 | shore | 2,832170244 | 0,321515335 | Hypermethylated |
| DMR_2 | cg17749961 | 2 | 30669863 | LCLAT1 | TSS1500 | shore | 2,976779514 | 0,301487676 | Hypermethylated |
| DMR_2 | cg10995359 | 2 | 30670170 | LCLAT1 | 1stExon | island | 0,951825032 | 0,752843697 | Hypermethylated |
| DMR_2 | cg03795903 | 2 | 30669940 | LCLAT1 | TSS200 | shore | 2,790847294 | 0,327220009 | Hypermethylated |
| DMR_2 | cg07150166 | 2 | 30669952 | LCLAT1 | TSS200 | shore | 2,877713142 | 0,31559275 | Hypermethylated |
| DMR_2 | cg04618327 | 2 | 30669385 | LCLAT1 | TSS1500 | shore | 3,117537375 | 0,286395848 | Hypermethylated |
| DMR_3 | cg02662362 | 6 | 33084814 | HLA-DPB2 | Body | island | 2,303992904 | 0,403766371 | Hypermethylated |
| DMR_3 | cg24465429 | 6 | 33084825 | HLA-DPB2 | Body | island | 2,055375323 | 0,451393298 | Hypermethylated |
| DMR_3 | cg13524302 | 6 | 33084798 | HLA-DPB2 | Body | island | 2,087490492 | 0,444646159 | Hypermethylated |
| DMR_3 | cg23075555 | 6 | 33084789 | HLA-DPB2 | Body | island | 1,526879428 | 0,582289091 | Hypermethylated |
| DMR_3 | cg16580391 | 6 | 33084479 | HLA-DPB2 | Body | shore | 2,160310244 | 0,430359521 | Hypermethylated |
| DMR_3 | cg06210070 | 6 | 33085063 | HLA-DPB2 | Body | shore | 3,091149365 | 0,288657837 | Hypermethylated |
| DMR_3 | cg17833071 | 6 | 33084770 | HLA-DPB2 | Body | island | 1,860488312 | 0,495405514 | Hypermethylated |

Supplemental Table S2b. (continued).

| | | | | | | | | | |
|-------|-------------------|---|----------|-----------------|---------|--------|--------------|-------------|-----------------|
| DMR_3 | cg07460294 | 6 | 33084985 | <i>HLA-DPB2</i> | Body | island | 3,191733684 | 0,277745336 | Hypermethylated |
| DMR_3 | cg23640002 | 6 | 33084933 | <i>HLA-DPB2</i> | Body | island | 3,0776181 | 0,29067101 | Hypermethylated |
| DMR_3 | cg24266485 | 6 | 33084840 | <i>HLA-DPB2</i> | Body | island | 2,292528498 | 0,405729455 | Hypermethylated |
| DMR_3 | cg05337177 | 6 | 33084928 | <i>HLA-DPB2</i> | Body | island | 2,358955326 | 0,39345748 | Hypermethylated |
| DMR_3 | cg08693832 | 6 | 33084554 | <i>HLA-DPB2</i> | Body | shore | 1,540221887 | 0,578564379 | Hypermethylated |
| DMR_3 | cg27264993 | 6 | 33084608 | <i>HLA-DPB2</i> | Body | shore | 2,033519719 | 0,456422477 | Hypermethylated |
| DMR_3 | cg21870640 | 6 | 33084624 | <i>HLA-DPB2</i> | Body | shore | 1,610380556 | 0,559064505 | Hypermethylated |
| DMR_4 | cg18761994 | 6 | 24911326 | <i>FAM65B</i> | TSS200 | shore | 2,269858501 | 0,409953735 | Hypermethylated |
