

**ESTUDO GENÔMICO DO TUMOR  
EMBRIONÁRIO HEPATOBLASTOMA**

**TALITA FERREIRA MARQUES AGUIAR**

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente  
para a obtenção do título de Doutor em Ciências  
Área de Concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra. Ana Cristina Victorino  
Krepischi**

**São Paulo  
2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Aguiar, Talita Ferreira Marques

**Estudo genômico do tumor embrionário hepatoblastoma** / Talita Ferreira Marques Aguiar – São Paulo, 2019.

247p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Ana Cristina Victorino Krepschi

Descritores: 1. Hepatoblastoma/Hepatoblastoma. 2. Neoplasias Hepáticas/genética /Liver Neoplasms/genetic. 3. Neoplasias Hepáticas/fisiopatologia/Liver Neoplasms/physiopathology. 4. Genômica/Genomics. 5. Mutação/genética/Mutation/genetic. 6. Sequenciamento Completo do Exoma/Whole Exome Sequencing. 7. Quimiocina CX3CL1/Chemokine CX3CL1. 8. Via de Sinalização Wnt/Wnt Signaling Pathway. 9. Gene CEP164/ CEP164 gene. 10. Assinatura mutacional/mutation signature 11. Síndrome/Syndrome. 12. Tumor embrionário/ Embryonal tumor.

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) concedido à aluna Talita Ferreira Marques Aguiar (Nível Doutorado direto - 2016/04785-0 e BEPE 2017/11212-0) e à orientadora (FAPESP CEPID - *Human Genome and Stem Cell Research Center* - 2013/08028-1).

*“The important thing in Science is not so much to obtain new facts as to discover new ways of thinking about them.”*

Sir William Henry Bragg

"O jovem que quer ser cientista – e à ciência dedicar todo o seu tempo e amor – tem pelo menos três certezas: a de que morrerá um dia (como todo mundo), a de que não ficará rico (como quase todo mundo) e a de que se divertirá muito (como pouca gente)"

Newton Freire-Maia

*“Nothing is easier than to admit in words the truth of the universal struggle for life, or more difficult-at least I have found it so-than constantly to bear this conclusion in mind.”*

Charles Darwin

*“If you want real peace in the world, start with children. In a gentle way, you can shake the world.”*

Mahatma Gandhi

“Viver é acalentar sonhos e esperanças, fazendo da fé a nossa inspiração maior. É buscar nas pequenas coisas, um grande motivo para ser feliz!”

Mário Quintana

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho é resultado da colaboração preciosa de diversas pessoas.

Aos “pequenos grandes” pacientes e seus responsáveis, meu agradecimento pela participação na pesquisa, e principalmente por me lembrarem os verdadeiros motivos para este trabalho ser desenvolvido; que sua fé, força e coragem sempre sirvam de inspiração para construirmos uma sociedade melhor.

À minha orientadora Dra. Ana C. V. Krepischi, pela incansável paciência, pelos ensinamentos, pelo rigor, pela disponibilidade, pelos exemplos e por todas as oportunidades de crescimento, meu muito obrigada.

Às minhas colegas do grupo de pesquisa em tumores pediátricos. À Maria Prates, por nossas intermináveis conversas amenizando as horas de trabalho, por todas as nossas discussões científicas “mirabolantes” e principalmente pela ajuda com os experimentos de expressão gênica. À Juliana Sobral, pela disponibilidade, pela companhia e também pelas sugestões ao longo do projeto. À Anne Barbosa, pela ajuda com os manuscritos preparados neste último ano e também pelas análises dos exomas germinativos.

Ao laboratório de Genética Humana do Instituto de Biociências da USP. À Dra Carla Rosenberg, pelas incontáveis e valiosas sugestões ao longo do estudo e pela infra-estrutura oferecida. À Silvia Costa, pela colaboração, pela prontidão em auxiliar com o que fosse preciso e pela companhia. À técnica de laboratório Ligia Vieira por compartilhar sua experiência comigo.

À Dra Isabela Werneck da Cunha, meu muito obrigada por disponibilizar seu tempo com as análises histológicas e imunohistoquímicas e pela paciência em compartilhar comigo um pouco do seu incrível conhecimento. Ao departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center, pela ajuda indispensável.

Ao Departamento de Oncologia Pediátrica do A.C.Camargo Cancer Center, especialmente à Dra. Cecília M. Costa Lima, pelo trabalho exemplar e por toda a dedicação e atenção aos pacientes e familiares, além das discussões científicas. À equipe de enfermagem, em especial à Fernanda, por todo o auxílio com as coletas das amostras de sangue, pela ajuda com o levantamento dos dados clínicos e principalmente por dividir comigo todo o seu amor e experiência na enfermagem pediátrica.

À Dra. Dirce Carraro, pelas valiosas sugestões, pela colaboração indispensável e aos membros de seu grupo do laboratório de Genômica e Biologia Molecular do CIPE.

Ao Dr. Israel Tojal e ao Renan Valieris do laboratório de Bioinformática Médica do CIPE, por todas as análises bioinformáticas e pelas discussões produtivas que ajudaram muito na construção de alguns dos resultados deste estudo.

À equipe de Cirurgia Oncológica Pediátrica do A.C.Camargo Cancer Center, em especial à Dra. Maria Lucia de Pinho, pela ajuda em coletar as amostras tumorais.

À equipe do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center, à Eloisa Olivieri, Louise e Ana Paula. Obrigada por toda a paciência em resolver “meus problemas amostrais”, pela simpatia e profissionalismo de vocês.

Ao departamento de Oncogenética do A.C.Camargo Cancer Center, em especial ao Dr. Alexandre da Costa e à Dra. Nirvana Formiga, pela colaboração.

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

À Dra. Mariana Maschietto pela colaboração e por todas as sugestões extremamente relevantes.

Ao ITACI, em especial ao Dr. Vicente Odone, à Dra. Estela Novak e à Thamiris Magalhães. Obrigada pelo levantamento dos casos de hepatoblastoma, pela recuperação dos dados clínicos e pela extração das amostras.

