

VANESSA PRETES PERALTA

**Identificação de variantes dos genes associados ao tamanho do telômero em
pacientes com neuroblastoma**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada a Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Pediatria

Orientador: Dra. Estela Maria Novak

São Paulo

2021

VANESSA PRETES PERALTA

**Identificação de variantes dos genes associados ao tamanho do telômero em
pacientes com neuroblastoma**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada a Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Pediatria

Orientador: Dra. Estela Maria Novak

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pretes Peralta, Vanessa

Identificação de variantes dos genes associados
ao tamanho do telômero em pacientes com
neuroblastoma / Vanessa Pretes Peralta. -- São
Paulo, 2021.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Pediatria.

Orientador: Estela Maria Novak.

Descritores: 1.Neuroblastoma 2.MYCN não
amplificado 3.Telômeros 4.Comprimento dos telômeros
de leucócitos 5.Alongamento alternativo do telômero
6.Variação genética 7.CTC1 8.RTEL1 9.ATRX

USP/FM/DBD-156/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicado à Isaac Pretes Peralta,
meu filho amado!

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus por seu amor imensurável que excede todo entendimento humano e por ter direcionado minha trajetória, não apenas neste trabalho, mas em todos os momentos da minha vida! Por Ele e para Ele foram feitas todas as coisas, glória e honra seja dada ao Único que é digno de ser louvado.

Não só agradeço, mas divido o mérito deste trabalho com meu filho Isaac Pretes Peralta, o fator motivador da minha existência e persistência! Meu muito obrigada também à minha mãe Creusa Anacleto Rocha, por sempre estar ao meu lado, acompanhando-me e dando-me diretrizes a cada caminho trilhado e meta alcançada.

A toda minha família, pelo amor e confiança em mim investidos. Um obrigado em especial à Augusto Almeida Peralta, por estar ao meu lado desde a primeira letra contida neste trabalho, obrigada pela compreensão.

A Dra. Estela Maria Novak, pela oportunidade inestimável de tê-la como orientadora. Com ela aprendi a persistir mesmo que o alvo esteja longe ou aparentemente impossível de se alcançar. Obrigada por sua incessante ajuda e por incentivar-me a planejar, pesquisar e alcançar! Sem seu apoio, certamente a concretização desse sonho não seria possível!

Ao Dr Vicente Odone Filho, que com sua imprecindível ajuda tornou possível a realização deste trabalho. Sua contribuição transcende o fomento! O senhor é um verdadeiro exemplo de amor pela profissão e inigualável dedicação por uma causa!

Meus agradecimentos para a Associação Beneficente Stella Demarco, especialmente a Luis Roberto Demarco e Ricardo Nunes de Oliveira, e em particular a Ruth Katz de Castro Gelband da SH Forma, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Fundação Criança pelo apoio financeiro, contribuindo e tornando possível a realização deste estudo.

Agradeço também as crianças e familiares que aceitaram participar desta pesquisa, estamos um passo mais próximos de encontrar soluções que possam ajudar toda a comunidade.

Gostaria de destacar a fundamental ajuda de Thamiris Magalhães Gimenez e Alana dos Santos Dias, por agregarem conhecimentos e por tornarem-se não apenas colegas de laboratório, mas sim participantes de mais esta página da minha história que levarei por toda a vida. Meu muito obrigada!

Agradeço também a Andreia Rangel Santos que sempre se dispôs a ajudar-me em tudo quanto precisei.

Aos presentes membros da banca que tão prontamente aceitaram o convite de compor a banca examinadora desse trabalho. Agradeço também a todo corpo docente do Programa de Pediatria, por terem dividido seus conhecimentos de forma inigualável.

Gostaria de expressar um agradecimento em especial aos meus mentores pessoais Horácio Mughiollo e Ivanilda Patrício Mughiollo, por tamanha contribuição em meu desenvolvimento como indivíduo. Saibam que o suporte e encorajamento que vocês transferiram a mim, maximizou o meu potencial e tornou-me o que sou hoje! Obrigada por participarem tão ativamente da minha caminhada. O meu sucesso profissional seria reduzido a nada se não fosse construído em meu interior o caráter de Cristo!

Agradeço a todos os meus amigos que sempre me apoiaram e torceram por mim, lembrando que não há distância que a amizade não supere. Sinto-me afortunada por compartilhar minha vida com vocês. Cada um de vocês deixou um pouco de si em mim e levou consigo um pouco de nós!

E por fim agradeço a ciência e a tecnologia que contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa, sou grata também aos pesquisadores que com muito trabalho chegaram a resultados notáveis, na qual muitos destes foram utilizados como fonte para desenvolver este estudo.

SUMÁRIO

Lista de siglas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. NEUROBLASTOMA.....	01
1.2. ESTADIAMENTO.....	01
1.3. TELÔMEROS.....	04
1.4. TELÔMEROS E O NEUROBLASTOMA.....	05
1.4.1. GENES <i>TERT</i> , <i>TERC</i> E TELOMERASE.....	06
1.4.2. ALONGAMENTO ALTERNATIVO DO TAMANHO DOS TELÔMEROS E O NEUROBLASTOMA.....	07
1.5. VARIANTES GENÉTICAS DO TELÔMERO E O RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DO NEUROBLASTOMA.....	09
2. JUSTIFICATIVA	10
3. HIPÓTESE	11
4. OBJETIVOS	11
4.1. OBJETIVOS GERAIS.....	11
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
5. MÉTODOS	12
5.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	12
5.2. CASUÍSTICA.....	12
5.2.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	13
5.2.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	13
5.3. COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE E TUMORES DOS PACIENTES ESTUDADOS.....	13
5.3.1. EXTRAÇÃO DE DNA.....	13
5.3.1.1. EXTRAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO..	13
5.3.1.2. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE TUMORES.....	14
5.3.1.3. QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	14
5.4. DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO DOS TELÔMEROS DE LEUCÓCITOS.....	14
5.4.1. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE qPCR.....	14

5.4.2. CURVA PADRÃO E QUALIDADE DAS REAÇÕES.....	15
5.4.3. DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO RELATIVO DOS TELÔMEROS DE LEUCÓCITOS.....	16
5.5. VARIANTES GENÉTICAS UTILIZADAS NA CONTRUÇÃO DO PAINEL GÊNICO.....	17
5.5.1. DESENHO E SEQUÊNCIA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS.....	17
5.6. IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES ASSOCIADAS AO ALONGAMENTO ALTERNATIVO DOS TELÔMEROS ATRAVÉS ANÁLISE DO EXOMA.....	18
5.6.1. PREPARAÇÃO DA BIBLIOTECA.....	18
5.6.2. QUANTIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA.....	18
5.6.3. SEQUENCIAMENTO NA PLATAFORMA ILLUMINA HISEQ 2500.....	18
5.6.4. ANÁLISE DA QUALIDADE DOS READS E FILTRAGEM.....	19
5.6.5. ANÁLISE DOS DADOS - BIOINFORMÁTICA.....	19
5.6.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
6. RESULTADOS.....	20
6.1. COMPARAÇÃO ENTRE O COMPRIMENTO RELATIVO DOS TELÔMEROS DE LEUCÓCITOS (CRTL) DOS PACIENTES COM IDADE INFERIOR E SUPERIOR A 18 MESES E SOBREVIDA.....	20
6.2. IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES <i>ACYP2</i> , <i>OBFC1</i> , <i>CTC1</i> , <i>ZNF208</i> , <i>NAF1</i> E <i>RTEL1</i> NOS PACIENTES COM NEUROBLASTOMA <i>MYCN</i> NÃO AMPLIFICADO.....	23
6.3. IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES <i>TERC</i> e <i>MYNN</i> NOS PACIENTES COM NEUROBLASTOMA.....	25
6.4. ALONGAMENTO ALTERNATIVO DO COMPRIMENTO DO TELÔMERO E MUTAÇÕES EM <i>ATRX</i>	26
7. DISCUSSÃO.....	27
8. CONCLUSÃO.....	30
9. REFERÊNCIAS.....	31

LISTA DE SIGLAS

<i>ACYP2</i>	Gene que codifica a enzima acilfosfatase-2
ALT	Alternative lengthening of telomeres
<i>ATRX</i>	Alpha-thalassemia mental retardation syndrome
BTB/POZ	Domínio proteína de dedo de zinco
COG	Children's Oncology Group
COSMICS	Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer
CRC	Células de câncer coloretal
Ct	threshold cycle
CRTL	Comprimento relativo dos telômeros de leucócitos
<i>CTC1</i>	CST telomere replication complex component 1
ECTR	Círculos de repetição telomérica extracromossômica
FATHMM	Functional Analysis through Hidden Markov Models
GWAS	Genome Wide Association Studies
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de SP
HR	Recombinação homóloga
<i>hTERT</i>	Transcriptase reversa da telomerase humano
IGV	Integrated Genome Browser
IDRF	Fator de Risco Definido por Imagens
INRGSS	Estadiamento de Neuroblastoma para Grupos de Risco
INSS	Sistema Internacional de Estadiamento para Neuroblastoma

INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
ITACI	Instituto de tratamento de Câncer Infantil
NB	Neuroblastoma
<i>NAF1</i>	Nuclear assembly fator 1 (H/ACA box snRNA)
<i>OBFC1</i>	Oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 1
pb	Pares de bases
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
<i>RTEL1</i>	Regulator of telomere elongation helicase 1
SELA	Sequenciamento em Larga Escala
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
T/S	Razão entre comprimento de telômeros e cópias do gene cópia única
<i>TERC</i>	Componente de RNA não codificante
<i>TERT</i>	Transcriptase reversa da telomerase
TIN2	Interacting nuclear protein 2
TPP1	Interacting protein 1
TRF1	Telomere repeat binding 1
TRF2	Telomere repeat binding 2
<i>ZNF</i>	Proteína dedo de zinco (Zinc finger)

RESUMO

Pretes-Peralta V. *Identificação de variantes dos genes associados ao tamanho do telômero em pacientes com neuroblastoma* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

O neuroblastoma é o tumor sólido extracraniano mais comum da infância, representando cerca de 10% de todos os tumores sólidos, com prevalência de 1 caso a cada 7 mil nascidos vivos. O gene *MYCN* amplificado em tumores de alto risco, está associado predominantemente com o avanço do neuroblastoma e o pior prognóstico, entretanto, dentre os tumores *MYCN* não amplificado, onde se espera que o desfecho clínico seja mais favorável, cerca de 70 a 80% nem sempre evoluem para a cura. Disfunções teloméricas causam instabilidade genômica, e em última análise, podem induzir a carcinogênese. A variação do comprimento dos telômeros, associada a presença de variantes genéticas podem contribuir para o desenvolvimento do neuroblastoma. A análise do comprimento dos telômeros de leucócitos têm sido cada vez mais utilizada para avaliar o comprimento do telômero humano, é um marcador acessível e foi utilizado neste estudo. A casuística contou com 52 pacientes diagnosticados com Neuroblastoma *MYCN* não amplificado em estadio 4. Foram analisados, através da técnica de PCR em tempo real, o comprimento dos telômeros dos pacientes em comparação aos controles saudáveis da mesma faixa etária. Através da análise de painéis gênicos e da técnica de exoma, foi investigada a presença de variantes genéticas relacionadas a alterações teloméricas. Pacientes com idade ao diagnóstico inferior a 18 meses que foram óbito, apresentaram telômeros com tamanho relativo de 2,97 (2,56-3,56) e os pacientes com idade ao diagnóstico superior a 18 meses que foram óbito, apresentaram telômeros com tamanho relativo de 2,98 (2,39-3,99). Estudos de Randomização Mendeliana indicaram uma associação entre os variantes teloméricas (*ACYP2*, *NAF1*, *OBFC1*, *CTCI*, *ZNF208* e *RTEL1*), com predisposição genética para telômeros mais longos e risco de desenvolvimento de neuroblastoma *MYCN* amplificado (Walsh et al., 2016). Os resultados apresentados neste estudo demonstram que 52/52 (100%) dos pacientes apresentaram um ou mais dos seguintes SNPs: 10/52 (19%) *ACYP2*, 49/52 (94%) *NAF1*, 44/52 (85%) *OBFC1*, 16/52 (31%) *CTCI*, 25/52 (48%) *ZNF208* e 12/52 (23%) *RTEL1*. Apesar da nossa coorte ser menor do que a descrita no estudo de Walsh et al. (2016), foi possível observar que as variantes *CTCI* e *RTEL1*, podem ser indicadores de risco para o

desenvolvimento de neuroblastoma na população brasileira ($p < 0,05$). Também foram identificados através do painel gênico, as variantes *MYNN* (rs10936599) em 12/52 (23%) *TERC* (rs2293607) em 10/52 (19%). Os resultados do sequenciamento do exoma identificaram 2 casos de crianças com mutações em *ATRX* que apresentaram seus telômeros alongados e foram a óbito: uma paciente com 168 meses (exon15 c.4377_4379delGGA p.E1464del);(exon18 .Leu1613X stopgain) e outra paciente com 68 meses (exon13 .Gln1400Leu);(exon19 p.Asp456Asn), que podem estar associados ao alongamento alternativo do telômero. Apesar de estudos adicionais, com coortes maiores de pacientes, serem necessários futuramente para validar os resultados do presente estudo, os dados apresentados sugerem que as variantes *CTCI* e *RTEL1*, podem atuar como preditores para o desenvolvimento do neuroblastoma *MYCN* não amplificado na população brasileira. Assim como, as variantes encontradas nos genes *ATRX*, identificadas neste estudo, poderão ser utilizadas como biomarcadores de prognóstico de neuroblastoma *MYCN* não amplificados.