| DMR_4 | cg17896599 | 6 | 24911555 | <i>FAM65B</i> | TSS200 | shore | 1,156271952 | 0,690240501 | Hypermethylated |
| DMR_4 | cg23903465 | 6 | 24911334 | <i>FAM65B</i> | TSS200 | shore | 1,96344618 | 0,471988797 | Hypermethylated |
| DMR_4 | cg26922444 | 6 | 24911204 | <i>FAM65B</i> | TSS200 | island | 1,219439403 | 0,671633478 | Hypermethylated |
| DMR_4 | cg11083276 | 6 | 24911313 | <i>FAM65B</i> | TSS200 | shore | 1,305179666 | 0,645892885 | Hypermethylated |
| DMR_4 | cg08576643 | 6 | 24911545 | <i>FAM65B</i> | TSS1500 | shore | 2,845211591 | 0,319931583 | Hypermethylated |
| DMR_4 | cg02915015 | 6 | 24911329 | <i>FAM65B</i> | TSS200 | shore | 1,907735174 | 0,484124707 | Hypermethylated |
| DMR_4 | cg01726103 | 6 | 24911615 | <i>FAM65B</i> | TSS1500 | shore | 2,00430042 | 0,462392881 | Hypermethylated |
| DMR_4 | cg18610423 | 6 | 24911193 | <i>FAM65B</i> | 1stExon | island | 0,638766966 | 0,844733235 | Hypermethylated |
| DMR_4 | cg06636971 | 6 | 24911553 | <i>FAM65B</i> | TSS1500 | shore | 2,787565593 | 0,327744758 | Hypermethylated |
| DMR_4 | cg13491413 | 6 | 24911111 | <i>FAM65B</i> | 1stExon | island | 2,018567132 | 0,45964693 | Hypermethylated |
| DMR_4 | cg06953309 | 6 | 24911056 | <i>FAM65B</i> | 1stExon | island | 2,659614235 | 0,343587684 | Hypermethylated |
| DMR_4 | cg08818610 | 6 | 24910720 | <i>FAM65B</i> | 5'UTR | island | 0,700577902 | 0,826841331 | Hypermethylated |
| DMR_4 | cg19936032 | 6 | 24911414 | <i>FAM65B</i> | TSS1500 | shore | 3,244428622 | 0,273283872 | Hypermethylated |
| DMR_4 | cg15289427 | 6 | 24911001 | <i>FAM65B</i> | 5'UTR | island | 1,438342677 | 0,6064198 | Hypermethylated |
| DMR_5 | cg04329454 | 6 | 33561099 | <i>C6orf227</i> | Body | island | -3,3275485 | 0,265076299 | Hypomethylated |
| DMR_5 | cg19735538 | 6 | 33560953 | <i>C6orf227</i> | Body | island | -2,177163139 | 0,426938715 | Hypomethylated |
| DMR_5 | cg01392313 | 6 | 33561181 | <i>C6orf227</i> | TSS200 | island | -3,542983758 | 0,246037746 | Hypomethylated |
| DMR_5 | cg05602975 | 6 | 33561264 | <i>C6orf227</i> | TSS200 | shore | -3,871097469 | 0,224087452 | Hypomethylated |
| DMR_5 | cg06289138 | 6 | 33561186 | <i>C6orf227</i> | TSS200 | island | -3,029300787 | 0,29595527 | Hypomethylated |
| DMR_5 | cg07873320 | 6 | 33561253 | <i>C6orf227</i> | TSS200 | shore | -3,784783836 | 0,228896503 | Hypomethylated |
| DMR_5 | cg08301503 | 6 | 33561188 | <i>C6orf227</i> | TSS200 | island | -4,36580831 | 0,217129314 | Hypomethylated |
| DMR_6 | cg14359292 | 7 | 27170892 | <i>HOXA4</i> | TSS1500 | shore | 1,876824859 | 0,491206036 | Hypermethylated |