À Dra. Eugênia Valadares e Dra. Raquel Borges, obrigada por aceitarem participar da pesquisa fornecendo as amostras e as informações clínicas dos pacientes de Hirschprung.

Ao SAME e ao Arquivo Médico do A.C.Camargo Cancer Center pelo auxílio em recuperar os prontuários e também os blocos de parafina. Aos funcionários do CIPE, pelas ajudas burocráticas e administrativas. Aos membros do CEP do A.C.Camargo Cancer Center, pelas sugestões dadas nos projetos e relatórios entregues.

Ao pessoal da Pós-graduação e Biblioteca do A.C.Camargo Cancer Center.

À FAPESP, pelo apoio financeiro indispensável.

À Dra. Dolores López-Terrada, minha gratidão pela oportunidade de vivenciar uma experiência incrível no Texas Children's Hospital. Seu amor pela ciência, seu comprometimento e sua responsabilidade com todos, foram sem dúvida um diferencial na minha formação. Obrigada por me permitir “enxergar a fotografia como um todo”, entendendo a importância da pesquisa translacional de forma integradora e completa. Ao Dr. Steve Sarabia, pela paciência, por todos os ensinamentos técnicos no laboratório e pela receptividade inesquecível. Ao Dr. Milton Finegold, minha eterna gratidão pelas orientações recebidas de um patologista e cientista brilhante. A todos do laboratório de Oncologia e Imunologia Molecular do Texas Children's Hospital, em especial à Faith Hollingsworth, Angela Major e Karla Alvares pela ajuda com os experimentos e pela receptividade. À Tiffany Morgan pela ajuda administrativa. À Baylor College of Medicine pelo aceite do doutorado sanduíche.

Ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva (IB-USP) pelo apoio e infraestrutura. Aos professores incríveis que eu tive a honra de compartilhar cafés e discussões científicas: Dra. Ângela Morgante, Dr. Paulo Otto e Dra. Regina Célia, obrigada por dividirem um pouco da incrível experiência que vocês possuem, por inspirarem como cientistas, pelas sugestões em alguns pontos do projeto e também pelo fornecimento de reagentes. Aos funcionários Paulo Rogério e Mara Pinheiro, pelos auxílios com o bom funcionamento do laboratório e à Maraisa Sebastião pela ajuda administrativa. Ao Centro de Estudos do Genoma Humano, pela estrutura e apoio.

Ao “meu antigo grupo”. À Tatiane Rodrigues, “mãe” do projeto que deu origem a este estudo. Obrigada por todas as vezes em que me ajudou com o entendimento dos dados, do tema ou “simplesmente” do processo como um todo. À Érica S. Araújo, minha “mentora laboratorial” durante a iniciação científica e que acompanhou um pouco do doutorado. Seu brilhantismo, sua inteligência e dedicação à ciência são inspiradores. Obrigada por toda ajuda, pelos conselhos e pelas muitas conversas ao longo desses anos. Ao Felipe Fidalgo pela companhia e sugestões ao longo do projeto.

Aos meus colegas do IB-USP. Juliana Prior, Renan Barbosa, Gustavo Fernandes (em especial com algumas análises bioinformáticas), Luiz Gustavo, Rodrigo Salazar, Leandro Ucela, Allysson Allan, Lilian Kimura, André e Vinicius Borges. Obrigada por “me acolherem como intrusa”, pelas conversas, cafés, pastéis e sugestões ao longo de todo este tempo. Obrigada ao João Malvezzi e à Larissa Jurado, que passaram pelo laboratório e compartilharam da companhia em alguns momentos. À Darine Villela, pela ajuda com os experimentos de sequenciamento e também pela companhia e sugestões. À Thaise Nayane, obrigada por dividir as angústias no começo do processo de aprendizagem em NGS e pela colaboração na escrita do artigo de revisão. Ao Adriano Bonaldi e à Ana Carolina Fonseca que me “receberam” no laboratório, obrigada pela acolhida e ajuda.

Aos amigos incríveis que eu fiz em Houston, em especial àqueles de “Chez Margot et al.”. À Kriti Taneja, Matteo Mirarchi, Mario Piubelli, Mario de Bellis, Cristina Hoyos, Ralph Sc, Rita Assis, Isabella Shelby, Ignacio e Gina Dunkel. Obrigada por compartilharem comigo horas e horas de estudo, por tornarem a distância de casa menos dolorosa e por todas as boas lembranças que eu levarei para sempre.

Obrigada ao meu “mundo bailarinístico” e todas as pessoas que fazem parte dele. Vocês foram e sempre serão minha salvação de tempos difíceis.

Agradeço à minha família, os grandes responsáveis por eu poder chegar até aqui. À minha mãe Fátima Camacho, obrigada por todos os exemplos de coragem e também pela inspiração como educadora; seu profissionalismo e entrega, me serviram de incentivos para acreditar que a busca pelo conhecimento sempre será libertador; obrigada pelo seu amor incondicional, que me proporcionou tudo para sempre ir em busca dos meus sonhos. À minha irmã Paloma Aguiar, por ser “minha maior fã”, pelos incentivos, pela ajuda (moral e técnica) e pelo amor indispensável. Ao meu avô José Manuel (*in memoriam*), sua

paciência e benevolência sempre me serviram como “mantra” e sei que no fim desse ciclo seria uma das pessoas mais orgulhosas da minha conquista. À minha vó Fernanda Camacho, sua sinceridade e seu amor, sempre estarão comigo como meus maiores aliados. Minha eterna gratidão por tudo que fez por mim. Ao Gui, obrigada pela paciência, por todas as vezes em que me ajudou, pelo amor e amizade. Além de um companheiro de alma, é um dos cientistas mais brilhantes que eu conheço. Sua paixão por estudar, seu desejo por estar sempre se aperfeiçoando e sua curiosidade nata sempre me serviram de exemplos. Obrigada por compartilhar comigo seus incríveis conhecimentos e toda a sua experiência científica. Ao Felipe, por ser meu “anjo da guarda tecnológico”. À Dona Célia, ao Demétrius, à Lucila e à Nina pelos incentivos e palavras de apoio. Aos meus filhotes, pelo amor e por tornarem a vida mais simples. Amo vocês, e parte do que sou se deve a tudo àquilo de bom que todos vocês me transmitiram ao longo da vida.