Descritores: Neuroblastoma; *MYCN* não amplificado; Telômeros; Comprimento dos telômeros de leucócitos; Alongamento alternativo do telômero; Variação genética; *CTCI*; *RTEL1*; *ATRX*.

ABSTRACT

Pretes-Peralta V. *Identification of gene variants associated with telomere length in patients with neuroblastoma* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Neuroblastoma is the most common extracranial solid tumor of childhood, representing about 10% of all solid tumors, with a prevalence of 1 case per 7 thousand live births. The *MYCN*-amplified gene in high-risk tumors is predominantly associated with the advancement of Neuroblastoma and the worst prognosis, however, among *MYCN* non-amplified tumors, where the clinical outcome is expected to be more favorable, about 70 to 80% not always evolve towards healing. Telomeric dysfunctions cause genomic instability, and ultimately, they can induce carcinogenesis. The variation in telomere length, associated with the presence of genetic variants can contribute to the development of Neuroblastoma. Leukocyte telomere length analysis, has been increasingly used to assess the human telomeres length, it is an accessible marker and was used in this study. The sample consisted of 52 patients diagnosed with Neuroblastoma *MYCN* non-amplified stage 4. The patient's telomeres length was analyzed using the real-time PCR method in comparison to healthy controls of the same age group. Through the analysis of gene panels and the exome sequencing, the presence of genetic variants related to telomeric alterations were investigated. Patients younger than 18 months at diagnosis who died, presented telomere length 2.97 (2.56-3.56), and patients older than 18 months at diagnosis who died, presented telomere length 2.98 (2.39-3.99). Mendelian Randomization Studies indicated an association between telomeric variants (*ACYP2*, *NAF1*, *OBFC1*, *CTC1*, *ZNF208* and *RTEL1*), with a genetic predisposition to telomere length higher and risk of developing *MYCN* amplified Neuroblastoma (Walsh et al., 2016). The results presented of this study demonstrate that 52/52 (100%) of the patients had 1 or more of these SNPs: 10/52 (19%) *ACYP2*, 49/52 (94%) *NAF1*, 44/52 (85%) *OBFC1*, 16/52 (31%) *CTC1*, 25/52 (48%) *ZNF208* and 12/52 (23%) *RTEL1*. Despite our cohort being smaller than that described in the study by Walsh et al. (2016), it was possible to observe that the variants *CTC1* and *RTEL1*, can be risk indicators for the development of Neuroblastoma in the Brazilian population ($p < 0.05$). The *MYNN* variants (rs10936599) in 12/52 (23%) *TERC* (rs2293607) in 10/52 (19%) were also identified through the gene panel. The results of exome sequencing identified 2 cases of children with mutations in *ATRX* who had their

telomere length higher and died: a 168-month-old patient (exon15 c.4377_4379delGGA p.E1464del); (exon18 .Leu1613X stopgain) and a 68-month-old patient (exon13 .Gln1400Leu); (exon19 p.Asp456Asn), which may be associated with alternative lengthening of telomeres. Although additional studies, with larger cohorts of patients, are needed in the future to validate the results of the present study, the data presented suggest that the variants *CTCI* and *RTELI*, may act as predictors for the development of Neuroblastoma *MYCN* non-amplified in the Brazilian population. Likewise, the variants found in the *ATRX* genes, identified in this study, can be used as biomarkers of prognosis of Neuroblastoma *MYCN* non-amplified.

Descriptors: Neuroblastoma; *MYCN* non-amplified; Telomeres; Leukocyte telomeres length; Alternative lengthening of telomere; Genetic variation; *CTCI*; *RTELI*; *ATRX*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. NEUROBLASTOMA

Os neuroblastomas (NB) são provenientes das simpatogônias – células nervosas indiferenciadas da crista neural, das quais se originam a medula da adrenal e todos os gânglios e plexos simpáticos (Cotterill et al., 2000). A apresentação clínica do neuroblastoma é muito variável e depende do estadiamento e da localização do tumor, podendo desenvolver-se em qualquer local do sistema nervoso simpático. Além do abdômen (80% dos casos), as formas metastáticas são também observadas no fígado, ossos e na medula óssea. Em 90% dos casos, o neuroblastoma é diagnosticado antes dos 5 anos de idade (Izbicki et al., 2003).

Este tipo de neoplasia corresponde ao tumor sólido extracraniano mais comum da infância, representando cerca de 10% de todos os tumores sólidos encontrados em crianças com idade inferior a 15 anos, com prevalência de 1 caso a cada 7 mil nascidos vivos (INCA, 2020). Entre os lactentes, corresponde a mais de 50% das neoplasias malignas. O INCA não dispõe de dados concretos acerca da frequência deste tipo de câncer na população brasileira, porém estima-se que a incidência anual dos neuroblastomas varia entre 7 e 12 casos por milhão de crianças até 15 anos, alcançando aproximadamente 7,3 casos/milhão no Brasil (Izbicki et al., 2003, Cartum, 2012).

O neuroblastoma tem sido associado a várias anomalias genéticas que afetam o prognóstico (Kuzyk et al., 2016).

Os principais parâmetros genéticos preditivos de um resultado desfavorável no neuroblastoma incluem a amplificação do oncogene *MYCN* (2p24.3) (3 a 300 cópias), idade superior a 18 meses no momento do diagnóstico, a perda do braço cromossomo 1p e 11q, e o ganho do braço cromossomo 17q. Estas perdas alélicas em várias regiões do genoma, como no braço curto do cromossomo 1 (até 35%), no braço longo do cromossomo 11 (45%), no braço curto do cromossomo 3 foram identificados em diversos estudos (Kuzyk et al., 2016).

1.2. ESTADIAMENTO

Baseado em muitos estudos clínicos, histológicos e genéticos, os tumores de neuroblastoma foram estratificados dentro de categorias de risco (baixo, intermediário e alto risco) que auxiliam no prognóstico e tratamento (Cohn et al., 2009).

O mais usado dentre esses sistemas de estadiamento é o Sistema Internacional de Estadiamento para Neuroblastoma (INSS), que utiliza informações baseadas na extensão da excisão cirúrgica e metástase ao diagnóstico, classificando os tumores em 1 e 2, baixo risco e, 3 e 4 como tumores de alto risco (Tabela 1). Nos casos de estádios 1 e 2, são realizadas somente a intervenção cirúrgica que retira toda a lesão primária, sem a utilização de tratamento com quimioterápicos. Também pode ocorrer em alguns casos, somente acompanhamento clínico, pois esses tumores tendem a regredir espontaneamente ou a se diferenciarem em ganglioneuromas benignos. Nos pacientes de estádios 3 e 4, na maioria das vezes, o tumor é irresssecável. Nestes casos, torna-se necessário o tratamento com agentes quimioterápicos e em alguns casos, radioterápicos, como descrito por Brodeur et al. (2003).

Tabela 1. Sistema Internacional de Estadiamento para Neuroblastoma (INSS)

Estadio 1	Tumor primário localizado, possível de ser totalmente removido por cirurgia, presença de células de NB dentro dos gânglios linfáticos intratumorais, porém sem acometimento de linfonodos fora do tumor.
Estadio 2A	Tumor primário localizado, porém nem toda a área tumoral é completamente visível possibilitando a remoção completa por cirurgia, sem metástases para os linfonodos.
Estadio 2B	Tumor primário localizado, podendo ser ou não completamente removido por cirurgia. Os gânglios linfáticos nas proximidades do tumor podem conter células de NB, porém a doença não atingiu os gânglios linfáticos mais distantes.
Estadio 3	O tumor não pode ser removido cirurgicamente, já sendo considerado um tipo mais agressivo, podendo já ter se disseminado para linfonodos próximos ou do lado contralateral do corpo.
Estadio 4	O tumor já está disseminado para diversas partes do corpo como linfonodos distantes, ossos, fígado, pele e medula óssea.
Estadio 4s	Tumor primário localizado (1, 2A ou 2B) em pacientes com menos de 18 meses, com metáses limitadas a pele, fígado e medula óssea (menos de 10% de células na medula são cancerosas).

Além do INSS, outro critério de classificação utilizado é o Sistema Internacional de Estadiamento de Neuroblastoma para Grupos de Risco (INRGSS) (Tabela 2) (Cohn et al., 2009), que utiliza os Fatores de Risco Definidos por Imagens (IDRFs) para definir a complexidade da retirada do tumor, como a localização do tumor muito próximo de um órgão vital ou de vasos sanguíneos importantes.

Tabela 2. Sistema Internacional de Estadiamento de Neuroblastoma para Grupos de Risco (INRGSS)

L1	Tumor localizado, sem envolvimento de estruturas vitais definido por IDRFs e confinado em apenas um lado do corpo
L2	Tumor loco-regional com a presença de um ou mais IDRFs
M	Presença de metástase
MS	Doença metastática em crianças menores de 18 meses, com metástases confinadas em pele, fígado e medula óssea

O estadiamento da doença é combinado com outros fatores prognósticos como idade ao diagnóstico, características histopatológicas (classificação de Shimada), alterações cromossômicas, amplificação do gene *MYCN* e ploidia do DNA (Cartum, 2012).

O *MYCN* pertence à família de proto-oncogene e participa de processos como crescimento celular, diferenciação e apoptose. A amplificação de cópias extras do gene *MYCN* pode levar à proliferação celular excessiva e irrestrita, principalmente por ser um fator de transcrição do gene *TERT*, que codifica a enzima telomerase, o que é amplamente observada na maioria dos cânceres (Cartum, 2012).

Quanto a ploidia das células neoplásicas, constatou-se que uma parte dos neuroblastomas apresenta um conteúdo em DNA diplóide/ tetraplóide, e a outra parte um conteúdo hiperdiplóide/triplóide (Brodeur et al., 2003). Os primeiros correspondem geralmente a tumores mais agressivos que os segundos (Look et al., 1984). Uma possível explicação para esta associação, seria que os tumores triplóides tem um defeito fundamental na mitose, ganham ou perdem cromossomos completos, enquanto que os tumores diploides, tendo um defeito fundamental na estabilidade do genoma, apresentam elevada incidência de rearranjos cromossômicos estruturais que podem alterar a

expressão de genes importantes na estabilidade celular, resultando num comportamento agressivo (Kaneko e Knudson, 2000; Santos, 2011).

As triploidias e anomalias numéricas dos cromossomas estão associadas a um bom prognóstico, enquanto que a di - ou a tetraploidia e as anomalias segmentais cromossômicas estão associadas a um pior prognóstico (Kuzyk et al., 2016).

1.3. TELÔMEROS

Uma característica marcante das células neoplásicas é a sua imortalidade, que é geneticamente determinada por várias alterações nos telômeros. A célula escapa do ciclo celular normal, aumentando o tempo de vida e o tempo de ativação da telomerase, levando a imortalização celular e permanência em replicação celular (Rice e Skordalakes, 2016).