Supplemental Table S2b. (continued).

| | | | | | | | | | |
|-------|-------------------|---|-----------|--------------|---------|--------|-------------|-------------|-----------------|
| DMR_6 | cg11015251 | 7 | 27170554 | <i>HOXA4</i> | TSS200 | island | 1,842496525 | 0,500074206 | Hypermethylated |
| DMR_6 | cg16651126 | 7 | 27170552 | <i>HOXA4</i> | TSS200 | island | 1,95639456 | 0,473509162 | Hypermethylated |
| DMR_6 | cg19142026 | 7 | 27170394 | <i>HOXA4</i> | 5'UTR | island | 2,571650102 | 0,356917177 | Hypermethylated |
| DMR_6 | cg24169822 | 7 | 27170994 | <i>HOXA4</i> | TSS1500 | shore | 2,496156078 | 0,369611063 | Hypermethylated |
| DMR_6 | cg17457637 | 7 | 27170717 | <i>HOXA4</i> | TSS1500 | shore | 2,65713134 | 0,343899288 | Hypermethylated |
| DMR_6 | cg25952581 | 7 | 27170961 | <i>HOXA4</i> | TSS1500 | shore | 2,175337833 | 0,427252549 | Hypermethylated |
| DMR_6 | cg04317399 | 7 | 27170313 | <i>HOXA4</i> | 1stExon | island | 2,395618961 | 0,386623506 | Hypermethylated |
| DMR_6 | cg03724423 | 7 | 27170755 | <i>HOXA4</i> | TSS1500 | shore | 2,49660424 | 0,369498999 | Hypermethylated |
| DMR_6 | cg22997113 | 7 | 27170241 | <i>HOXA4</i> | 1stExon | island | 2,133312635 | 0,435791824 | Hypermethylated |
| DMR_6 | cg08657492 | 7 | 27170832 | <i>HOXA4</i> | TSS1500 | shore | 1,66641649 | 0,544748491 | Hypermethylated |
| DMR_6 | cg07317062 | 7 | 27170388 | <i>HOXA4</i> | 5'UTR | island | 2,318223174 | 0,401152545 | Hypermethylated |
| DMR_6 | cg11410718 | 7 | 27170412 | <i>HOXA4</i> | TSS200 | island | 2,380769117 | 0,389177587 | Hypermethylated |
| DMR_7 | cg00254681 | 6 | 32118457 | <i>PRRT1</i> | Body | island | 2,5266981 | 0,364688717 | Hypermethylated |
| DMR_7 | cg22268510 | 6 | 32118420 | <i>PRRT1</i> | Body | island | 2,677612857 | 0,341368913 | Hypermethylated |
| DMR_7 | cg21398794 | 6 | 32118432 | <i>PRRT1</i> | Body | island | 2,722682381 | 0,334987968 | Hypermethylated |
| DMR_7 | cg05714552 | 6 | 32118295 | <i>PRRT1</i> | Body | island | 2,452379343 | 0,376903611 | Hypermethylated |
| DMR_7 | cg19227031 | 6 | 32118315 | <i>PRRT1</i> | Body | island | 2,483067954 | 0,371973836 | Hypermethylated |
| DMR_7 | cg13705391 | 6 | 32118441 | <i>PRRT1</i> | Body | island | 2,524738155 | 0,364998855 | Hypermethylated |
| DMR_7 | cg08123207 | 6 | 32118312 | <i>PRRT1</i> | Body | island | 2,427561844 | 0,380879712 | Hypermethylated |
| DMR_7 | cg22849665 | 6 | 32118375 | <i>PRRT1</i> | Body | island | 2,691293794 | 0,339143268 | Hypermethylated |
| DMR_7 | cg05764839 | 6 | 32118298 | <i>PRRT1</i> | Body | island | 2,082552744 | 0,445602941 | Hypermethylated |
| DMR_7 | cg25845985 | 6 | 32118405 | <i>PRRT1</i> | Body | island | 2,526882714 | 0,364675988 | Hypermethylated |
| DMR_7 | cg12320039 | 6 | 32118204 | <i>PRRT1</i> | Body | island | 2,943779565 | 0,306887673 | Hypermethylated |
| DMR_7 | cg11617964 | 6 | 32118399 | <i>PRRT1</i> | Body | island | 2,390273432 | 0,38761211 | Hypermethylated |
| DMR_7 | cg15194163 | 6 | 32118213 | <i>PRRT1</i> | Body | island | 3,400163189 | 0,259384095 | Hypermethylated |
| DMR_8 | cg11479503 | 9 | 124989052 | <i>LHX6</i> | Body | island | 0,497184727 | 0,88516085 | Hypermethylated |
| DMR_8 | cg13571460 | 9 | 124989337 | <i>LHX6</i> | Body | island | 0,776125803 | 0,804779559 | Hypermethylated |
| DMR_8 | cg04622888 | 9 | 124990010 | <i>LHX6</i> | TSS200 | island | 0,967558364 | 0,748012206 | Hypermethylated |
| DMR_8 | cg03363289 | 9 | 124990165 | <i>LHX6</i> | Body | island | 1,398938805 | 0,617961787 | Hypermethylated |
| DMR_8 | cg21469772 | 9 | 124989294 | <i>LHX6</i> | Body | island | 0,674115833 | 0,834545103 | Hypermethylated |

Supplemental Table S2b. (continued).