E por fim, agradeço à todas as coisas e pessoas boas, que “inexplicavelmente” cruzaram meu caminho durante o doutorado... *“não sei se você acredita em Deus ou não, qual a sua religião, mas isso pouco importa; o exercício da gratidão terá efeito independentemente de qual for sua crença”.*

## RESUMO

Aguiar TFM. **Estudo genômico do tumor embrionário hepatoblastoma**. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O hepatoblastoma, câncer de fígado mais comum na infância, é um tumor embrionário que se supõe surgir da interrupção da diferenciação hepática durante a embriogênese. O genoma deste tipo tumoral carrega poucas alterações somáticas, principalmente aneuploidias cromossômicas e mutações em *CTNNB1*. Essa relativa escassez de mutações somáticas representa um desafio à estratificação de risco dos pacientes e ao desenvolvimento de terapias direcionadas. Neste trabalho, investigamos por sequenciamento de exoma o espectro de mutações somáticas em um grupo de 10 hepatoblastomas, pareados com suas respectivas amostras germinativas, incluindo um caso de tumor congênito. Os dados genômicos revelaram que os hepatoblastomas tem número reduzido de mutações somáticas codificadoras não-sinônimas (média de ~6 variantes/tumor, com exclusão do caso congênito), totalizando 94 mutações (92 diferentes) nos 10 tumores, mapeadas em 87 genes. Apenas três genes apresentaram mutações detectadas em mais de uma amostra, *CTNNB1*, *CX3CL1* e *CEP164*. As mutações foram validadas pelo sequenciamento de um painel composto pelos genes identificados no exoma, também utilizado para investigar estes genes em um grupo adicional de 12 tumores; apenas mutações em *CTNNB1* foram detectadas neste grupo adicional. Mutações somáticas em *CTNNB1* foram detectadas em ~54% do grupo estudado (22 hepatoblastomas): sete variantes patogênicas do tipo nucleotídeo único (SNV) ou indel foram identificadas em oito hepatoblastomas (~36%), uma delas nunca previamente descrita (A21\_S33del); deleções intragênicas foram detectadas por sequenciamento Sanger em quatro outros tumores (~18%). A proteína  $\beta$ -catenina foi avaliada por imunohistoquímica, apresentando translocação para o núcleo, o que indica ativação da via WNT; esse resultado também foi observado em tumores nos quais mutações em *CTNNB1* não foram detectadas. O principal achado do estudo do

exoma de hepatoblastomas foi a identificação de uma mutação somática recorrente no éxon 3 do gene *CX3CL1* (A235G), observada em dois diferentes tumores. A análise de expressão gênica e proteica de *CX3CL1* e de seu receptor *CX3CR1* revelou aumento de expressão de *CX3CL1* em hepatoblastomas; este resultado foi replicado em duas coortes independentes. O detalhamento da análise evidenciou um padrão bimodal: (a) linfócitos infiltrados em regiões tumorais de inflamação pós-quimioterapia eram negativos para essas proteínas, que deveriam estar expressas neste tipo celular em condições normais, enquanto as células tumorais as expressavam; (b) nas áreas de necrose tumoral pós-quimioterapia, houve detecção das proteínas *CX3CL1/CX3CR1* nos linfócitos, mas não nas células tumorais. Em conjunto, estes resultados sugerem que a ativação da via *CX3CL1/CX3CR1* ocorre em parte dos hepatoblastomas, independentemente da detecção de mutações, o que parece ser um achado relevante, potencialmente relacionado a inflamação e/ou resistência à quimioterapia. Adicionalmente, três assinaturas mutacionais foram detectadas nos hepatoblastomas, duas delas com predomínio das assinaturas do COSMIC, HB-S1 (COSMIC 1 e 6, presentes em todos os tipos de câncer) e HB-S2, com similaridades à assinatura COSMIC 29, relacionada apenas a carcinoma oral de células escamosas (gengivo-bucal) associado ao hábito de mascar tabaco; uma nova assinatura mutacional foi observada em um subconjunto de hepatoblastomas (HB-S3), com padrão inespecífico de pequeno aumento de mutações C>A. As assinaturas mutacionais já relatadas para câncer de fígado não foram evidentes nestes hepatoblastomas, sugerindo um processo mutacional diferente em sua origem. Por fim, análise de mutações germinativas no caso de hepatoblastoma congênito levou à identificação de variantes germinativas em genes de predisposição a câncer (*BRCA1* e *FAH*), levantando a questão do papel da predisposição genética no desenvolvimento destes tumores embrionários.

**Descritores:** Hepatoblastoma. Neoplasias Hepáticas/genética. Neoplasias Hepáticas/fisiopatologia. Genômica. Mutação/genética. Sequenciamento Completo do Exoma. Quimiocina *CX3CL1*. Via de Sinalização Wnt. Gene *CEP164*. Assinatura mutacional. Síndrome. Tumor embrionário.