Os telômeros apresentam nas extremidades dos cromossomos uma sequência repetida de DNA hexanucleotídeo (TTAGGG). Esta estrutura apresenta 10-15 kb de comprimento, que encurtam aproximadamente 30 a 200 pb em cada ciclo de divisão mitótico (Gu et al., 2016). A principal função dos telômeros é a manutenção da integridade cromossômica, garantindo a replicação completa das extremidades dos cromossomos e o estabelecimento da estrutura tridimensional do núcleo celular (Codd et al., 2010).

Durante a replicação de células somáticas, o comprimento dos telômeros diminui progressivamente, devido a incapacidade da DNA polimerase replicar completamente a extremidade 3' da cadeia de DNA. Quando o comprimento dos telômeros tornam-se criticamente encurtados, a célula é acionada para entrar em senescência replicativa, e subsequentemente conduzida a morte celular (Walsh et al., 2016). O tamanho dos telômeros é afetado por muitos fatores, como estresse oxidativo, inflamação crônica, além de fatores hereditários (Slagboom et al., 1994).

Os telômeros são replicados pela telomerase (uma ribonucleoproteína transcriptase reversa-RNP), que contém os componentes *TERC/TERT* e são mantidos primariamente pelo complexo de nucleoproteína como o *shelterin* (*TRF1*, *TRF2*, *TIN2*, *RAP1*, *POT1*, *TPP1*) e *CST* (*CDC13* / *CTC1*, *STN1*, *Ten1*), que interage com o telomômero, permitindo a formação da estrutura T-loop. A principal função deste complexo nucleoproteico é a proteção da região terminal dos cromossomos contra a ativação dos mecanismos de reparação do DNA, proporcionando a preservação da integridade gênica (Rice e Skordalakes, 2016).

A telomerase é um complexo enzimático (DNA-polimerase RNA-dependente) que sintetiza repetições teloméricas de DNA, proporcionando um potencial proliferativo ilimitado (Rice e Skordalakes, 2016).

A disfunção telomérica é conhecida por causar instabilidade genômica, que em última análise pode ser uma das causas para a carcinogênese. A maior parte dos tumores que apresentam um nível elevado de atividade da telomerase está associada com pior prognóstico. A expressão da telomerase correlaciona-se com a capacidade de proliferação celular ilimitada, enquanto que a maioria dos tumores benignos, pré-malignas é caracterizada pela ausência de telomerase (Rice e Skordalakes, 2016).

1.4. TELÔMEROS E O NEUROBLASTOMA

O neuroblastoma é subagrupado de acordo com seu perfil de instabilidade cromossomal: enquanto alguns tumores exibem aberrações numéricas e poucas ou nenhuma estruturais, outros são dominados por rearranjos estruturais, incluindo rearranjos intracromossomais. A instabilidade cromossômica tem sido associada a aberrações do comprimento dos telômeros no neuroblastoma. Estes subgrupos têm perfis dos telômeros com base no comprimento dos telômeros e arquitetura nuclear (Kuzyk et al., 2016). Utilizando-se do método de “3D telomere quantitative fluorescence in situ hybridization”, Kuzyk et al. (2016), os telômeros foram classificados em 3 subgrupos (pequeno, médio e longo), baseado nos perfis dos telômeros individuais considerando tanto o comprimento dos telômeros como a organização nuclear. O subgrupo I compreende os telômeros com maior porcentagem de telômeros pequenos (38,7%) e menor número de telômeros agregados S por núcleo. O subgrupo II contém a maior porcentagem de telômeros de tamanho médio (42,29%) e o subgrupo III tem a maior porcentagem de telômeros de tamanho longo (31,9%).

O Subgrupo III ilustra o alto nível de disfunção dos telômeros, compreende tumores com maior heterogeneidade e com maior número de telômeros por núcleos. A maioria dos neuroblastomas com histologia desfavorável e pacientes ao diagnóstico com idade acima de 18 meses, foram encontrados nos subgrupos III, enquanto que os tumores com histologia favorável e pacientes ao diagnóstico com menos de 18 meses, foram encontrados nos subgrupos I e II. Todos os tumores que apresentavam *MYCN* amplificado e níveis de expressão média ou alta foram encontrados no subgrupo III. O subgrupo I e II apresentavam *MYCN* não amplificado e níveis de expressão baixo. Assim, os

neuroblastomas com maior instabilidade genômica são encontrados no subgrupo III, seguidos do subgrupo II e subgrupos I, que tem o menor nível de instabilidade genômica. A maior instabilidade da heterogeneidade intratumoral está correlacionado ao maior nível de disfunção do telômero (Kuzyk et al., 2016).

1.4.1. GENES *TERT*, *TERC* E A TELOMERASE

A imortalidade é uma característica das células neoplásicas e é geneticamente determinada por alterações nos telômeros. O aumento do tempo de vida da célula é mediado na maior parte dos tumores pela ativação da telomerase, levando a imortalização celular e permanência em replicação celular. Uma das características das células cancerígenas é um aumento na expressão da telomerase (Rice e Skordalakes, 2016).

A expressão desta enzima, na maioria dos tumores, está diretamente relacionada com a capacidade de divisão e proliferação celular, o que estabelece bases moleculares para um potencial proliferativo ilimitado, enquanto que a maioria dos tumores benignos, pré-malignas são caracterizados pela ausência de telomerase (Rice e Skordalakes, 2016).

A telomerase, por ser uma enzima com atividade transcriptase reversa especializada, é capaz de adicionar nucleotídeos na região terminal dos cromossomos, a partir da transcrição do *TERT* ou *hTERT* (transcriptase reversa de telomerase humana). Este é o principal mecanismo fisiológico responsável pela síntese de DNA telomérico, pois atua adicionando a repetição do hexâmero TTAGGG a saliência 3'OH da fita-G, ao final dos cromossomos, estendendo assim seu comprimento. Este mecanismo ocorre devido a complementaridade de bases entre o RNA da telomerase e o DNA telomérico (Hukezalie e Wong, 2013).

Vários estudos relataram que polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) dos genes *TERT* e *TERC* (Telomerase RNA Component), estão associados a uma suscetibilidade significativamente maior a vários tipos de câncer (Codd et al., 2010; Walsh et al., 2014). Ye et al. (2017) demonstraram que SNPs de *TERT* e *TERC* estão associados ao risco de câncer de pulmão na população Han chinesa.

O gene *TERC*, localizado na região upstream do cromossomo humano 3q26.2, codifica o componente de RNA da telomerase humana e serve de modelo para o alongamento dos telômeros, afetando a homeostase dos telômeros (Ye et al., 2017).

Este gene atua como molde na replicação do DNA telomérico, ao reconhecer a saliência da extremidade 3'-OH da cadeia G (Ye et al., 2017), fornecendo o modelo para

a síntese das repetições TTAGGG, promovendo a sua alongação. A variante do gene *TERC* (rs2293607), pode alterar a estrutura secundária do mRNA do transcrito por dobramento do RNA. Além disso, a partir das informações do projeto ENCODE para esta região, foram observadas duas marcas de histonas (H3K4Me1 e H3K4Me3), que mostraram-se próximas do rs2293607 (Jones et al., 2012).

A variante rs10936599 está localizada a montante do *TERC* e no segundo exon do gene da Mioneurina (*MYNN*). *MYNN* pertence a família de proteínas contendo domínio de dedo de zinco BTB/POZ, que está envolvida no controle de eventos de desenvolvimento, ativação e supressão da transcrição de genes distintos (Sethi et al., 2020).

Portadores do alelo comum no SNP rs10936599 (*MYNN*), próximo ao locus do componente de RNA da telomerase (*TERC*), tem telômeros significativamente mais longos. O alelo rs10936599 foi associado ao aumento do risco de câncer de colorretal (CRC) e adenomas colorretais (Jones et al., 2012). Análises *in silico*, mostraram que o SNP rs2293607 foi fortemente correlacionado com rs10936599, mapeado dentro de transcritos de *TERC* (Jones et al., 2012).

O alelo de risco CRC (rs2293607) foi associado a níveis mais elevados de mRNA *TERC* e a formação de telômeros mais longos (Polat et al., 2019).

Outros estudos identificaram o SNP rs10936599 do gene *MYNN*, associado ao desenvolvimento ou progressão de tumores colorretais na população coreana. Também foi descoberto que a mudança do alelo C para A da variante rs10936599 foi estatisticamente significativa em pacientes com câncer de pulmão na população chinesa (Polat et al., 2019).

1.4.2. ALONGAMENTO ALTERNATIVO DO TAMANHO DOS TELÔMEROS E O NEUROBLASTOMA

Sabe-se que a manutenção dos telômeros é exercido pela telomerase em cerca de 85% dos tumores, já os outros 15% não expressam esta enzima, possuindo um mecanismo de alongamento alternativo dos telômeros (ALT), que é ativado para manter os telômeros alongados independente da telomerase (Heeg, 2015).

O ALT atua na manutenção do comprimento dos telômeros que não depende da atividade da telomerase. Seu mecanismo consiste na permuta da região telomérica de diferentes cromossomos, através de um pareamento complementar de um cromossomo

ao outro, levando a uma troca de regiões teloméricas. É possível observar em ALT uma heterogeneidade do comprimento dos telômeros, no qual alguns apresentam-se muito longos, por outro lado gera-se um subconjunto de cromossomos, que por sua vez não demonstra qualquer sinal de telômero detectável. Este fenômeno pode ser observado em células tumorais positivas para ALT, porém não é encontrado em células normais (Cesare e Reddel, 2013).

Devido a recombinação homóloga (HR), as células ALT possuem comprimentos teloméricos inconsistentes, sendo observados telômeros extremamente curtos ou extremamente longos, fazendo com que haja uma instabilidade dos telômeros, resultante da perda de vários controles sobre a função dos telômeros (Cesare e Reddel, 2013).

Uma porção substancial das repetições teloméricas em células ALT é extracromossômica e pode possuir uma forma linear ou circular. Os círculos de repetição telomérica extracromossômica (ECTR) (círculos t), variam de <1 a 50 kb. ECTR ou estruturas equivalentes, não foram observadas em alta abundância em células normais telomerase positivas (Cesare e Reddel, 2013).

O ALT não é frequentemente detectado em carcinomas, porém em alguns tipos de sarcomas é possível observar que mais de 50% dos tumores são ALT-positivos. Já em neuroblastomas, não há dados concretos na literatura acerca de sua frequência, porém sabe-se que a malignidade desta doença é determinada, dentre outros motivos, pelo comprimento de seus telômeros e a imortalização da célula, possivelmente devido a uma falta de transdução de sinal, uma vez que a maioria das células ALT-positivos, bem como os tumores, possuem disfunção da proteína p53, esta proteína desempenha um papel fundamental no controle do ciclo celular e na apoptose. A deficiência da proteína p53 poderia gerar uma proliferação de células anormais e conferir um poder proliferativo ilimitado (Cesare e Reddel, 2013).

Na grande maioria dos neuroblastomas de alto risco onde a via ALT é ativada, há uma associação importante com mutações em *ATRX*, devido a descompactação da heterocromática causada pela perda de função de seu transcrito. Por outro lado, os tumores de baixo risco parecem não ter mecanismos de manutenção dos telômeros, o que pode explicar sua capacidade de regressão espontânea (Hertwig et al., 2016).

O gene *ATRX* codifica uma proteína helicase, que está envolvida na remodelação da cromatina, podendo contribuir assim na regulação da atividade de outros genes, pois quando o DNA está mais compactado (metilado), a expressão gênica é menor do que

quando o DNA está fracamente compactado. O gene *ATRX* está localizado no cromossomo X, mutações ou alterações estruturais neste gene podem levar a níveis reduzidos de incorporação de histonas 3.3 (H3.3), desestabilização de telômeros e aumento da recombinação homóloga, facilitando o desenvolvimento de ALT.

O *ATRX* liga-se a proteína *DAXX* (Proteína associada ao domínio da morte). A deposição de H3.3 nos telômeros e outras regiões ricas em guanina é mediada por *ATRX-DAXX*, que mantêm o estado condensado heterocromático do cromossomo (Heaphy et al., 2011).