| | | | | | | | | | |
|--------|-------------------|---|-----------|---------------|---------|--------|--------------|-------------|-----------------|
| DMR_8 | cg00142257 | 9 | 124990276 | <i>LHX6</i> | Body | island | 1,27930724 | 0,653618511 | Hypermethylated |
| DMR_8 | cg05037505 | 9 | 124989550 | <i>LHX6</i> | Body | island | 1,410756507 | 0,614569169 | Hypermethylated |
| DMR_8 | cg21213617 | 9 | 124989241 | <i>LHX6</i> | Body | island | 0,695306216 | 0,828339685 | Hypermethylated |
| DMR_8 | cg15124400 | 9 | 124989839 | <i>LHX6</i> | 1stExon | island | 0,776643254 | 0,80463153 | Hypermethylated |
| DMR_8 | cg05136264 | 9 | 124989408 | <i>LHX6</i> | Body | island | 0,847312157 | 0,78388838 | Hypermethylated |
| DMR_8 | cg13862711 | 9 | 124989915 | <i>LHX6</i> | Body | island | 0,681940634 | 0,832324721 | Hypermethylated |
| DMR_9 | cg11608150 | 5 | 135415948 | | IGR | shore | -0,673883709 | 0,834609215 | Hypomethylated |
| DMR_9 | cg06536614 | 5 | 135416381 | <i>MIR886</i> | TSS200 | island | -0,586886189 | 0,859536292 | Hypomethylated |
| DMR_9 | cg26896946 | 5 | 135416405 | <i>MIR886</i> | TSS200 | island | -0,602851925 | 0,85496757 | Hypomethylated |
| DMR_9 | cg25340688 | 5 | 135416398 | <i>MIR886</i> | TSS200 | island | -0,601221257 | 0,855470215 | Hypomethylated |
| DMR_9 | cg08745965 | 5 | 135416529 | <i>MIR886</i> | TSS1500 | shore | -0,355928402 | 0,922394212 | Hypomethylated |
| DMR_9 | cg06478886 | 5 | 135416029 | | IGR | shore | -0,734960172 | 0,816473776 | Hypomethylated |
| DMR_9 | cg04515200 | 5 | 135415762 | | IGR | shore | -0,607515919 | 0,85362318 | Hypomethylated |
| DMR_9 | cg18797653 | 5 | 135416613 | <i>MIR886</i> | TSS1500 | shore | -0,701698517 | 0,826515845 | Hypomethylated |
| DMR_9 | cg13581155 | 5 | 135415781 | | IGR | shore | -0,277749673 | 0,941278643 | Hypomethylated |
| DMR_9 | cg04481923 | 5 | 135416205 | <i>MIR886</i> | Body | island | -0,513436688 | 0,880512356 | Hypomethylated |
| DMR_9 | cg18678645 | 5 | 135416331 | <i>MIR886</i> | TSS200 | island | -0,455515376 | 0,896153531 | Hypomethylated |
| DMR_9 | cg07158503 | 5 | 135415693 | | IGR | shore | -0,673753374 | 0,834656311 | Hypomethylated |
| DMR_10 | cg04221606 | 6 | 151646552 | <i>AKAP12</i> | TSS200 | shore | -2,072936235 | 0,447731413 | Hypomethylated |
| DMR_10 | cg15892964 | 6 | 151646540 | <i>AKAP12</i> | TSS200 | shore | -2,785182508 | 0,327933003 | Hypomethylated |
| DMR_10 | cg16198990 | 6 | 151647133 | <i>AKAP12</i> | Body | shore | -1,739775989 | 0,525182028 | Hypomethylated |
| DMR_10 | cg06019170 | 6 | 151646957 | <i>AKAP12</i> | 5'UTR | island | -1,533565409 | 0,580304034 | Hypomethylated |
| DMR_10 | cg18245460 | 6 | 151646651 | <i>AKAP12</i> | TSS200 | shore | -1,585685745 | 0,565939848 | Hypomethylated |
| DMR_10 | cg03446012 | 6 | 151646601 | <i>AKAP12</i> | TSS200 | shore | -1,925170184 | 0,480012208 | Hypomethylated |
| DMR_10 | cg25855249 | 6 | 151646817 | <i>AKAP12</i> | 5'UTR | island | -2,225134386 | 0,417986134 | Hypomethylated |
| DMR_11 | cg25551243 | 5 | 157079440 | <i>SOX30</i> | TSS200 | island | -1,608610555 | 0,5594898 | Hypomethylated |
| DMR_11 | cg07464716 | 5 | 157079520 | <i>SOX30</i> | TSS200 | island | -1,695744501 | 0,536783371 | Hypomethylated |
| DMR_11 | cg02918872 | 5 | 157079463 | <i>SOX30</i> | TSS200 | island | -1,652488748 | 0,548415488 | Hypomethylated |
| DMR_11 | cg05349515 | 5 | 157079506 | <i>SOX30</i> | TSS200 | island | -2,510357357 | 0,367212822 | Hypomethylated |
| DMR_11 | cg24986915 | 5 | 157079825 | <i>SOX30</i> | TSS1500 | shore | -0,959060627 | 0,75062884 | Hypomethylated |

Supplemental Table S2b. (continued).