## SUMMARY

Aguiar TFM. [Genomic study of the embryonal tumor hepatoblastoma]. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Hepatoblastoma, the most common liver cancer in infancy, is an embryonal tumor supposed to arise from differentiation impairment during embryogenesis. Hepatoblastomas genomes carry few somatic changes, mainly chromosomal aneuploidies and mutations in the *CTNNB1* gene. This relative paucity of somatic mutations poses a challenge to risk stratification and development of targeted therapies. In this work, we investigated the burden of somatic mutations in a cohort of 10 hepatoblastomas paired with their respective germline samples, including a case of congenital tumor. Data revealed a low number of non-synonymous somatic coding mutations (mean of ~6 variants/tumor), totalizing 94 mutations in the 10 tumors, mapped in 87 genes; only three genes exhibited mutations detected in more than one sample, *CTNNB1*, *CX3CL1* and *CEP164*. Target sequencing was used for validation and screening of the mutated genes in an additional group of 12 tumors; only *CTNNB1* mutations were detected in this additional group. *CTNNB1* mutations were detected in ~54% of the cohort (22 hepatoblastomas): seven single nucleotide variant or indel mutations were identified in eight hepatoblastomas (~36%), including the A21\_S33del mutation, not previously reported; intragenic deletions were detected by Sanger sequencing in 4 tumors (~18%). The  $\beta$ -catenin protein was evaluated by immunohistochemistry, presenting translocation to the nucleus, indicating activation of the WNT pathway; this result was also observed in tumors without *CTNNB1* mutations. The main finding of the exome study was the identification of a recurrent somatic mutation in the exon 3 of the *CX3CL1* gene (A235G) in two different hepatoblastomas. Gene expression and protein analysis of *CX3CL1* and its receptor *CX3CR1* revealed increased expression of *CX3CL1* in hepatoblastomas, a result that was replicated in two independent cohorts. A bimodal pattern of expression was observed: (a) lymphocytes infiltrated in tumor

regions of inflammation post-chemotherapy were negative for these proteins, which should be expressed in this cell type under normal conditions, while the tumor cells expressed them; (b) in areas of tumor necrosis after chemotherapy, CX3CL1/CX3CR1 proteins were detected in lymphocytes, but not in tumor cells. Taken together, these results suggest that activation of the CX3CL1/CX3CR1 pathway occurs in part of the hepatoblastomas, regardless of mutation detection, potentially related to inflammation and/or resistance to chemotherapy. Additionally, three mutational signatures were detected, two of them with a predominance of signatures of COSMIC, HB-S1 (COSMIC 1 and 6, present in all types of cancer) and HB-S2 (COSMIC 29 signature, related only to oral cell carcinoma gingival-buccal associated with the habit of chewing tobacco). A new mutational signature was observed in a subset of hepatoblastomas (HB-S3), with a non-specific pattern of small increase in C>A mutations. Mutational signatures already reported for liver cancer were not evident in these hepatoblastomas, suggesting a different mutational process. Finally, an exploration of germline mutations in the congenital hepatoblastoma led to the identification of variants in genes of cancer predisposition (*BRCA1* and *FAH*), raising the question of the role of genetic predisposition in the development of these embryonal tumors.

**Key-words:** Hepatoblastoma. Liver Neoplasms/genetic. Liver Neoplasms/physiopathology. Genomics. Mutation/genetic. Whole Exome Sequencing. Chemokine CX3CL1. Wnt Signaling Pathway. CEP164 gene. Mutation signature. Syndrome. Embryonal tumor.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Hallmarks de câncer e possibilidades terapêuticas .....	5
<b>Figura 2</b>	Papel da inflamação no início e na progressão tumoral de um carcinoma .....	10
<b>Figura 3</b>	Frequência de tipos de câncer em crianças e adultos.....	15
<b>Figura 4</b>	Número de mutações somáticas não sinônimas identificadas por estudos de sequenciamento de genoma de alguns cânceres humanos.....	18
<b>Figura 5</b>	Desenvolvimento do fígado embrionário.....	23
<b>Figura 6</b>	Subtipos histológicos de hepatoblastoma.....	27
<b>Figura 7</b>	Representação esquemática da segmentação anatômica do fígado.....	29
<b>Figura 8</b>	Esquema de estratificação de risco para tumores hepáticos infantis de acordo com CHIC.....	32
<b>Figura 9</b>	Resumo dos mecanismos e locais de ação dos principais agentes quimioterápicos.....	34
<b>Figura 10</b>	Ilustração da via canônica Wnt mediada por $\beta$ catenina.....	45
<b>Figura 11</b>	Diferenciação das células hepáticas precursoras e os diferentes tipos de origens do hepatoblastoma.....	50
<b>Figura 12</b>	Fragmentação de DNA pré captura da biblioteca.....	60
<b>Figura 13</b>	Ilustração de como funciona a técnica de sequenciamento de nova geração de DNA.....	61
<b>Figura 14</b>	Gráficos indicando qualidade do sequenciamento de exoma, em distribuição cumulativa.....	64
<b>Figura 15</b>	Imagem extraída do trabalho <i>Genomic Analysis of Hepatoblastoma Identifies Distinct Molecular and Prognostic Subgroups</i> (SUMAZIN et al. 2017) .....	68
<b>Figura 16</b>	Taxas de incidência de Tumores Hepáticos (grupo VII Hepatoblastoma) ajustadas por idade, para um milhão de crianças e adolescentes, segundo sexo (feminino em verde claro e masculino em verde escuro).....	81
<b>Figura 17</b>	Validação da mutação somática c.1699C>T do gene <i>DEPDC5</i> no tumor HB33 pela técnica de sequenciamento Sanger .....	110