Há uma forte correlação entre a inativação de *ATRX* e o fenótipo ALT em diferentes tipos de tumor. Evidências presentes na literatura, sugerem que o complexo *ATRX-DAXX* atua na montagem de heterocromatina em regiões repetitivas ricas em G, como os telômeros, entretanto, a diminuição de *ATRX* ou H3.3 em células-tronco embrionárias de camundongos, resulta em desestabilização e aumento na regulação de RNA dos telômeros, que encontram-se nas repetições teloméricas (Heaphy et al., 2011).

A perda de *ATRX* pode ser observada em vários tipos de câncer, principalmente quando associada a desregulação das vias oncogênicas (Ras e p53) (Oppel et al., 2019).

Variantes gênicas em *ATRX* foram encontradas em um subgrupo de tumores neuroendócrinos pancreáticos, cujos telômeros apresentaram-se extremamente alongados, uma característica de ALT, sugerindo que a perda de função do *ATRX* pode facilitar a ativação deste mecanismo de alongamento telomérico (Farooqi et al., 2014).

1.5. VARIANTES GENÉTICAS DO TELÔMERO E O RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DO NEUROBLASTOMA

A variação da inter-individualidade do comprimento relativo dos telômeros de leucócitos (CRTL) está associada com câncer, segundo Codd et al. (2013). Há evidências de que o comprimento dos telômeros, tanto nos leucócitos, como em outros tecidos de um mesmo indivíduo são altamente correlacionados (Codd et al., 2013). A análise do CRTL é um marcador acessível e cada vez mais útil na determinação do comprimento dos telômeros humanos (Ye et al., 2017).

Previamente, autores demonstraram que as variantes dos genes *TERC* (rs10936599), *ACYP2* (rs11125529), *NAF1* (rs7675998), *ZNF208* (rs8105767), *OBFC1* (rs4387287) e *RTEL1* (rs755017), estão associadas ao comprimento dos telômeros e a

predisposição para o desenvolvimento de diferentes tumores com múltiplos riscos (Jones et al., 2012; Russo et al., 2014).

Em outro estudo, Walsh et al. (2016), demonstraram em 1513 pacientes com idade inferior a 19 anos, brancos não-hispânicos, diagnosticados com neuroblastoma, tratados no COG (Children's Oncology Group), identificados através do Banco de Tumores e Hospital Infantil da Filadélfia, que as variantes *ACYP2*, *NAF1*, *ZNF208*, *OBFC1* e *RTEL1*, estavam associadas ao alongamento dos telômeros de leucócitos dos pacientes com neuroblastoma de alto risco (Gu et al., 2016).

O gene *OBFC1* (oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 1) é um componente do telômero do complexo *CTC1* e *TEN1*. O gene *NAF1* (nuclear assembly factor 1) é uma proteína necessária para o complexo H/ACA box snRNA. O gene *RTEL1* (regulator of telomere elongation helicase 1) é uma enzima helicase que desempenha um papel importante no estabelecimento do comprimento de telômeros, na manutenção dos telômeros e na reparação do DNA em experimentos com animais (Cheung et al., 2012).

A família *ZNFs* está envolvida na codificação de um *cluster* de genes que codificam proteínas *zinc fingers*. O gene *ACYP2* codifica uma proteína muscular específica, acilfosfato. Há evidências de que *ACYP2* está ligado a apoptose induzida por estresse no músculo de rato (Cheung et al., 2012).

Embora cada uma das variantes associadas ao CRTL explique somente uma pequena porção do total de variantes encontradas nos telômeros, Walsh et al. (2016), demonstraram que a combinação feita por 8 SNPs encontrados nestes genes (*ACYP2*, *TERC*, *NAF1*, *TERT*, *OBFC1*, *CTC1*, *ZNF208* e *RTEL1*), são responsáveis por 960-bp. Assumindo uma taxa anual de desgaste dos telômeros ~ 30 pb/ano de leucócitos, isso se traduz em mais de 30 anos de desgaste dos telômeros relacionada com a idade.

2. JUSTIFICATIVA

Neuroblastomas *MYCN* amplificado estadio 4 estão associados predominantemente com o avanço da doença e o pior prognóstico. Os tumores *MYCN* amplificados representam cerca de 40% dos neuroblastomas de alto risco (estadio 4), indicando que os outros 60% dos neuroblastomas de alto risco são tumores *MYCN* não amplificados. Entretanto, dentro dos tumores *MYCN* não amplificados, onde se espera

que o desfecho clínico seja mais favorável, cerca de 70 a 80% nem sempre evoluem para a cura e acabam evoluindo para óbito, independentemente da idade. NB de alto risco é especialmente dependente da manutenção dos telômeros (Yu et al., 2019). A disfunção telomérica é conhecida por causar instabilidade genômica, e em última análise, induzir a carcinogênese (Ye et al., 2017).

Walsh et al. (2016), demonstraram 6 variantes *ACYP2*, *CTC1*, *ZNF208*, *OBFC1*, *NAF1* e *RTEL1*, com predisposição genética para telômeros com comprimento alongados e com o aumento de risco para neuroblastoma *MYCN* amplificado, porém ainda não foi observado este estudo em *MYCN* não amplificado. Além disto, outras variantes associadas a estabilidade estrutural dos telômeros, como *ATRX*, podem estar envolvidas na agressividade do neuroblastoma *MYCN* não amplificado.

3. HIPÓTESE

As alterações em variantes teloméricas associadas, como *ACYP2*, *CTC1*, *ZNF208*, *OBFC1*, *NAF1*, *RTEL1* e *ATRX*, podem afetar o comprimento, a estabilidade e estrutura dos telômeros encontrados em pacientes com Neuroblastoma *MYCN* não amplificado estadio 4, ocasionando a progressão e um pior desfecho clínico nestes pacientes.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVOS GERAIS

Identificar variantes gênicas em pacientes com neuroblastoma *MYCN* não amplificado estadio 4, que possam estar associados ao aumento dos telômeros e pior prognóstico. Utilizar estes dados na construção de um painel gênico, auxiliando na identificação de variantes teloméricas, que poderão ser utilizadas como biomarcadores para o neuroblastoma *MYCN* não amplificado.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o comprimento dos telômeros de leucócitos dos pacientes com neuroblastoma *MYCN* não amplificado estadio 4, que evoluíram para um pior

prognóstico e foram a óbito. Comparar estes resultados com os dados obtidos dos controles (crianças saudáveis).

- Avaliar a presença das variantes *ACYP2*, *OBFC1*, *CTC1*, *ZNF208*, *NAF1*, *RTEL1* e *TERC* nos telômeros de leucócitos dos pacientes neuroblastoma *MYCN* não amplificado estadio 4, comparando-os com a população de crianças saudáveis. Avaliar a presença destas variantes na população brasileira saudável.
- Identificar outros genes envolvidos na estrutura dos telômeros, que possam atuar como biomarcadores para o desenvolvimento do pior prognóstico em neuroblastomas *MYCN* não amplificado.
- Identificar a presença de variantes de *ATRX* em amostras de tumor dos pacientes com neuroblastoma *MYCN* não amplificado estadio 4, com pior prognóstico, através do sequenciamento completo do exoma, que possam estar associados ao alongamento alternativo dos telômeros.

5. MÉTODOS

5.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO: Estudo Caso-Controle

5.2. CASUÍSTICA

Foram analisadas amostras de tumores e amostras de sangue periférico de 52 pacientes com neuroblastoma *MYCN* não amplificado estadio 4, tratados no Instituto de tratamento de Câncer Infantil (ITACI), entre 2014 a 2020. Entre os pacientes com neuroblastoma, 53% eram do sexo masculino e 47% do sexo feminino. A idade média entre eles foi de 27 meses (aproximadamente 2 anos de idade ao diagnóstico), o paciente mais jovem apresentou 1 mês de idade ao diagnóstico e o mais velho 168 meses (aproximadamente 14 anos ao diagnóstico). A mediana da idade dos pacientes foi de 20 meses. Neste estudo foi observado que 12 pacientes (23%), eram menores de um ano de idade. Entre os que apresentaram idade menor que um ano, 3/12 pacientes (25%) foram a óbito. A localização abdominal do tumor primário foi vista em 89% e a extra-abdominal em 11% dos casos.

Todos os pacientes e participantes controles deste estudo foram admitidos após assinarem um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ou Termo de Assentimento

7 a 12 anos e 13 a 18 anos, onde os pacientes e/ou responsáveis concordam em participar da pesquisa. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP, (CAAE:63283316500000065).

As amostras de DNA de sangue periférico utilizadas como controle, constituíram-se de 12 crianças aparentadas saudáveis (6 crianças com idade inferior ou igual a 18 meses e 6 crianças com idade superior a 18 meses).

5.2.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes diagnosticados com neuroblastoma *MYCN* não amplificado.
- Pacientes com neuroblastoma estadio 4.

5.2.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes com outros tipos de câncer.
- Pacientes diagnosticados com neuroblastoma *MYCN* amplificado em qualquer estadiamento e/ou *MYCN* não amplificado estadios 1, 2 e 3.

5.3. COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE E TUMORES DOS PACIENTES ESTUDADOS

Todas as amostras de sangue, tanto dos pacientes, quanto dos controles, foram colhidas em tubo PAXgene® Blood Tube (BD Biosciences, CA, USA) e posteriormente submetidas ao protocolo de extração de DNA, como sugerido pelo fabricante. As amostras do tecido tumoral obtidas através da ressecção cirúrgica ou biópsia dos pacientes durante exame de rotina para auxiliar o diagnóstico, foram imediatamente transferidas para nitrogênio líquido e estocadas a -80°C.

5.3.1. EXTRAÇÃO DE DNA

5.3.1.1. EXTRAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO

O isolamento de DNA genômico das amostras de sangue periférico foi realizado utilizando o kit de extração de DNeasy blood and tissue kit (Qiagen Inc, Hilden, Germany), conforme protocolo estabelecido pelo fabricante.

5.3.1.2. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE TUMORES

As amostras dos tumores, previamente armazenadas a -80°C , foram pulverizadas na presença de nitrogênio líquido no aparelho L 3 Leader (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil). O isolamento de DNA genômico dos tumores foi realizado utilizando o kit de extração de DNeasy blood and tissue kit (Qiagen Inc, Hilden, Germany), conforme protocolo estabelecido pelo fabricante.

5.3.1.3. QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A concentração do DNA foi determinada por meio de espectrofotômetro (Fragment Analyzer Qubit, USA). O DNA foi diluído em tampão TE (0,01mM ácido etilenodiamino tetracético e 10mM Tris HCl, pH 8,0) para $50\text{ng}/\mu\text{l}$ e armazenado a -20°C até o momento do uso.

5.4. DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO DOS TELÔMEROS DE LEUCÓCITOS

5.4.1. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE qPCR

Para elegermos o melhor gene endógeno e sua respectiva concentração ideal de oligonucleotídeo iniciador (*primer*), foram construídas matrizes, conforme descrito por Grun (2015), formada por diferentes concentrações dos iniciadores pesquisados, utilizando uma curva com diluição seriada de nossos controles. Para construirmos esta matriz de teste, estabelecemos uma diluição e a aplicamos a todos os nossos iniciadores, sendo que a maior concentração foi de 500nM e a menor de 50nM . A fim de evitarmos a amplificação de produtos inespecíficos, adicionamos um controle negativo para assegurar a qualidade da reação. Após definirmos um *threshold* para cada gene endógeno analisado, fizemos a eleição do melhor gene, que se deu pela análise da emissão de maior fluorescência detectada no menor Ct (*threshold cycle*).

Após analisarmos os resultados obtidos e aplicarmos os parâmetros pré-estabelecidos a matriz de teste, elegemos o gene endógeno *36B4* para este estudo e selecionamos a concentração ideal de cada um dos iniciadores, sendo esta 50nM para o iniciador senso e 50nM para o iniciador anti-senso. Igualmente, construímos uma matriz de teste com diferentes concentrações do iniciador para o nosso gene alvo (Telômero), na

qual fora selecionada, baseado nos critérios supracitados, a concentração ideal dos iniciadores senso e anti-senso foi 200nM e 500nM, respectivamente.