| | | | | | | | | | |
|--------|-------------------|----|-----------|---------------|---------|---------|--------------|-------------|-----------------|
| DMR_11 | cg06200339 | 5 | 157079404 | <i>SOX30</i> | 1stExon | island | -0,544042855 | 0,871912538 | Hypomethylated |
| DMR_11 | cg06995810 | 5 | 157079468 | <i>SOX30</i> | TSS200 | island | -2,300563261 | 0,404278558 | Hypomethylated |
| DMR_11 | cg08995325 | 5 | 157079668 | <i>SOX30</i> | TSS1500 | shore | -2,661262115 | 0,34344943 | Hypomethylated |
| DMR_12 | cg09179646 | 6 | 31148383 | | IGR | island | -1,969724503 | 0,470255036 | Hypomethylated |
| DMR_12 | cg17931227 | 6 | 31148370 | | IGR | island | -1,656850568 | 0,54731273 | Hypomethylated |
| DMR_12 | cg03078486 | 6 | 31148474 | | IGR | island | -2,227857432 | 0,41744487 | Hypomethylated |
| DMR_12 | cg24427850 | 6 | 31148409 | | IGR | island | -2,065667042 | 0,449265432 | Hypomethylated |
| DMR_12 | cg26668675 | 6 | 31148463 | | IGR | island | -2,626903044 | 0,347942554 | Hypomethylated |
| DMR_12 | cg22291762 | 6 | 31148404 | | IGR | island | -2,433535886 | 0,380079541 | Hypomethylated |
| DMR_12 | cg11811828 | 6 | 31148666 | | IGR | shore | -1,973814223 | 0,469183387 | Hypomethylated |
| DMR_12 | cg14036627 | 6 | 31148657 | | IGR | shore | -1,580626721 | 0,567257347 | Hypomethylated |
| DMR_12 | cg26818629 | 6 | 31148516 | | IGR | island | -2,113418264 | 0,439504017 | Hypomethylated |
| DMR_12 | cg27547543 | 6 | 31148524 | | IGR | island | -1,548203268 | 0,576396066 | Hypomethylated |
| DMR_12 | cg11805138 | 6 | 31148332 | | IGR | shore | -2,054364808 | 0,451653792 | Hypomethylated |
| DMR_12 | cg09357589 | 6 | 31148552 | | IGR | island | -1,713985993 | 0,531931861 | Hypomethylated |
| DMR_13 | cg02676175 | 17 | 7253720 | <i>KCTD11</i> | TSS1500 | island | 4,003162994 | 0,220465149 | Hypermethylated |
| DMR_13 | cg02448825 | 17 | 7253585 | <i>ACAP1</i> | Body | island | 4,242491042 | 0,218039255 | Hypermethylated |
| DMR_13 | cg20217592 | 17 | 7253521 | <i>ACAP1</i> | Body | island | 3,826946471 | 0,225933405 | Hypermethylated |
| DMR_13 | cg25900902 | 17 | 7253340 | <i>ACAP1</i> | Body | island | 2,391783178 | 0,387280544 | Hypermethylated |
| DMR_13 | cg15713546 | 17 | 7253539 | <i>ACAP1</i> | ExonBnd | island | 4,221339179 | 0,218706658 | Hypermethylated |
| DMR_13 | cg07925670 | 17 | 7253489 | <i>ACAP1</i> | Body | island | 4,15177524 | 0,219584346 | Hypermethylated |
| DMR_13 | cg06721232 | 17 | 7253308 | <i>ACAP1</i> | Body | island | 4,005331077 | 0,220465149 | Hypermethylated |
| DMR_14 | cg06105925 | 5 | 102898545 | <i>NUDT12</i> | TSS200 | opensea | 1,436608962 | 0,60688485 | Hypermethylated |
| DMR_14 | cg07655627 | 5 | 102898729 | <i>NUDT12</i> | TSS1500 | opensea | 1,754322269 | 0,521720858 | Hypermethylated |
| DMR_14 | cg03073264 | 5 | 102898493 | <i>NUDT12</i> | 5'UTR | opensea | 1,852786633 | 0,497302753 | Hypermethylated |
| DMR_14 | cg15206834 | 5 | 102898733 | <i>NUDT12</i> | TSS1500 | opensea | 1,323168155 | 0,640198296 | Hypermethylated |
| DMR_14 | cg13665998 | 5 | 102898478 | <i>NUDT12</i> | 5'UTR | opensea | 1,625454828 | 0,555575664 | Hypermethylated |
| DMR_14 | cg09166085 | 5 | 102898648 | <i>NUDT12</i> | TSS200 | opensea | 1,472872807 | 0,597184306 | Hypermethylated |
| DMR_14 | cg20279471 | 5 | 102898585 | <i>NUDT12</i> | TSS200 | opensea | 0,915577345 | 0,763734727 | Hypermethylated |
| DMR_14 | cg02976617 | 5 | 102898463 | <i>NUDT12</i> | 5'UTR | opensea | 1,582256427 | 0,566964107 | Hypermethylated |

Supplemental Table S2b. (continued).