<b>Figura 18</b>	Análise no ICGC. Imagem ilustrando os 20 genes mais comumente mutados com mutações não sinônimas de alto impacto funcional em carcinoma hepatocelular .....	112
<b>Figura 19</b>	Análise no cBioPortal. Frequência de alterações nos genes mutados de nosso estudo em amostras de carcinoma hepatocelular. ....	112
<b>Figura 20</b>	Genes com mutações somáticas nos hepatoblastomas aqui estudados e mutados com maior frequência nos tumores pediátricos do PECAN. ....	115
<b>Figura 21</b>	Mutações somáticas do tipo missense e indel identificadas no gene <i>CTNNB1</i> . ....	119
<b>Figura 22</b>	Validação por sequenciamento Sanger de variantes missense detectadas no gene <i>CTNNB1</i> . ....	120
<b>Figura 23</b>	Deleções intragênicas detectadas em <i>CTNNB1</i> . ....	121
<b>Figura 24</b>	Análise de expressão proteica da $\beta$ catenina em hepatoblastoma. ....	121
<b>Figura 25</b>	Mutação somática recorrente A235G detectada no exon 3 do gene <i>CX3CL1</i> e seu padrão de expressão em hepatoblastomas e linhagens celulares de tumores hepáticos. ....	121
<b>Figura 26</b>	Mutações somáticas já detectadas no gene <i>CX3CL1</i> em tumores, depositadas no banco de dados COSMIC. ....	131
<b>Figura 27</b>	Cinco mutações no gene <i>CX3CL1</i> em carcinoma hepatocelular, depositadas no cBioPortal. ....	133
<b>Figura 28</b>	Análise de mutações do gene <i>CX3CL1</i> nos dados PECAN de tumores pediátricos. ....	134
<b>Figura 29</b>	Padrão de expressão gênica do gene <i>CX3CR1</i> em hepatoblastomas e linhagens celulares de câncer hepático. ....	136
<b>Figura 30</b>	Nível de expressão do gene <i>CX3CL1</i> e características clínicas dos hepatoblastomas avaliados. ....	138
<b>Figura 31</b>	Dados de metilação do DNA de <i>CX3CL1</i> de hepatoblastoma (MASCHIETTO et al. 2016) e correlação com o padrão de expressão gênica. ....	139
<b>Figura 32</b>	Função biológica da proteína Fractalquina (produzida pelo gene <i>CX3CL1</i> ) e seu receptor <i>CX3CR1</i> . ....	141

<b>Figura 33</b>	Imunohistoquímica para avaliação proteica dos genes <i>CX3CL1</i> e <i>CX3CR1</i>	145
<b>Figura 34</b>	Expressão protéica de <i>CX3CL1</i> e <i>CX3CR1</i> avaliada em hepatoblastomas e metástase pulmonar de hepatoblastoma por ensaio imunohistoquímico (TCH).....	146
<b>Figura 35</b>	Três diferentes assinaturas mutacionais foram identificadas nos hepatoblastomas.....	149
<b>Figura 36</b>	Contribuição relativa de cada uma das três assinaturas HB para o perfil mutacional de cada um dos hepatoblastomas. ....	150
<b>Figura 37</b>	Variante germinativa em heterozigose no gene <i>FAH</i> , classificada como provavelmente patogênica .....	157
<b>Figura 38</b>	Comparação entre incidência e sobrevida dos grupos de pacientes afetados por tumores raros e tumores comuns. ....	165
<b>Figura 39</b>	Fluxograma esquemático: resumo resultados .....	173
<b>Figura 40</b>	Coorte pan câncer pediátrico.....	173
<b>Figura 41</b>	Ilustração de etapas na metástase e papel de quimiocinas e receptores. ....	179
<b>Figura 42</b>	Heatmap indicando a sobreposição entre as assinaturas do COSMIC e as três assinaturas identificadas nos hepatoblastomas.....	181
<b>Figura 43</b>	Análise integrada entre resultados clínicos e moleculares. ....	184
<b>Figura 44</b>	Categorias dos 565 genes de câncer analisados para mutações germinativas.....	187

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Informações sobre os casos estudados e tipos de experimentos realizados com cada amostra.....	55
<b>Tabela 2</b> Descrição de pacientes dos quais foram coletadas amostras de sangue periférico para estudo de alterações germinativas. ....	57
<b>Tabela 3</b> Informações sobre os pares de primers utilizados para sequenciamento Sanger. ....	67
<b>Tabela 4</b> Resumo dos principais achados experimentais deste estudo, referentes à análise de mutações somáticas, assinaturas mutacionais e expressão gênica. ....	76
<b>Tabela 5</b> Principais informações clínicas de 85 casos de pacientes com hepatoblastoma atendidos nas instituições de câncer pediátrico colaboradoras. ....	84
<b>Tabela 6</b> Análise estatística entre as variáveis consideradas de pior prognóstico (CHIC e outras) e o gênero dos pacientes.....	92
<b>Tabela 7</b> Características clínicas dos 10 pacientes com hepatoblastoma investigados por sequenciamento de exoma. ....	99
<b>Tabela 8</b> Características clínicas dos pacientes com hepatoblastoma de duas coortes adicionais (GRAAC e <i>Texas Children`s Hospital</i> ). ....	100
<b>Tabela 9</b> Características clínicas dos pacientes com hepatoblastoma contidos em tissue microarray (HB_TMA) (CAJAIBA et al. 2006).....	102
<b>Tabela 10</b> Descrição de mutações somáticas não-sinônimas identificadas em hepatoblastomas pelo sequenciamento de exoma, ordenadas por amostra tumoral. ....	105
<b>Tabela 11</b> Análise <i>Gene Ontology</i> .....	116
<b>Tabela 12</b> Análise de expressão da proteína $\beta$ -catenina em hepatoblastomas em <i>tissue microarray</i> por imunohistoquímica. ....	126
<b>Tabela 13</b> Variantes germinativas raras de HB33 de perda de função (LoF) ou troca de aminoácido (missense; classificadas como provavelmente patogênicas por seis diferentes algoritmos), não detectadas na mãe. ....	126

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Incidência dos principais tumores embrionários e suas características clínicas. ....	20
<b>Quadro 2</b>	Comparação do uso de PRETEXT em diferentes esquemas de estratificação de risco para hepatoblastoma. ....	30
<b>Quadro 3</b>	Informação sobre o kit de construção das bibliotecas genômicas. ....	59
<b>Quadro 4</b>	Análise de expressão da proteína $\beta$ -catenina por imunohistoquímica e mutações no gene <i>CTNNB1</i> nos tumores com dados de exoma. ....	122
<b>Quadro 5</b>	Avaliação por imunohistoquímica da expressão e localização celular das proteínas <i>CX3CL1</i> e <i>CX3CR1</i> em hepatoblastomas. ....	143
<b>Quadro 6</b>	Avaliação por imunohistoquímica da expressão e localização celular das proteínas <i>CX3CL1</i> e <i>CX3CR1</i> em hepatoblastomas provenientes do TCH. ....	144