5.4.2. CURVA PADRÃO E QUALIDADE DAS REAÇÕES

Para obtermos uma quantificação relativa dos telômeros, foi estabelecida uma curva com diluição seriada das amostras controle (grupo de amostras de crianças saudáveis com idade inferior ou igual a 18 meses e grupo de amostras de crianças saudáveis com idade superior a 18 meses), tanto para telômeros como para o gene *36B4*, a partir de 4 pontos de diluições, descritas por Cawthon et al. (2002), seguindo uma diluição seriada de 1:5, iniciando em 20ng/μL e encerrando em 0,16ng/μL de concentração (Figura 1).

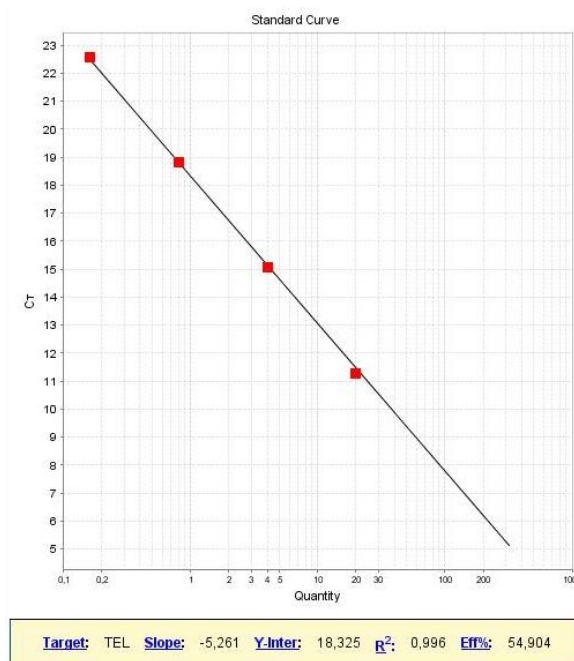


Figura 1. Estabelecimento de curva padrão para o gene alvo (Telômero) e sua respectiva eficiência (R^2 : 0,996). Curva obtida através de diluição seriada de amostras controle.

Consideramos a eficiência entre 90-100% para cada uma das reações, indicando que o material genético duplica adequadamente a cada ciclo e o coeficiente de regressão linear da curva padrão $R^2 \geq 0,996$. Resultados abaixo de 90% de eficiência não foram considerados neste estudo.

A análise para determinar o comprimento médio dos telômeros foi realizada nas amostras de DNA obtidas do sangue periférico dos pacientes em estudo. Todas as reações

foram realizadas em triplicata para garantia de maior segurança dos resultados e foi calculada a média entre as repetições de cada amostra. As triplicatas com diferença acima de $\geq 0,5$ ciclos limiar (CT) foram descartadas e repetidas.

A quantificação relativa do comprimento dos telômeros de leucócitos (CRTL) foi realizada tendo como base a utilização da tecnologia de SYBR® Green para quantificação das regiões de interesse conforme descrito por Delgado et al., 2018. Após amplificação das amostras controle, todas as reações apresentaram um único pico na curva de Melting, que demonstra a especificidade da reação com a amplificação de uma única região de interesse.

Para avaliarmos as diferenças no tamanho dos telômeros em razão do gene endógeno *36B4*, foi determinado valor de Ct, que representa o nível de fluorescência determinado pelo número de ciclos necessários para detectar o sinal da amplificação da amostra, permitindo correlacionar o aumento da fluorescência com a quantidade inicial do DNA. Após isso foi aplicado a equação mostrada a seguir para se chegar ao valor que representa o comprimento relativo dos telômeros em função da razão do gene endógeno.

5.4.3. DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO RELATIVO DOS TELÔMEROS DE LEUCÓCITOS

A determinação do CRTL foi calculada através da relação T / S (telômero / gene referência de cópia simples), como uma proporção do número de cópias repetidas do telômero, para o número de cópia do gene endógeno de cópia simples (*36B4*), onde T, representa a unidade de medida em nanogramas correspondente ao DNA da amostra analisada, utilizando-se do *primer* para telômero, dividido por S, correspondente ao DNA padrão do gene endógeno em cada amostra, de acordo com a seguinte equação descrita por Delgado et al. (2018):

$$T / S = \frac{2^{Ct \text{ telômero (referência)}} / 2^{Ct \text{ telômero (amostra)}}}{2^{Ct \text{ 36B4 (referência)}} / 2^{Ct \text{ 36B4 (amostra)}}$$

O resultado final relatado para uma amostra em uma determinada execução é a média de três valores T / S que representa o comprimento médio dos telômeros. As amostras com $T / S > 1,0$ têm um comprimento médio dos telômeros maior do que o do DNA padrão; as amostras com $T / S < 1,0$ têm um comprimento médio dos telômeros mais curto do que o DNA padrão. Como controle do tamanho de telômeros, foram utilizados DNAs de crianças saudáveis, como descrito em material e métodos.

5.5. VARIANTES GENÉTICAS UTILIZADAS NA CONTRUÇÃO DO PAINEL GÊNICO

Os DNAs de leucócitos obtidos de amostra de sangue periférico de pacientes com neuroblastoma *MYCN* não amplificado estadio 4 e amostras de DNAs controle (crianças saudáveis) foram utilizados para a construção de um painel gênico. O painel continha as seguintes variantes: *ACYP2* (rs11125529), *OBFC1* (rs9420907), *CTCI* (rs3027234), *ZNF208* (rs8105767), *NAF1* (rs7675998) e *RTEL1* (rs755017), como descrito por Walsh et al. (2016) e *MYNN* (rs10936599) e *TERC* (rs2293607) como descrito por Polat et al. (2019).

5.5.1. DESENHO E SEQUÊNCIA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

Para construção do painel foram desenhados os oligonucleotídeos iniciadores, com o auxílio do programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Para a análise da homologia com outras sequências foram utilizados Basic Local Alignment Search Tool (BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e o BLAST-like Alignment Tool (BLAST-<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>). A escolha dos iniciadores baseou-se no tamanho do transcrito, alguns genes apresentam mais de um transcrito. A especificidade dos pares de *primers* foi verificada usando a ferramenta UCSC In-Silico PCR no site UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>). Os fragmentos foram quantificados por PCR em tempo real com o kit KAPA Library Quantification kit (KAPA Biosystems). As bibliotecas normalizadas foram combinadas em igual volume e submetidas ao sequenciamento usando o kit MiSeq Reagent Kit v2 (300 cycle) -Illumina.

As análises de dados gerados foram realizadas com o auxílio de serviço de bioinformata do laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (*SELA*) da Rede PREMium (*SELA* - HCFMUSP). Como descrito no item 5.6.5.

As mutações patogênicas foram identificadas nos exons (não sinônimas) ou sítios de *splicing* ou *stopgain*, e com frequência alélica global na população de 0.1 As variantes e respectivos alelos encontradas também foram comparados com os dados que encontram-se nos bancos de dados públicos Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM) (Naslavsky et al., 2017) (<http://abraom.ib.usp.br>) e SELA (Lerario et al., 2020), para avaliar a frequência destas variantes na população brasileira. E, nos bancos

de dados públicos como 1000 genomas (<http://www.1000genomes.org/>) e FATHMM para a avaliação da patogenicidade.

5.6. IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES ASSOCIADAS AO ALONGAMENTO ALTERNATIVO DOS TELÔMEROS ATRAVÉS DA ANÁLISE DO EXOMA

Para identificar mutações em *ATRX* que podem estar associadas ao alongamento alternativo do tamanho dos telômeros, amostras de DNA dos tumores dos pacientes com neuroblastoma *MYCN* não amplificado estágio 4 foram sequenciados como descrito nos itens 5.6.1 ao 5.6.3. Os exomas foram analisados como descrito no item 5.6.5.

5.6.1. PREPARAÇÃO DA BIBLIOTECA

As preparações das bibliotecas para o sequenciamento das amostras de tumor dos pacientes, incluíram a fragmentação do DNA, adição de sequências do adaptador e do index e foram realizadas de acordo com o protocolo Nextera DNA Sample Preparation Kit (Illumina. San Diego. CA. USA), conforme orientações do fabricante.

5.6.2. QUANTIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA

Após a preparação das bibliotecas de DNA, as bibliotecas foram quantificadas e a concentração do DNA das amostras e dos controles foram determinadas por meio de espectrofotômetro (Fragment Analyzer Qubit, USA), conforme o protocolo fornecido pelo fabricante.

5.6.3. SEQUENCIAMENTO NA PLATAFORMA ILLUMINA HISEQ 2500

A metodologia de sequenciamento por síntese da plataforma Illumina HiSeq 2500, iniciou-se com a amplificação das bibliotecas de DNA ligados a superfície de uma célula (flow cell) na forma de pontes através da enzima DNA polimerase, que produziu múltiplas cópias da sequência original (*clusters*).

As bibliotecas foram reunidas, desnaturadas e diluídas a 12pM e submetidas a clusterização pelo TruSeq kit PE kitCluster v3 (Illumina) em uma estação de cluster C-bot (Illumina, CA, EUA). A clusterização baseia-se na ligação dos adaptadores presentes nas extremidades dos fragmentos das bibliotecas (P5 e P7), complementares aos que estão presentes na superfície da célula.

O ciclo de adição de nucleotídeo e aquisição de imagem foi repetido por 200 vezes, sendo assim foram sequenciados 100 nucleotídeos da extremidade do fragmento no sentido senso e 100 nucleotídeos no sentido antissenso, caracterizando uma corrida com extremidades pareadas (*paired end*) (2x100).

5.6.4. ANÁLISE DA QUALIDADE DOS READS E FILTRAGEM

As sequências obtidas do sequenciamento foram geradas no formato FASTQ, que continham a sequência de base nucleotídicas e a qualidade correspondente a cada base em um único arquivo.

5.6.5. ANÁLISE DOS DADOS - BIOINFORMÁTICA

As análises de dados gerados no painel e no exoma completo foram realizadas com o auxílio de serviço de bioinformata do laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (SELA) da Rede PREMium (SELA - HCFMUSP). Todas as mutações encontradas nos pacientes analisados foram submetidas a comparação destas mesmas variantes na literatura e em outros bancos de dados como 1000 genomas (1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org/>) e FATHMM para a avaliação da patogenicidade. As variantes encontradas nas amostras foram validadas pelas análises no IGV (Integrated Genome Browser) do próprio sequenciamento.

As variantes e respectivos alelos encontradas também foram comparados com os dados que encontram-se nos bancos de dados públicos Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM) (<http://abraom.ib.usp.br>) e SELA (Lerario et al., 2020), para avaliar a frequência destas variantes na população brasileira.

5.6.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para testarmos se as frequências genotípicas, observadas no grupo controle e no grupo de pacientes estavam correlacionadas, submetemos nossos resultados a análise de distribuição de dados e suas correlações, pelo método de Qui-quadrado, utilizando o programa estatístico Prism GraphPad7. O mesmo programa estatístico foi utilizado para realizarmos as análises comparativas, não paramétricas, entre os grupos analisados e casos controles, para verificar se havia significância estatística entre as diferenças de tamanhos dos telômeros dos mesmos, esperando observar um valor de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. COMPARAÇÃO ENTRE O COMPRIMENTO RELATIVO DOS TELÔMEROS DE LEUCÓCITOS (CRTL) DOS PACIENTES COM IDADE INFERIOR E SUPERIOR A 18 MESES E SOBREVIDA

No neuroblastoma, o CRTL é de em média 2.98 (1.92-4.62) (Telomeres Mendelian Randomization Study, 2017).

Para estabelecer o padrão de variabilidade do comprimento dos telômeros entre os grupos de pacientes, os mesmos foram divididos em 2 grupos:

- Grupo de pacientes com idade inferior ou igual a 18 meses e,
- Grupo de pacientes com idade superior a 18 meses.

Os tamanhos dos telômeros dos grupos foram comparados com o tamanho dos telômeros de crianças saudáveis na mesma faixa etária.

Os resultados mostraram que:

- O comprimento relativo dos telômeros-controles (crianças saudáveis) foi para crianças com idade inferior ou igual a 18 meses de em média 1,00 (0,98-1,03) e,
- O comprimento relativo dos telômeros-controles (crianças saudáveis) para crianças com idade superior a 18 meses, a média foi 0,89 (0,85-0,92).