| | | | | | | | | | |
|--------|-------------------|----|-----------|-------------------|---------|---------|--------------|-------------|-----------------|
| DMR_15 | cg27264388 | 18 | 77623570 | <i>KCNG2</i> | TSS200 | island | -2,707389698 | 0,337509477 | Hypomethylated |
| DMR_15 | cg25308662 | 18 | 77623483 | <i>KCNG2</i> | TSS200 | island | -2,126418161 | 0,43702389 | Hypomethylated |
| DMR_15 | cg18936757 | 18 | 77623282 | <i>KCNG2</i> | TSS1500 | island | -1,940989588 | 0,476831106 | Hypomethylated |
| DMR_15 | cg03682112 | 18 | 77623598 | <i>KCNG2</i> | TSS200 | island | -1,810938674 | 0,507672045 | Hypomethylated |
| DMR_15 | cg05212510 | 18 | 77623544 | <i>KCNG2</i> | TSS200 | island | -2,384592468 | 0,388727146 | Hypomethylated |
| DMR_15 | cg21467717 | 18 | 77623409 | <i>KCNG2</i> | TSS1500 | island | -1,52436798 | 0,582963483 | Hypomethylated |
| DMR_15 | cg23825213 | 18 | 77623475 | <i>KCNG2</i> | TSS200 | island | -2,91721929 | 0,310710724 | Hypomethylated |
| DMR_15 | cg12577633 | 18 | 77623199 | <i>KCNG2</i> | TSS1500 | shore | -1,781588873 | 0,515112121 | Hypomethylated |
| DMR_16 | cg09998133 | 7 | 142494595 | | IGR | island | 0,171766862 | 0,965371852 | Hypermethylated |
| DMR_16 | cg16767506 | 7 | 142494244 | | IGR | shore | 2,810111952 | 0,324060817 | Hypermethylated |
| DMR_16 | cg13264840 | 7 | 142494213 | | IGR | shore | 2,752652601 | 0,33189464 | Hypermethylated |
| DMR_16 | cg17230773 | 7 | 142494148 | | IGR | shore | 3,195984446 | 0,277482124 | Hypermethylated |
| DMR_16 | cg21785034 | 7 | 142494439 | | IGR | shore | 3,314564225 | 0,266506428 | Hypermethylated |
| DMR_16 | cg22799656 | 7 | 142494564 | | IGR | island | 1,775901461 | 0,516494018 | Hypermethylated |
| DMR_16 | cg13378656 | 7 | 142494492 | | IGR | shore | 3,334346725 | 0,264326242 | Hypermethylated |
| DMR_16 | cg10576238 | 7 | 142494399 | | IGR | shore | 3,186106912 | 0,278812009 | Hypermethylated |
| DMR_16 | cg02745912 | 7 | 142494204 | | IGR | shore | 3,531835545 | 0,246610166 | Hypermethylated |
| DMR_17 | cg09132607 | 2 | 43903582 | <i>PLEKHH2</i> | Body | opensea | -2,485612383 | 0,371606204 | Hypomethylated |
| DMR_17 | cg02111748 | 2 | 43903650 | <i>PLEKHH2</i> | Body | opensea | -1,701472187 | 0,535209755 | Hypomethylated |
| DMR_17 | cg17110364 | 2 | 43903227 | <i>PLEKHH2</i> | Body | opensea | -4,423716523 | 0,217129314 | Hypomethylated |
| DMR_17 | cg20563666 | 2 | 43903842 | <i>PLEKHH2</i> | Body | opensea | -5,519342004 | 0,209846072 | Hypomethylated |
| DMR_17 | cg09325404 | 2 | 43903470 | <i>PLEKHH2</i> | Body | opensea | -5,502608628 | 0,209846072 | Hypomethylated |
| DMR_17 | cg13324389 | 2 | 43903807 | <i>C1GALT1C1L</i> | TSS1500 | opensea | -6,164586696 | 0,192590805 | Hypomethylated |
| DMR_17 | cg14454477 | 2 | 43903900 | <i>PLEKHH2</i> | Body | opensea | -2,339704189 | 0,39673685 | Hypomethylated |
| DMR_17 | cg08726338 | 2 | 43904011 | <i>PLEKHH2</i> | Body | opensea | -4,531495399 | 0,209890963 | Hypomethylated |
| DMR_17 | cg18817560 | 2 | 43903689 | <i>C1GALT1C1L</i> | TSS1500 | opensea | -4,351175825 | 0,217129314 | Hypomethylated |
| DMR_18 | cg22618164 | 12 | 122356400 | <i>WDR66</i> | TSS200 | island | 0,479791053 | 0,889666531 | Hypermethylated |
| DMR_18 | cg11867697 | 12 | 122356394 | <i>WDR66</i> | TSS200 | island | 0,358396882 | 0,921730234 | Hypermethylated |
| DMR_18 | cg21171335 | 12 | 122356390 | <i>WDR66</i> | TSS200 | island | 0,678228084 | 0,833318805 | Hypermethylated |
| DMR_18 | cg13699009 | 12 | 122356056 | <i>WDR66</i> | TSS1500 | shore | 1,616204957 | 0,55794219 | Hypermethylated |

Supplemental Table S2b. (continued).