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>5-FU</b>	Fluorouracila
<b>aCGH</b>	<i>Array Comparative Genomic Hybridization</i>
<b>AFP</b>	$\alpha$ -fetoproteína
<b>BWS</b>	<i>Beckwith-Wiedemann Syndrome</i>
<b>CD</b>	Cisplatina e Doxorrubicina
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CHIC</b>	<i>Children's Hepatic Tumors International Collaboration</i>
<b>CIPE</b>	Centro Internacional de Pesquisa e Ensino
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás carbônico
<b>COG</b>	<i>Children's Oncology Group</i>
<b>COSMIC</b>	<i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i>
<b>CpG</b>	Citosina que precede uma guanina (5'-CG-3')
<b>CT</b>	<i>Cycle Threshold</i>
<b>CVF</b>	Cisplatina, Vincristina e Fluorouracila
<b><math>\Delta</math></b>	Delta
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ERRO</b>	Espécie Reativa de Oxigênio
<b>EXAC</b>	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
<b>FAP</b>	<i>Familial adenomatous polyposis</i> (Polipose Adenomatosa familiar)
<b>g</b>	grama
<b>GO</b>	<i>Gene Ontology</i>
<b>GPOH</b>	<i>Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie</i>
<b>GRAACC</b>	Grupo de Apoio ao Adolescente e à Criança com Câncer
<b>HB</b>	Hepatoblastoma
<b>H&amp;E</b>	coloração por Hematoxilina e Eosina
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>ICGC</b>	<i>International Cancer Genome Consortium</i>

<b>INCA</b>	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
<b>INDELS</b>	<i>Insertion or Deletion of Nucleotide</i> (Inserção ou deleção de um nucleotídeo)
<b>ITACI</b>	Instituto de Tratamento do Câncer Infantil
<b>JPLT</b>	<i>Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor</i>
<b>KEGG</b>	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
<b>LOF</b>	<i>loss of function</i> (Perda de função)
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µl</b>	Microlitro
<b>Mb</b>	Mega pares de bases = 1.000.000 pb
<b>MEM</b>	<i>Minimum Essential Medium</i>
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>ng</b>	Nanograma
<b>nm</b>	nanômetro
<b>NGS</b>	<i>Next Generation Sequencing</i> (sequenciamento de nova geração)
<b>O2</b>	Oxigênio
<b>OMIM</b>	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
<b>PANTHER</b>	<i>Protein Analysis Through Evolutionary Relationships</i>
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Bank</i>
<b>PECAN</b>	<i>Pediatric Cancer Genomic Data Portal</i>
<b>PRONON</b>	Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica
<b>PRETEXT</b>	<i>PRE-Treatment EXTent of disease</i>
<b>qPCR</b>	<i>Quantitative PCR</i>
<b>RefSeq</b>	<i>Reference Sequence</i>
<b>RIN</b>	<i>RNA Integrity Number</i> (Número de integridade do RNA)
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Meio de cultura celular)
<b>rRNA</b>	RNA ribossômico
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico

<b>ROX</b>	6-carboxy-X-rhodamine (Reagente calibrador da fluorescência no qPCR)
<b>RT</b>	<i>Real time</i>
<b>SFB</b>	soro bovino fetal
<b>SEER</b>	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results Program</i>
<b>SIFT</b>	<i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
<b>SIOPEL</b>	<i>Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique – Epithelial Liver Tumor</i>
<b>SNV</b>	<i>Single Nucleotide Variant</i> (Alteração de um nucleotídeo)
<b>TCGA</b>	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
<b>TCH</b>	<i>Texas Children`s Hospital</i>
<b>TLCT</b>	<i>Transitional liver cell tumors</i>
<b>TMA</b>	<i>Tissue microarray</i>
<b>UCSC</b>	<i>University of California Santa Cruz</i>
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva
<b>VCF</b>	<i>Variant Call format</i>
<b>VPEFR</b>	envolvimento de veia cava, bifurcação da veia porta, doença extra-hepática, tumor multifocal, ruptura tumoral
<b>WES</b>	<i>Whole Exome Sequencing</i> (Sequenciamento de exoma completo)
<b>WGS</b>	<i>Whole Genome Sequencing</i> (Sequenciamento de genoma completo)

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Por que estudar câncer?.....	2
1.2	Bases moleculares do câncer.....	3
1.3	Tumores pediátricos.....	12
1.4	Tumores embrionários.....	19
1.4.1	Tumor embrionário do fígado: hepatoblastoma.....	19
1.4.1.1	Prevalência.....	20
1.4.2	Características clínicas: diagnóstico, estadiamento e tratamento do hepatoblastoma.....	21
1.4.2.1	Diagnóstico.....	21
1.4.2.2	Marcadores tumorais.....	21
1.4.2.3	Histologia tumoral.....	22
1.4.2.4	Estratificação de risco de hepatoblastomas.....	28
1.4.2.5	Tratamento.....	33
1.4.3	Fatores de risco ambientais e genéticos.....	36
1.4.4	Alterações no genoma de hepatoblastomas.....	39
1.4.4.1	Citogenética.....	39
1.4.4.2	Epigenética.....	40
1.4.4.3	Mutações de ponto em câncer e sequenciamento paralelo massivo.....	42
1.4.4.4	Mutações em hepatoblastomas.....	43
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>522</b>
2.1	Objetivo principal.....	523
2.2	Objetivos específicos.....	523
<b>3</b>	<b>PACIENTES E METODOLOGIA.....</b>	<b>54</b>
3.1	Pacientes.....	54
3.2	Metodologia.....	57
3.2.1	Extração de Biomoléculas.....	57
3.2.2	Construção das bibliotecas genômicas para sequenciamento de exoma e de painel de genes.....	58
3.2.3	Obtenção dos dados de sequenciamento de nova geração.....	62