Enquanto que, nos pacientes com idade inferior ou igual a 18 meses, o CRTL foi em média 2,94 (1,95-3,56), e para os pacientes com idade superior a 18 meses, o CRTL foi em média 2,92 (1,93-3,99). Não havendo diferença no tamanho relativo dos telômeros entre as idades destes pacientes.

Estes dados estão de acordo com os estudos randomizados mendelianos (Telomeres Mendelian Randomization Study, 2017), que sugerem que o alongamento do comprimento dos telômeros em neuroblastoma é de 2.98 (1.92-4.62) (Telomeres Mendelian Randomization Study, 2017; Codd et al., 2013 e Walsh et al., 2016).

Ao compararmos o comprimento relativo dos telômeros dos pacientes deste estudo com o tamanho do telômero de crianças saudáveis (controle), foi possível observar que as crianças com neuroblastoma, apresentaram um aumento no tamanho dos telômeros significativamente maior em relação ao controle na mesma faixa etária ($p < 0,0001$) (Gráficos 1 e 2).

Tamanho relativo do telômero em crianças com idade inferior ou igual a 18 meses

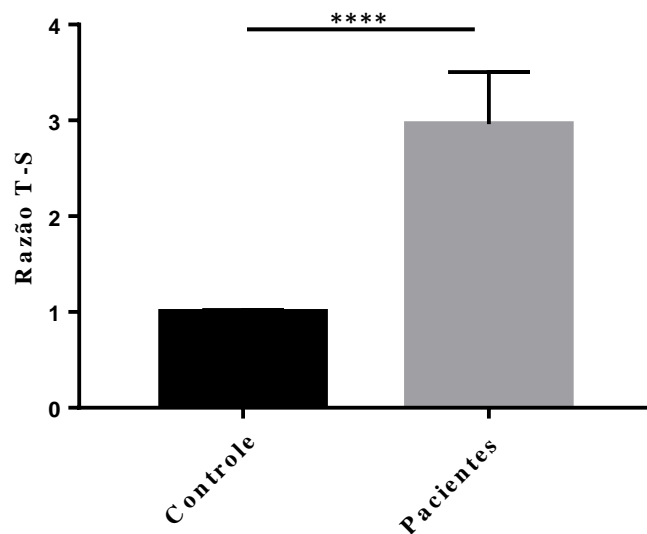


Gráfico 1. Comparação entre o tamanho relativo do telômero dos pacientes diagnosticados com neuroblastoma *MYCN* não amplificado estadio 4, com idade inferior ou igual a 18 meses ao diagnóstico e os casos controles de crianças saudáveis da mesma faixa etária.

Tamanho relativo do telômero em crianças com idade superior a 18 meses

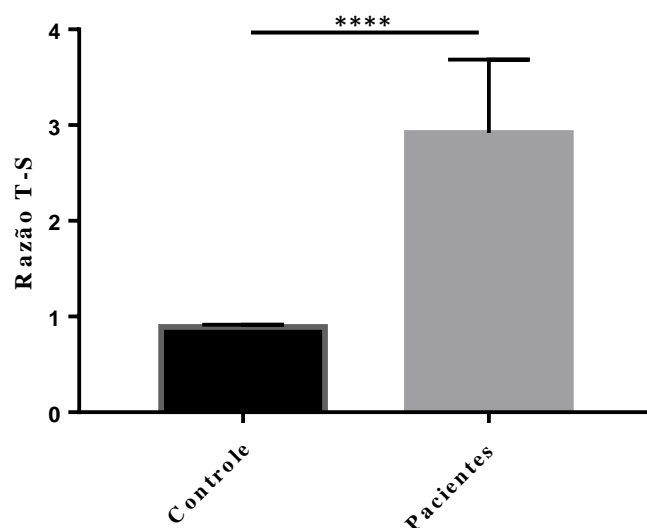


Gráfico 2. Comparação entre o tamanho relativo do telômero dos pacientes diagnosticados com neuroblastoma *MYCN* não amplificado estadio 4, com idade superior a 18 meses ao diagnóstico e os casos controles de crianças saudáveis da mesma faixa etária.

Também foram realizadas análises considerando desfecho clínico destes pacientes, considerando como “fora de terapia”, “óbito” e “em tratamento”.

Foram considerados pacientes “fora de terapia”, os pacientes que mantiveram sobrevida livre de doença após 5 anos. Os resultados mostraram que:

- Pacientes fora de terapia (16/52), representaram 31% dos casos;
- Pacientes que foram a óbito (11/52), representaram 21% dos casos e,
- Pacientes em tratamento (25/52), representaram 48% dos casos.

Os resultados mostraram ainda um aumento do CRTL médio de 2,97 (2,56-3,56), nos pacientes com idade inferior a 18 meses que foram a óbito. E, um aumento do CRTL médio 2,98 (2,39-3,99), nos pacientes com idade superior a 18 meses que foram a óbito. Também não foram observadas variações no tamanho dos telômeros em relação a idade e o desfecho óbito.

Em relação aos pacientes que recidivaram foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa em relação ao tamanho dos telômeros, quando comparado com os pacientes que permaneceram fora de terapia há mais de 5 anos ($p < 0,0001$) (Gráfico 3 e Tabela 3).

Tamanho relativo do telômero de pacientes em relação ao seu desfecho

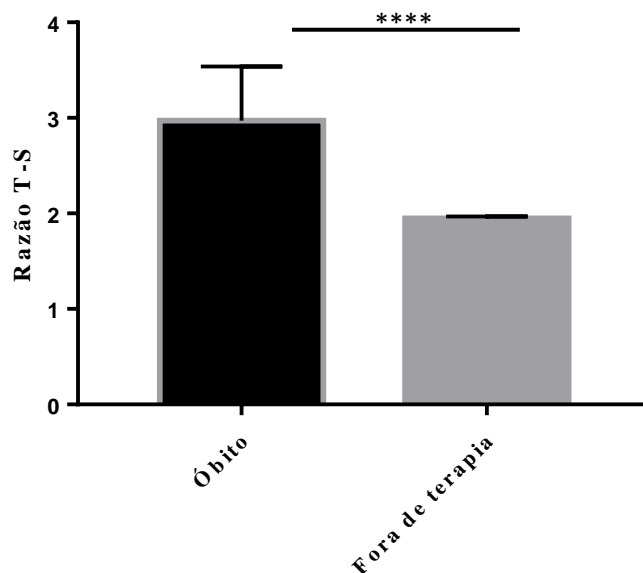


Gráfico 3. Tamanho relativo do telômero dos pacientes diagnosticados com neuroblastoma *MYCN* não amplificado estágio 4, recidivados que evoluíram para óbito em comparação aos pacientes diagnosticados com neuroblastoma *MYCN* não amplificado estágio 4, fora de terapia há mais de 5 anos.

Os pacientes que foram a óbito decorrente da doença, apresentaram tamanho relativo do telômero superior a 2 (Tabela 3). Um aumento do comprimento dos telômeros equivalente a um acréscimo de 131.8 pares de base, corroborando com achados de Walsh et al. (2016).

Tabela 3. Dados clínicos dos pacientes diagnosticados com neuroblastoma *MYCN* não amplificado estadio 4, recidivados

Caso	Estadio	Idade aproximada ao diagnóstico	Risco INSS	Gênero	Tamanho telômero	Desfecho
0 0 3	4	>18 meses	Alto	Masculino	>2.00	ÓBITO
0 1 1	4	>18 meses	Alto	Feminino	>2.00	ÓBITO
0 1 3	4	<18 meses	Alto	Masculino	>2.00	ÓBITO
0 1 5	4	<18 meses	Alto	Feminino	>2.00	ÓBITO
0 2 1	4	<18 meses	Alto	Feminino	>2.00	ÓBITO
0 3 2	4	>18 meses	Alto	Masculino	>2.00	ÓBITO
0 3 4	4	>18 meses	Alto	Feminino	>2.00	ÓBITO
0 3 5	4	>18 meses	Alto	Feminino	>2.00	ÓBITO
0 4 1	4	>18 meses	Alto	Feminino	>2.00	ÓBITO
0 4 2	4	<18 meses	Alto	Masculino	>2.00	ÓBITO
0 4 8	4	<18 meses	Alto	Feminino	>2.00	ÓBITO

6.2. IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES *ACYP2*, *OBFC1*, *CTC1*, *ZNF208*, *NAF1* E *RTEL1* NOS PACIENTES COM NEUROBLASTOMA *MYCN* NÃO AMPLIFICADO

Estas variantes estão associadas a predisposição genética para telômeros mais longos e risco de desenvolvimento de neuroblastoma *MYCN* amplificado (Walsh et al.2016). Para análise da presença destas variantes nos pacientes com *MYCN* não amplificados, foi construído um painel genômico com estas variantes, e analisados com as amostras de DNA de sangue periférico dos pacientes com neuroblastoma *MYCN* não amplificado e com controles (amostras de DNA de sangue periférico de 12 crianças saudáveis).

Os resultados mostraram que 52/52 (100%) dos pacientes apresentaram um ou mais dos seguintes SNPs: 10/52 (19%) *ACYP2*, 49/52 (94%) *NAF1*, 44/52 (85%) *OBFC1*, 16/52 (31%) *CTC1*, 25/52 (48%) *ZNF208* e 12/52 (23%) *RTEL1*. Não foi observada a presença destas variantes nas amostras dos controles analisados.

Apesar da coorte deste estudo contar apenas com 52 pacientes com neuroblastoma *MYCN* não amplificado, no Brasil, a incidência do neuroblastoma é entorno de 7 a 12 casos por milhão até 15 anos, alcançando estimativa de 7,3 casos /milhão. (Ribeiro, 2014). Foram realizadas análises para avaliar a baixa frequência destas variantes na população brasileira, utilizando-se os dados dos bancos genômicos da população brasileira SELA (Lerario et al 2020) e AbraOm (Naslavsky et al 2017), além do banco de dados genômicos referência 1000genomas (Tabela 4).

Nesta análise foi possível observar que as frequências das variantes, *CTC1* e *RTEL1*, foram estatisticamente significativas, quando comparadas aos bancos genômicos da população brasileira saudável (SELA e AbraOm) e do banco genômico de referência 1000genomas ($p < 0,05$), sugerindo que as variantes *CTC1* e *RTEL1*, podem ser utilizadas como preditoras de neuroblastoma na população brasileira.

TABELA 4. FREQUÊNCIA DAS VARIANTES GERMINATIVAS: ACYP2, OBFC1, CTC1, ZNF208, NAF1, RTEL1 NA POPULAÇÃO SAUDÁVEL E EM PACIENTES COM NEUROBLASTOMA

Variantes	dbSNP	1000 Genomes	SELA	aBraOM	coorte ITACI (n=52)	P
<i>ACYP2</i>	rs11125529	0.132788	0.19	< 0,2472
<i>NAF1</i>	rs7675998	0.806909	0.94	< 0,0032
<i>OBFC1</i>	rs942097	0.777157	0.85	< 0,1493
<i>CTC1</i>	rs3027234	0.097441	0.170165	0.188679	0.31	< 0,0205
<i>ZNF208</i>	rs8105767	0.386781	0.48	< 0,1532
<i>RTEL-1</i>	rs755017	0.265176	0.123104	0.138752	0.23	< 0,0407

Não foi possível observar a presença das demais variantes na coorte estudada, provavelmente por apresentarem uma frequência ainda menor, além do número de amostras deste estudo ser muito pequena. Esta análise deverá ser repetida futuramente com um número maior de amostras.

6.3. IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES *TERC* e *MYNN* NOS PACIENTES COM NEUROBLASTOMA

Neste estudo também foram identificadas, através do painel genômico, as variantes *MYNN* (rs10936599) em 10/52 (19%) e *TERC* (rs2293607) em 12/52 (23%) dos pacientes analisados.

Estes pacientes apresentavam aumento do CRTL médio 2,14 (1,98-2,50), sendo 50% pacientes do sexo feminino e os outros 50% do sexo masculino, com idades média ao diagnóstico de 33,6 (4-96).

Os nossos resultados mostraram a presença da variante *TERC* rs2293607, com troca de uma timina por uma citosina, que está localizado na posição jusante (*downstream*) região do cromossomo humano 3q26.2.