| | | | | | | | | | |
|--------|-------------------|----|-----------|-----------------|---------|---------|--------------|-------------|-----------------|
| DMR_18 | cg23821619 | 12 | 122356039 | <i>WDR66</i> | TSS1500 | shore | 1,469950819 | 0,597870564 | Hypermethylated |
| DMR_18 | cg12705353 | 12 | 122356852 | <i>WDR66</i> | 5'UTR | island | -0,907142093 | 0,766354348 | Hypomethylated |
| DMR_18 | cg22168489 | 12 | 122356033 | <i>WDR66</i> | TSS1500 | shore | 0,505926417 | 0,882692089 | Hypermethylated |
| DMR_18 | cg21016266 | 12 | 122356598 | <i>WDR66</i> | 1stExon | island | 0,026432723 | 0,995048254 | Hypermethylated |
| DMR_18 | cg01765077 | 12 | 122356316 | <i>WDR66</i> | TSS200 | island | -0,460460722 | 0,894903714 | Hypomethylated |
| DMR_18 | cg10207240 | 12 | 122356781 | <i>WDR66</i> | 5'UTR | island | -0,092797997 | 0,982181248 | Hypomethylated |
| DMR_19 | cg06916001 | 16 | 14403004 | <i>MIR365-1</i> | TSS200 | opensea | 1,441074823 | 0,605598758 | Hypermethylated |
| DMR_19 | cg00928596 | 16 | 14403022 | <i>MIR365-1</i> | TSS200 | opensea | 1,250135156 | 0,662027664 | Hypermethylated |
| DMR_19 | cg02533339 | 16 | 14403040 | <i>MIR365-1</i> | TSS200 | opensea | 2,089474274 | 0,444276749 | Hypermethylated |
| DMR_19 | cg00160388 | 16 | 14403425 | | IGR | opensea | 1,364498531 | 0,627787214 | Hypermethylated |
| DMR_19 | cg16484042 | 16 | 14403405 | | IGR | opensea | 0,51539455 | 0,87994157 | Hypermethylated |
| DMR_19 | cg22550658 | 16 | 14402939 | <i>MIR365A</i> | TSS1500 | opensea | 1,367861616 | 0,626815756 | Hypermethylated |
| DMR_19 | cg22388260 | 16 | 14403138 | <i>MIR365-1</i> | TSS200 | opensea | 1,197557596 | 0,678412834 | Hypermethylated |
| DMR_19 | cg02886263 | 16 | 14403144 | <i>MIR365-1</i> | Body | opensea | 1,740560553 | 0,525068752 | Hypermethylated |
| DMR_20 | cg08979191 | 5 | 132113734 | <i>SEPT8</i> | TSS200 | shore | 2,560741113 | 0,358870091 | Hypermethylated |
| DMR_20 | cg06941635 | 5 | 132113776 | <i>SEPT8</i> | TSS1500 | shore | 2,210977262 | 0,420385897 | Hypermethylated |
| DMR_20 | cg13334727 | 5 | 132113601 | <i>SEPT8</i> | TSS200 | island | 3,403970878 | 0,258995734 | Hypermethylated |
| DMR_20 | cg01444808 | 5 | 132113860 | <i>SEPT8</i> | TSS1500 | shore | 1,947156321 | 0,475179211 | Hypermethylated |
| DMR_20 | cg19518672 | 5 | 132113620 | <i>SEPT8</i> | TSS200 | island | 2,707973631 | 0,337401921 | Hypermethylated |
| DMR_20 | cg27309611 | 5 | 132113725 | <i>SEPT8</i> | TSS200 | shore | 2,884863402 | 0,314229773 | Hypermethylated |
| DMR_20 | cg25212993 | 5 | 132113755 | <i>SEPT8</i> | TSS200 | shore | 2,455052459 | 0,376529259 | Hypermethylated |
| DMR_20 | cg23077575 | 5 | 132113608 | <i>SEPT8</i> | TSS200 | island | 2,423753188 | 0,381514796 | Hypermethylated |
| DMR_20 | cg24951781 | 5 | 132114055 | <i>SEPT8</i> | TSS1500 | shore | 1,522117484 | 0,583522497 | Hypermethylated |
| DMR_20 | cg10366452 | 5 | 132113671 | <i>SEPT8</i> | TSS1500 | shore | 2,599851246 | 0,352140817 | Hypermethylated |
| DMR_21 | cg24718465 | 19 | 46999118 | <i>PNMAL2</i> | 1stExon | island | 2,083008585 | 0,445487571 | Hypermethylated |
| DMR_21 | cg11410682 | 19 | 46999224 | <i>PNMAL2</i> | TSS200 | island | 2,212891557 | 0,420064425 | Hypermethylated |
| DMR_21 | cg18709349 | 19 | 46999274 | <i>PNMAL2</i> | TSS200 | island | 2,801867008 | 0,32550359 | Hypermethylated |
| DMR_21 | cg04255201 | 19 | 46999307 | <i>PNMAL2</i> | TSS200 | shore | 2,60666054 | 0,351052215 | Hypermethylated |
| DMR_21 | cg23716779 | 19 | 46998790 | <i>PNMAL2</i> | 1stExon | shore | 2,362638383 | 0,392961895 | Hypermethylated |
| DMR_21 | cg25806524 | 19 | 46998786 | <i>PNMAL2</i> | 1stExon | shore | 1,6692657 | 0,544196426 | Hypermethylated |

Supplemental Table S2b. (continued).