3.2.4	Análise dos dados de exoma e painel de genes para prospecção de variantes de interesse.....	65
3.2.5	Assinatura mutacional.....	66
3.2.6	Sequenciamento Sanger.....	66
3.2.7	Análise de expressão gênica por PCR em tempo real.....	69
3.2.8	Amostras de linhagens celulares de tumor hepático.....	70
3.2.9	Imunohistoquímica.....	71
3.2.10	<i>Tissue microarray</i> .....	72
<b>4</b>	<b>RESULTADOS e DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>4.1</b>	<b>Capítulo 1 Análise dos dados epidemiológicos e clínicos de pacientes com hepatoblastoma definindo as variáveis.....</b>	<b>78</b>
4.1.1	Definindo as variáveis.....	79
4.1.2	Análise descritiva.....	83
4.1.3	Análise estatística considerando variáveis de risco e gênero.....	90
4.1.4	Análise qualitativa dos pacientes - intercorrências no período pré/perinatal e sinais clínicos adicionais.....	93
<b>4.2</b>	<b>Capítulo 2 Estudo de mutações somáticas em hepatoblastomas para identificação de genes e vias envolvidas na tumorigênese.....</b>	<b>97</b>
4.2.1	Coorte de pacientes.....	98
4.2.2	Identificação de mutações somáticas não-sinônimas em regiões codificadoras do genoma por sequenciamento de exoma.....	103
4.2.3	Estudo de mutações no gene <i>CTNNB1</i> e alterações da expressão proteica.....	118
4.2.4	Mutação somática recorrente A235G no gene <i>CX3CLI</i> : novo gene em hepatoblastoma?.....	128
4.2.5	Assinaturas mutacionais em hepatoblastomas.....	147
<b>4.3</b>	<b>Capítulo 3 Investigação de mutações germinativas de predisposição a câncer e/ou anomalias congênicas em pacientes com hepatoblastomas.....</b>	<b>151</b>
4.3.1	Associação entre predisposição genética a câncer na infância e sinais/ anomalias congênicas.....	152
4.3.2	Hepatoblastoma congênito.....	153
4.3.3	Paciente sindrômico HB46.....	158
4.3.4	Doença de Hirschprung e Hepatoblastoma.....	1600
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>164</b>

<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>193</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>197</b>

### **ANEXOS**

**Anexos 1 e 2** Artigos publicados

---

# *INTRODUÇÃO*

---

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 POR QUE ESTUDAR CÂNCER?

As doenças não transmissíveis já são as principais patologias responsáveis pelo adoecimento e óbito da população no mundo. Em 2008, 36 milhões dos óbitos (63%) ocorreram em consequência desse grupo de condições clínicas, com destaque para as doenças cardiovasculares (48%) e o câncer (21%). Esse impacto afeta principalmente os países de baixo e médio desenvolvimentos, especialmente por mortes prematuras (Organização Mundial da Saúde-OMS 2013). Um relatório de 2017 do *International Agency for Research on Cancer-IARC* (BRAY et al. 2017) apontou que entre 2008-2012 aproximadamente 8,8 milhões de pessoas morreram de câncer. Mais de 14 milhões de pessoas são diagnosticadas todos os anos e esse número de casos deve subir para mais de 21 milhões em 2030. Enquanto em países desenvolvidos predominam os tipos de cânceres associados à urbanização e ao estilo de vida moderno (pulmão, próstata, mama, cólon e reto), nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento ainda é alta a ocorrência de tumores decorrentes de infecções (colo de útero, estômago, esôfago e fígado) (FERLAY et al. 2013). Há um discreto predomínio do sexo masculino tanto na incidência (53%) quanto na mortalidade (57%). Estima-se, para o Brasil, biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano (Ministério da Saúde 2018). Informações sobre a ocorrência de câncer e seu desfecho são requisitos essenciais para programas nacionais e regionais para o controle do câncer, além de pautar a agenda de pesquisa sobre câncer (STEWART e WILD 2014). Grande parte das verbas em pesquisa de câncer são destinadas para tumores mais prevalentes, que acometem adultos. De acordo com dados do Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica – Pronon, no Brasil em 2016, os gastos chegaram a R\$ 3,89 bilhões. Entretanto, nos últimos anos, esforços de organizações mundiais tem ressaltado a importância de investimentos na pesquisa de tumores pediátricos, que são raros por definição. As justificativas se baseiam principalmente na importância de estudos que melhorem não somente a sobrevida, mas também a qualidade dos tratamentos, uma

vez que a toxicidade é um dos principais problemas em decorrência dos esquemas agressivos de quimioterapia (HUANG et al. 2018).