Esta mutação é classificada como exon de um transcrito de RNA não codificante no Genome Wide Association Studies (GWAS), e está associada ao aumento do tamanho do telômero e o risco do desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, como: câncer de colorretal, adenomas, ovário e bexiga (Polat et al., 2019, Rode et al., 2016; Jones et al., 2012).

A variante rs10936599, apresentou uma mutação pontual com a substituição no exon 2 de uma citosina por uma timina na posição 18 do nucleotídeo do gene *MYNN*. Esta mutação causa uma variante sinônima His6His, e foi descrita como patogênica pelo banco de dados genômico FATHMM, com uma frequência de 0,1. Sendo encontrada também em adenocarcinoma colorretal (Cosmics (COSV57753828) (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

Entretanto, quando estas variantes foram analisadas quanto a baixa frequência na população brasileira, utilizado-se os bancos de dados genômicos (SELA, AbraOm e 1000genomas), não apresentaram uma frequência estatisticamente significativa comparadas com as frequências destes bancos ($p > 0,05$) (Tabela 5).

Estes resultados sugerem estas variantes não podem ser utilizadas como preditoras da doença na população brasileira.

TABELA 5. FREQUÊNCIA DAS VARIANTES TERC E MYNN NA POPULAÇÃO SAUDÁVEL E EM PACIENTES COM NEUROBLASTOMA

Variante	dbSNP	1000 Genomes	SELA	aBraOM	coorte ITACI (n=52)	P
<i>TERC</i>	rs10936599	0.269768	0.197605	0.231908	0.19	< 0,9240
<i>MYNN</i>	rs10936599	0.270567	0.214953	0.234811	0.23	< 0,8158

6.4. ALONGAMENTO ALTERNATIVO DO COMPRIMENTO DOS TELÔMEROS E MUTAÇÕES EM *ATR*X

*ATR*X é uma proteína remodeladora da cromatina, cuja principal função é a deposição da variante histona H3.3. As mutações *ATR*X são amplamente distribuídas em vários tipos de câncer e se correlacionam com o desenvolvimento do alongamento alternativo dos telômeros (ALT), além de afetarem outras funções celulares relacionadas a regulação epigenética (Haase et al., 2018). O complexo *ATR*X/*DAX*X está envolvido no recrutamento de histona H3.3 para telômeros, e a perda da função *ATR*X resulta em desrepressão da transcrição telomérica.

Neste estudo, foram identificados através do sequenciamento do exoma dos tumores dos 52 pacientes, 2 casos de crianças com mutações em *ATR*X. Caso 034 e caso 011, que podem estar associados ao alongamento alternativo dos telômeros. As duas pacientes tinham idades superiores a 5 anos. Alterações no *ATR*X e pacientes com idades acima de 5 anos estão associadas ao ALT. (Cheung et al.2012).

Caso 034, paciente do gênero feminino, com idade ao diagnóstico aos 168 meses de idade, tumor abdominal de estadio 4, foi a óbito com rápida progressão da doença durante o tratamento do tumor primário. Os telômeros apresentava o tamanho relativo de 3,99. Esta paciente apresentou mutações somáticas deletérias patogênicas no gene *ATR*X: uma mutação nonframeshift em *ATR*X no exon 15 em c.4377_4379delGGA (p.E1464del) e uma mutação stopgain em *ATR*X no exon 18 c.T4838A:p.Leu1613X. Estas mutações levam a uma alteração no transcrito deste gene, criando uma mutação stop códon. Estas variantes ainda não foram descritas em nenhum tipo de câncer e não apresenta frequência descrita no banco de dados genômico 1000genomas.

Caso 011, paciente do gênero feminino, com idade ao diagnóstico aos 68 meses de idade, tumor abdominal de estadio 4, também foi a óbito durante o tratamento do tumor

primário. Os telômeros apresentavam o tamanho relativo de 3,04. Esta paciente apresentou 2 mutações somáticas não sinônimas em *ATRX*: uma no exon 13 c.A4199T:p.Gln1400Leu, a mudança de glutamina por uma na leucina na posição 1400 do nucleotídeo. Esta mutação foi classificada como incerta pelo banco de dados de variantes Clinvar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) e a outra no exon 9 c.G1366A:p.Asp456Asn. Esta mudança de sequência substitui o ácido aspártico por asparagina no códon 456 da proteína *ATRX* (p.Asp456Asn). O resíduo de ácido aspártico é moderadamente conservado e há uma pequena diferença físico-química entre o ácido aspártico e a asparagina. Esta variante está presente em bancos de dados populacionais (rs782313786, ExAC 0,004%), incluindo pelo menos um indivíduo homocigoto e/ou heterocigoto. Essa variante ainda não foi relatada na literatura em indivíduos com condições relacionadas a *ATRX*. Esta variante foi classificada como uma variante de significância incerta, pelo Clinvar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

7. DISCUSSÃO

Neuroblastoma é um câncer infantil proveniente do desenvolvimento do sistema nervoso simpático, com comportamento clínico que varia de regressão espontânea a progressão tumoral implacável e fatal, apesar da terapia intensiva multimodal (Lee et al., 2020).

Os telômeros são cruciais para a sobrevivência das células cancerosas. Nos tumores, as células são capazes de manter seus telômeros, permitindo potencial proliferativo infinito. Os estudos randomizados mendelianos (Telomeres Mendelian Randomization Study, 2017), sugerem que o alongamento do comprimento dos telômeros em neuroblastoma é de 2.98 (1.92-4.62) (Telomeres Mendelian Randomization Study, 2017; Codd et al., 2013 e Walsh et al., 2016). Estes aumentos equivalem a um acréscimo de 131.8 pares de base no telômero, como descrito por Walsh et al. (2016).

Os dados dos tamanhos relativos dos telômeros de pacientes diagnosticados com neuroblastoma *MYCN* não amplificado estadio 4, apresentados neste estudo, demonstraram que estão 1,5 vezes aumentados em relação ao controle.

Os resultados também sugerem que independente da idade, pacientes com telômeros mais alongados tem maior propensão a desenvolver um pior prognóstico, em relação a pacientes com telômeros menos alongados.

Ohali et al. (2006) relataram uma estreita associação entre o comprimento do telômero e prognóstico do NB: quanto maior o comprimento do telômero, pior o prognóstico. Mesmo em pacientes de alto risco, sem progressão de 5 anos, a sobrevivência com telômeros mais curtos foi de 86%, contra 36% dos pacientes com telômeros maior ($p = 0,04$) (Duan et al., 2018).

Estudos de Randomização Mendeliana indicaram uma associação entre as variantes teloméricas (*ACYP2*, *NAF1*, *OBFC1*, *CTC1*, *ZNF208* e *RTEL1*), com predisposição genética para telômeros mais longos e risco de desenvolvimento de neuroblastoma *MYCN* amplificado (Walsh et al., 2016). Os resultados apresentados neste estudo, demonstram que 52/52 (100%) dos pacientes previamente diagnosticados com neuroblastoma *MYCN* não amplificados, apresentaram um ou mais dos seguintes SNPs: 10/52 (19%) *ACYP2*, 49/52 (94%) *NAF1*, 44/52 (85%) *OBFC1*, 16/52 (31%) *CTC1*, 25/52 (48%) *ZNF208* e 12/52 (23%) *RTEL1*. Todos os pacientes que apresentaram estas variantes tinham telômeros relativos próximos a 2. Os pacientes com idade inferior ou igual a 18 meses, o CRTL foi em média 2,94 (1,95-3,56), e para os pacientes com idade superior a 18 meses, o CRTL foi em média 2,92 (1,93-3,99). Não havendo diferença no tamanho relativo dos telômeros entre as idades destes pacientes.

Apesar da nossa coorte ser menor do que a descrita no estudo de Walsh et al. (2016), foi possível observar que as variantes *CTC1* e *RTEL1*, com frequências de 0,31 e 0,23, respectivamente, podem ser indicadores de risco para o desenvolvimento de neuroblastoma na população brasileira. A prevalência na população europeia de indivíduos com a predisposição para neuroblastoma que apresentam um ou mais variantes descritas acima foi inferior a 1% (Zhang et al., 2004; Walsh et al., 2016), demonstrando a importância destes marcadores genéticos.

As demais variantes observadas por Walsh et al. (2016) não apresentaram relevância estatística significativa na coorte do presente estudo. Um estudo com uma coorte maior será necessária para analisar a presença das demais variantes na população brasileira.

Neste estudo foram também identificadas, através do painel gênico, as variantes *MYNN* (rs10936599) em 12/52 (23%) e *TERC* (rs2293607) em 10/52 (19%) das amostras de sangue dos pacientes estudados. O alelo rs10936599 foi associado ao aumento do risco de adenomas colorretais, ovário e bexiga (Polat et al., 2019, Rode et al., 2016; Jones et al., 2012).

Estes pacientes apresentavam um aumento no comprimento de seus telômeros, com tamanho médio de 2,14 (1,98-2,50). Portadores do alelo comum no SNP rs10936599 (*MYNN*), próximo ao componente de RNA da telomerase rs2293607 (*TERC*) locus, tem telômeros significativamente mais longos. Análises demonstraram que o SNP rs2293607 (*TERC*), foi fortemente correlacionado com rs10936599 (*MYNN*). As variantes rs10936599 (*MYNN*) e rs2293607 (*TERC*), estão localizados na região *upstream* do cromossomo humano 3q26.2. Além disto, estas variantes presentes em menos de 5% dos indivíduos, são consideradas como de baixa frequência e associados com um grande número de desordens Mendelianas raras (Gibson, 2012).

Entretanto, apesar do tamanho dos telômeros e a baixa frequência destas variantes em relação aos bancos de dados da população brasileira (SELA e AbraOM), não foi estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$). Desta forma, as variantes rs10936599 (*MYNN*) e rs2293607 (*TERC*), não podem ser utilizadas como biomarcadores de um potencial fator de risco de neuroblastoma na população brasileira.

A maioria dos casos de neuroblastoma de alto risco, estão relacionados a mutações em *MYCN*, *ATRX* e *TERT*, estes genes promovem a ativação de um mecanismo de manutenção alternativa do telômero (ALT) (George et al, 2020a,b). Entretanto, alguns estudos demonstraram que pacientes com neuroblastoma, sem amplificação de *MYCN*, associados a neuroblastoma desfavorável em crianças com idades acima de 5 anos, preservam o comprimento do telômero na ausência de telomerase, por meio de proteínas de ligação aos telômeros e alongamento alternativo dos telômeros (ALT) (Cheung et al., 2012; Hajj et al., 2017).

Neste estudo, foram identificadas através do sequenciamento do exoma, 4 mutações somáticas em *ATRX*, que levaram a uma alteração no transcrito deste gene, interrompendo a atividade da proteína *ATRX*. Estas crianças apresentavam idades superiores a 5 anos ao diagnóstico e telômeros aumentados. Estas mutações podem estar associadas ao alongamento alternativo do telômero, como descrito por Cheung et al 2012. Todas estas crianças que apresentaram este tipo de mutação somática foram a óbito.

8. CONCLUSÃO

Apesar de estudos adicionais com coortes maiores de pacientes serem necessários para validar estes resultados, os dados apresentados neste estudo sugerem que a associação de variantes relacionadas ao tamanho alongado dos telômeros *CTCI* e *RTEL1*, descrita por Walsh et al. (2016), podem ser utilizadas como preditores para o desenvolvimento do Neuroblastoma *MYCN* não amplificado na população brasileira.

As variantes encontradas em *ATRX* identificadas neste estudo poderão ser utilizadas como biomarcadores de prognóstico para Neuroblastoma de Alto risco *MYCN* não amplificado. A análise de mutações no gene *ATRX* em crianças, será útil para identificar prospectivamente crianças com probabilidade de desenvolver neuroblastoma crônico.