| | | | | | | | | | |
|--------|-------------------|----|-----------|---------------|---------|--------|--------------|-------------|-----------------|
| DMR_21 | cg03969996 | 19 | 46999055 | <i>PNMAL2</i> | 1stExon | island | 2,64638778 | 0,34564688 | Hypermethylated |
| DMR_21 | cg04689048 | 19 | 46999289 | <i>PNMAL2</i> | TSS200 | island | 2,478632232 | 0,372954396 | Hypermethylated |
| DMR_21 | cg16617301 | 19 | 46999109 | <i>PNMAL2</i> | 1stExon | island | 2,553430172 | 0,360098337 | Hypermethylated |
| DMR_22 | cg24838063 | 12 | 130822603 | <i>PIWIL1</i> | TSS200 | island | -1,503218247 | 0,588838488 | Hypomethylated |
| DMR_22 | cg11931211 | 12 | 130822361 | <i>PIWIL1</i> | TSS200 | island | -1,400686032 | 0,617412519 | Hypomethylated |
| DMR_22 | cg18319102 | 12 | 130822256 | <i>PIWIL1</i> | TSS200 | shore | -2,77018433 | 0,32971659 | Hypomethylated |
| DMR_22 | cg24229701 | 12 | 130821962 | <i>PIWIL1</i> | TSS1500 | shore | -1,547959153 | 0,576477964 | Hypomethylated |
| DMR_22 | cg19424457 | 12 | 130822308 | <i>PIWIL1</i> | TSS200 | shore | -1,168992311 | 0,686715627 | Hypomethylated |
| DMR_22 | cg23887609 | 12 | 130822674 | <i>PIWIL1</i> | 1stExon | island | -1,169035143 | 0,686709578 | Hypomethylated |
| DMR_22 | cg26677194 | 12 | 130822605 | <i>PIWIL1</i> | TSS200 | island | -1,353602683 | 0,631161339 | Hypomethylated |
| DMR_22 | cg13861644 | 12 | 130822286 | <i>PIWIL1</i> | TSS1500 | shore | -1,717617446 | 0,531071505 | Hypomethylated |
| DMR_22 | cg27630820 | 12 | 130822294 | <i>PIWIL1</i> | TSS200 | shore | -1,035739992 | 0,72752568 | Hypomethylated |
| DMR_23 | cg07455790 | 6 | 31650735 | | IGR | island | 1,399676552 | 0,617709797 | Hypermethylated |
| DMR_23 | cg25417675 | 6 | 31651059 | | IGR | island | 1,882553416 | 0,48977772 | Hypermethylated |
| DMR_23 | cg08624648 | 6 | 31651029 | | IGR | island | 1,173637753 | 0,68528191 | Hypermethylated |
| DMR_23 | cg18576957 | 6 | 31651020 | | IGR | island | 0,342767182 | 0,925580434 | Hypermethylated |
| DMR_23 | cg22318514 | 6 | 31650850 | | IGR | island | 1,252278688 | 0,661378618 | Hypermethylated |
| DMR_23 | cg18264486 | 6 | 31650916 | | IGR | island | 1,726119925 | 0,528902304 | Hypermethylated |
| DMR_23 | cg02389040 | 6 | 31650786 | | IGR | island | 1,216347051 | 0,672627006 | Hypermethylated |
| DMR_23 | cg04386400 | 6 | 31651158 | | IGR | island | 1,833762994 | 0,502380224 | Hypermethylated |
| DMR_23 | cg20435535 | 6 | 31651151 | | IGR | island | 1,455062297 | 0,601765602 | Hypermethylated |
| DMR_23 | cg02304584 | 6 | 31650790 | | IGR | island | 1,573955728 | 0,569049991 | Hypermethylated |
| DMR_23 | cg01297670 | 6 | 31651070 | | IGR | island | 2,266766781 | 0,410490955 | Hypermethylated |
| DMR_24 | cg04018738 | 6 | 31760616 | <i>VARS</i> | Body | shelf | 3,22422069 | 0,275515344 | Hypermethylated |
| DMR_24 | cg24771152 | 6 | 31760608 | <i>VARS</i> | Body | shelf | 2,122755586 | 0,437594476 | Hypermethylated |
| DMR_24 | cg17619755 | 6 | 31760629 | <i>VARS</i> | Body | shelf | 4,265769234 | 0,218039255 | Hypermethylated |
| DMR_24 | cg04368724 | 6 | 31760593 | <i>VARS</i> | Body | shelf | 2,440336981 | 0,379013639 | Hypermethylated |
| DMR_24 | cg11620328 | 6 | 31760521 | <i>VARS</i> | Body | shelf | 0,812949364 | 0,794187135 | Hypermethylated |
| DMR_24 | cg08899667 | 6 | 31761055 | <i>VARS</i> | Body | shelf | 3,498136304 | 0,248970582 | Hypermethylated |
| DMR_24 | cg02597894 | 6 | 31760796 | <i>VARS</i> | Body | shelf | 2,938047449 | 0,307596288 | Hypermethylated |

Supplemental Table S2b. (continued).

| | | | | | | | | | |
|--------|-------------------|----|----------|--------------|---------|--------|-------------|-------------|-----------------|
| DMR_24 | cg02980249 | 6 | 31760762 | <i>VAR5</i> | Body | shelf | 3,467979773 | 0,252648221 | Hypermethylated |
| DMR_25 | cg06758350 | 21 | 36259460 | <i>RUNX1</i> | 5'UTR | island | 1,506544396 | 0,587945346 | Hypermethylated |
| DMR_25 | cg00994804 | 21 | 36259383 | <i>RUNX1</i> | 1stExon | island | 1,761573492 | 0,519710049 | Hypermethylated |
| DMR_25 | cg12477880 | 21 | 36259241 | <i>RUNX1</i> | 1stExon | island | 1,54408364 | 0,577477099 | Hypermethylated |
| DMR_25 | cg02869559 | 21 | 36259067 | <i>RUNX1</i> | Body | island | 0,783654214 | 0,80269001 | Hypermethylated |
| DMR_25 | cg12083928 | 21 | 36259623 | <i>RUNX1</i> | 1stExon | shore | 1,174358666 | 0,6851143 | Hypermethylated |
| DMR_25 | cg14937633 | 21 | 36259397 | <i>RUNX1</i> | 1stExon | island | 1,758046677 | 0,520661529 | Hypermethylated |
| DMR_25 | cg09889857 | 21 | 36259618 | <i>RUNX1</i> | 1stExon | shore | 1,043119847 | 0,724854149 | Hypermethylated |
| DMR_25 | cg20418711 | 21 | 36259179 | <i>RUNX1</i> | 1stExon | island | 1,880518182 | 0,490092961 | Hypermethylated |