9. REFERÊNCIAS

- Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev cancer*. 2003;3(3):203-216.
- Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-337.
- Cartum J. Neuroblastoma: o enigmático tumor da infância. *Pediatria moderna*. 2012;48(8):296-301.
- Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(10):e47.
- Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet*. 2010;11(5):319-30.
- Cheung NKV, Zhang J, Lu C, Parker M, Bahrami A, Tickoo SK, Heguy A, Pappo AS, Federico S, Dalton J, Cheung IY, Ding L, Fulton R, Wang J, Chen X, Becksfort J, Wu J, Billups CA, Ellison D, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Dyer MA, St Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project. Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. *JAMA*, 2012;307(10):1062-1071.
- Codd V, Mangino M, Harst PVD, Braund PS, Kaiser M, Beveridge AJ, Rafelt S, Moore J, Nelson C, Soranzo N, Zhai G, Valdes AM, Blackburn H, Leach IM, Boer RAD, Kimura M, Aviv A, WTCCC, Goodall AH, Ouwehand W, Veldhuisen DJV, Gilst WHV, Navis G, Burton PR, Tobin MD, Hall AS, Thompson JR, Spector T, Samani NJ. Common variants near *TERC* are associated with mean telomere length. *Nat Med*. 2010;42(3):197-199.
- Codd V, Nelson CP, Albrecht E, Mangino M, Deelen J, Buxton JL, Hottenga JJ, Fischer K, Esko T, Surakka I, Broer L, Nyholt DR, Leach IM, Salo P, Hägg S, Matthews MK, Palmén J, Norata GD, O'Reilly PF, Saleheen D, Amin N, Balmforth AJ, Beekman M, Boer RA, Böhringer S, Braund PS, Burton PR, Craen AJM, Denniff M, Dong Y, Douroudis K, Dubinina E, Eriksson JG, Garlaschelli K, Guo D, Hartikainen AL, Henders AK, Houwing-Duistermaat JJ, Kananen L, Karssen LC, Kettunen J, Klopp N, Lagou V, Van Leeuwen EM, Madden PA, Mägi R, Magnusson PKE, Männistö S, McCarthy MI, Medland SE, Mihailov E, Montgomery GW, Oostra BA, Palotie A, Peters A, Pollard H,

Pouta A, Prokopenko I, Ripatti S, Salomaa V, Suchiman HED, Valdes AM, Verweij N, Viñuela A, Wang X, Wichmann HE, Widen E, Willemsen G, Wright MJ, Xia K, Xiao X, Van Veldhuisen DJ, Catapano AL, Tobin MD, Hall AS, Blakemore AIF, Van Gilst WH, Zhu H, CARDIoGRAM consortium; Erdmann J, Reilly MP, Kathiresan S, Schunkert H, Talmud PJ, Pedersen NL, Perola M, Ouwehand W, Kaprio J, Martin NG, Van Duijn CM, Hovatta I, Gieger C, Metspalu A, Boomsma DI, Jarvelin MR, Slagboom PE, Thompson JR, Spector TD, Van Der Harst P, Samani NJ. Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nat Genet.* 2013;45(4):422-427.

Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, Iehara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK, INRG Task Force. The international neuroblastoma risk group (INRG) classification system: an INRG task force report. *J Clin Oncol.* 2009;27(2):289-97.

Cotterill SJ, Pearson AD, Pritchard J, Foot AB, Roald B, Kohler JA, Imeson J. Clinical prognostic factors in 1277 patients with neuroblastoma: results of European Neuroblastoma Study Group "Survey" 1982-1992. *Eur J Cancer.* 2000;36(7):901-908.

Delgado DA, Zhang C, Chen LS, Gao J, Roy S, Shinkle J, Sabarinathan M, Argos M, Tong L, Ahmed A, Islam T, Rakibuz-Zaman M, Sarwar G, Shahriar H, Rahman M, Yunus M, Jasmine F, Kibriya MG, Ahsan H, Pierce B. Genome-wide association study of telomere length among South Asians identifies a second *RTEL1* association signal. *J Med Genet.* 2018;55(1):64-71.

Duan XF, Zhao Q. *TERT*-mediated and *ATRX*-mediated Telomere Maintenance and Neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2018;40(1):1-6.

Farooqi AS, Dagg RA, Choi LM, Shay JW, Reynolds CP, Lau LMS. Alternative lengthening of telomeres in neuroblastoma cell lines is associated with a lack of MYCN genomic amplification and with p53 pathway aberrations. *J Neurooncol.* 2014;119(1):17-26.

George SL, Lorenzi F, King D, Hartlieb S, Campbell J, Pemberton H, Toprak UH, Barker K, Tall J, Costa BMD, Boogaard MLVD, Dolman MEM, Molenaar JJ, Bryant HE, Westermann F, Lord CJ, Chesler L. Therapeutic vulnerabilities in the DNA damage response for the treatment of *ATRX* mutant neuroblastoma. *EBioMedicine.* 2020a;59:102971.

George SL, Parmar V, Lorenzi F, Marshall LV, Jamin Y, Poon E, Angelini P, Chesler L. Novel therapeutic strategies targeting telomere maintenance mechanisms in high-risk neuroblastoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020b;6:39(1):78.

Gibson G. Rare and common variants: twenty arguments. *Review Nat Rev Genet*. 2012;13(2):135-145.

Grun LK. *Padronização da técnica de PCR em tempo real para a determinação do comprimento relativo de telômeros em diferentes desordens associados ao envelhecimento* [dissertação]. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2015.

Gu Y, Yu C, Miao L, Wang L, Xu C, Xue W, Du J, Yuan H, Dai J, Jin G, Hu Z, Ma H, Shen H. Telomere length, genetic variants and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck in Southeast Chinese. *Sci Rep*. 2016;6:20675.

Haase S, Garcia-Fabiani MB, Carney S, Altshuler D, Núñez FJ, Méndez FM, Núñez F, Lowenstein PR, Castro MG. Mutant *ATRX*: uncovering a new therapeutic target for glioma. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(7):599-613.

Hajj JE, Garsuault D, Bouyer C, Nguyen E, Hilal G, Ségal-Bendirdjian E. *Telomeres and telomerase in neuroblastoma. Neuroblastoma: current state and recent updates*. France. Chandrika Gowda. 2017.

Heaphy CM, Wilde RF, Jiao Y, Klein AP, Edil BH, Shi C, Bettgowda C, Rodriguez FJ, Eberhart CG, Hebbar S, Offerhaus GJ, McLendon R, Rasheed BA, He Y, Yan H, Bigner DD, Oba-Shinjo SM, Marie SKN, Riggins GJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Hruban RH, Maitra A, Papadopoulos N, Meeker AK. Altered telomeres in tumors with *ATRX* and *DAXX* mutations. *Science*. 2011;333(6041):425.

Heeg S. Variations in telomere maintenance and the role of telomerase inhibition in gastrointestinal cancer. *Pharmgenomics Pers Med*. 2015;8:171-180.

Hertwig F, Peifer M, Fischer M. Telomere maintenance is pivotal for high-risk neuroblastoma. *Cell Cycle*. 2016;15(3):311-312.

Hukezalie KR, Wong JM. Structure-function relationship and biogenesis regulation of the human telomerase holoenzyme. *FEBS J*. 2013;280(14):3194-3204.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER: INCA, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br>. Acesso em: 20 dez. 2020.

Izbicki T, Mazur J, Izbicka E. Epidemiology and etiology of neuroblastoma: an overview. *Anticancer Res.* 2003;23(1B):755-760.

Jones AM, Beggs AD, Carvajal-Carmona L, Farrington S, Tenesa A, Walker M, Howarth K, Ballereau S, Hodgson SV, Zauber A, Bertagnolli M, Midgley R, Campbell H, Kerr D, Dunlop MG, Tomlinson IPM. *TERC* polymorphisms are associated both with susceptibility to colorectal cancer and with longer telomeres. *Gut.* 2012;61(2), 248–254.

Kaneko Y, Knudson A. Mechanism and relevance of ploidy in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000;29(2):89-95.

Kuzyk A, Gartner J, Mai S. Identification of neuroblastoma subgroups based on three-dimensional telomere organization. *Transl Oncol.* 2016;9(4):348-356.

Lerario AM, Mohan DR, Montenegro LR, 1, Funari MFA, Nishi MY, Narcizo AM, Benedetti AFF, Oba-Shinjo SM, Vitorino AJ, Santos RASX, Jorge AAL, Onuchic LF, Marie SKN, Mendonca BB. SELAdb: A database of exonic variants in a Brazilian population referred to a quaternary medical center in São Paulo. *Clinics.* 2020;75:e1913.

Look AT, Hayes FA, Nitschke R, McWilliams NB, Green AA. Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1984;311(4):231-235.

Naslavsky MS, Yamamoto GL, Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, Bozoklian D, Sandberg TOM, Brito LA, Lazar M, Bernardo DV, Amaro-Junior E, Duarte YAO, Lebrão ML, Passos-Bueno MR, Zatz M. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat.* 2017;38(7):751-763.

Ohali A, Avigad S, Ash S, Goshen Y, Luria D, Feinmesser M, Zaizov R, Yaniv I. Telomere length is a prognostic factor in neuroblastoma. *Cancer.* 2006;107(6):1391-1399.

Oppel F, Tao T, Shi H, Ross KN et al. Loss of *ATRX* cooperates with p53-deficiency to promote the development of sarcomas and other malignancies. *PLoS Genet.* 2019;15(4):e1008039.

Polat F, Yilmaz M, Diler SB. The association of MYNN and *TERC* gene polymorphisms and bladder cancer in a turkish population. *Urol J*. 2019;16(1):50-55.

Ribeiro RC. *Perfil genômico dos tumores adrenais pediátricos* [tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2014.

Rice C, Skordalakes E. Structure and function of the telomeric CST complex. *Comput Struct Biotechnol J*. 2016;14:161-167.

Rode L, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Long telomeres and cancer risk among 95568 individuals from the general population. *Int J Epidemiol*. 2016;45(5):1634-1643.

Russo A, Modica F, Guarrera S, Fiorito G, Pardini B, Viberti C, Allione A, Critelli R, Bosio A, Casetta G, Cucchiara G, Destefanis P, Gontero P, Rolle L, Zitella A, Fontana D, Frea B, Vineis P, Sacerdote C, Matullo G. Shorter leukocyte telomere length is independently associated with poor survival in patients with bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(11):2439-2446.

Santos TAP. *Neuroblastoma: anjo e demônio da oncologia pediátrica* [dissertação]. Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto; 2011.

Sethi I, Sharma V, Sharma I, Singh G, Bhat GR, Bhanwer AJS, Sharma S, Rai E. Telomere Maintenance Genes are associated with Type 2 Diabetes Susceptibility in Northwest Indian Population Group. *Sci Rep*. 2020;10(1):6444.

Slagboom PE, Droog S, Boomsma DI. Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am J Hum Genet*. 1994;55(5):876-882.

Telomeres Mendelian Randomization Study. Association between telomere length and risk of cancer and non-neoplastic diseases: a mendelian randomization study. *JAMA Oncol*. 2017;3(5):636-651.

Walsh KM, Codd V, Smirnov IV, Rice T, Decker PA, Hansen HM, Kollmeyer T, Kosel ML, Molinaro AM, McCoy LS, Bracci PM, Cabriga BS, Pekmezci M, Zheng S, Wiemels JL, Pico AR, Tihan T, Berger MS, Chang SM, Prados MD, Lachance DH, O'Neill BP, Sicotte H, Eckel-Passow JE, Engage Consortium Telomere Group, Harst PVD, Wiencke JK, Samani NJ, Jenkins RB, Wrensch MR. Variants near *TERT* and *TERC* influencing telomere length are associated with high-grade glioma risk. *Nat Genet*. 2014;46(7):731-735.

Walsh KM, Whitehead TP, Smith AJ, Smirnov IV, Park M, Endicott AA, Francis SS, Codd V, ENGAGE Consortium Telomere Group; Samani NJ, Metayer C, Wiemels JL. Common genetic variants associated with telomere length confer risk for neuroblastoma and other childhood cancers. *Carcinogenesis*. 2016;37(6):576-582.

Ye G, Tan N, Meng C, Li J, Jing L, Yan M, Jin T, Chen F. Genetic variations in *TERC* and *TERT* genes are associated with lung cancer risk in a Chinese Han population. *Oncotarget*. 2017;8(66):110145-110152.

Yu EY, Cheung IY, Feng Y, Rabie MO, Roboz GJ, Guzman ML, Cheung NKV, Lue NF. Telomere trimming and DNA damage as signatures of high risk neuroblastoma. *Neoplasia*. 2019;21(7):689-701.