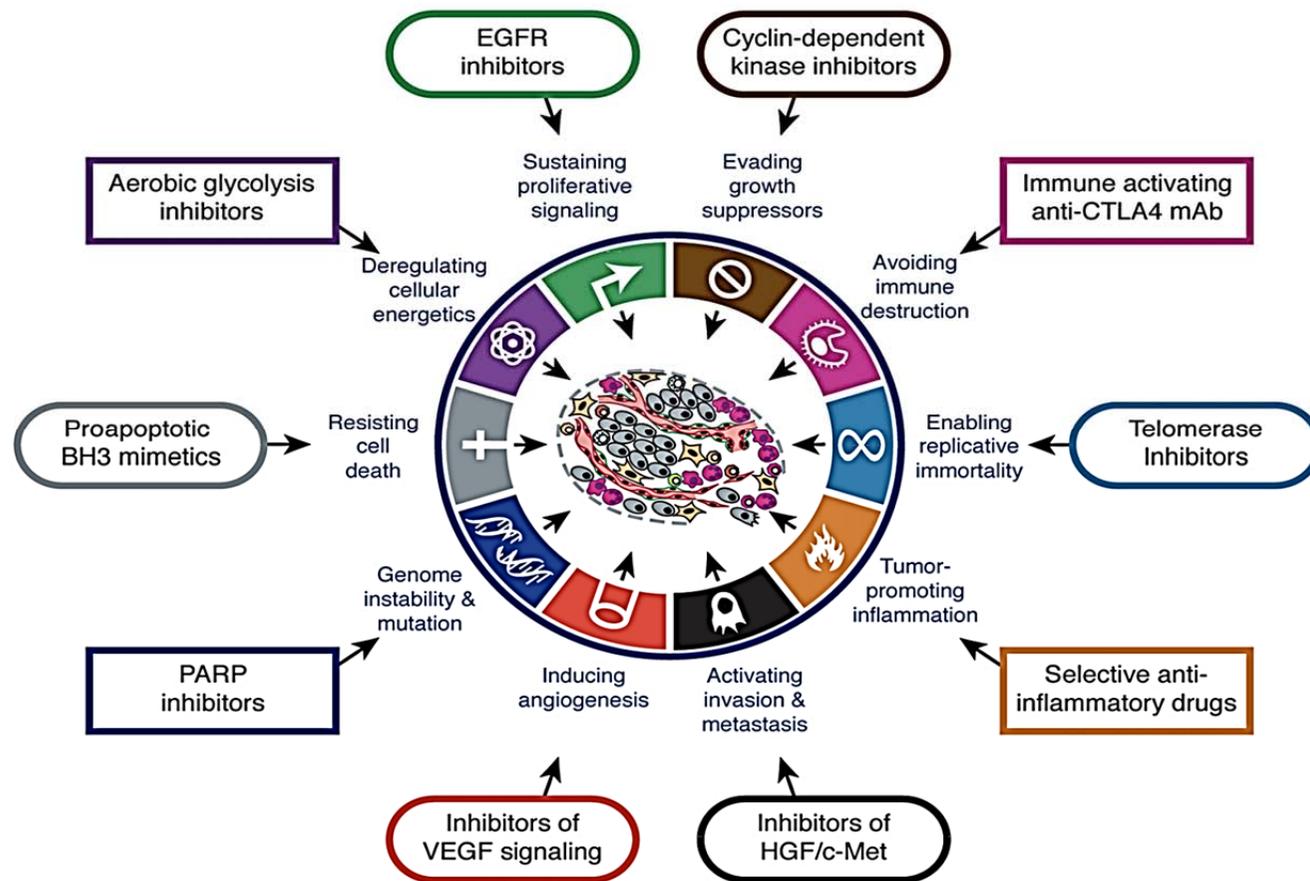
## 1.2 BASES MOLECULARES DO CÂNCER

Os estudos biomédicos foram reformulados durante o século XX, a partir da elaboração de conceitos de genética e hereditariedade, de processos celulares, de como os tecidos se desenvolvem sob o controle de genes específicos; entretanto, interligar fatores genéticos, ambientais, imunológicos e de microambiente tecidual ainda é uma tarefa desafiadora, embora algumas peças deste “quebra-cabeça” puderam ser encaixadas. Atualmente, um fato reconhecido amplamente é que apenas uma minoria de todos os cânceres é causada por mutações germinativas, enquanto a grande maioria (cerca de 90%) ocorre num padrão multifatorial pautado por mutações somáticas e atuação de fatores ambientais (CAMPBELL et al. 2017).

Primordialmente, partiu-se de uma visão do câncer como uma doença causada por alterações cromossômicas (TEORIA DE BOVERI 1902 – traduzido e anotado por Henry Harris 2008), que gradualmente se deslocou para um entendimento da biologia tumoral centrada nos genes, especialmente focada em oncogenes e genes supressores tumorais (BOVERI 2008). Assim, a compreensão da aquisição de características específicas de células tumorais e os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de um tumor requer, em uma primeira etapa, entender como alterações no material genético podem interferir no fenótipo de uma célula.

De acordo com HANAHAN e WEINBERG (2011), o que caracteriza o câncer seriam capacidades biológicas específicas que são adquiridas durante as várias etapas do desenvolvimento dos tumores, em especial por intermédio de mutações. Essas características em conjunto constituem um princípio organizador para se compreender as complexidades da doença neoplásica. Tais características ficaram conhecidas como *cancer hallmarks* e incluem a manutenção da sinalização para proliferação, inibição de supressores de crescimento, capacidade replicativa ilimitada, alterações da resposta imunológica, resistência à morte celular, alteração de metabolismo energético, inflamação, indução da angiogênese e ativação de ações invasivas e metastáticas. Subjacente a estas características encontram-se a

instabilidade do genoma tumoral, assim como a atuação de processos mutacionais. Todas essas características partem da ideia original de que o câncer é uma doença que resulta da expressão alterada de muitos genes. A **Figura 1**, extraída do trabalho de 2011, mostra essas *hallmarks* e o que se sabia então sobre possíveis terapias-alvo para cada tipo de alteração.



Fonte: HANAHAN e WEINBERG (2011)

**Figura 1 - Hallmarks** de câncer e possibilidades terapêuticas: Essa figura ilustra 10 capacidades adquiridas que seriam necessárias para o crescimento e progressão tumoral, de acordo com publicação relevante de 2011. Para cada uma delas estão indicados alguns medicamentos em desenvolvimento, em ensaios clínicos ou, em alguns casos, já aprovados para uso no tratamento de certos tumores.

Desde que foram propostas e mesmo antes, essas capacidades adquiridas do processo tumoral são amplamente estudadas, sempre com objetivo de melhorar a caracterização dos tumores e com isso desenvolver diagnóstico precoce e melhores esquemas de tratamento. Um trabalho de FOUAD e AANEI (2017) revisitou as *hallmarks* anteriormente propostas, propondo um entendimento ampliado sobre cada uma das características, baseado em novos dados e análises. Ao invés de 10, algumas das *hallmarks* foram condensadas em um único conceito, sendo sugeridas sete características: seletividade de células com vantagem proliferativa; alteração da resposta de estresse celular, o que favorece a resistência à apoptose; angiogênese/vascularização; invasão e metástase; alteração de metabolismo e microambiente alterado, principalmente pela modulação imunológica. Essas alterações poderiam surgir a partir de exposição de células normais a fatores ambientais, oncovírus e também erros de replicação. Sem a devida correção, as células acumulariam alterações genéticas, cromossômicas, epigenéticas e, ao longo do percurso de malignização, passariam por ciclos de seleção clonal evolutiva, em um processo de aquisição das sete capacidades citadas, tornando-se um tumor.

De acordo com FOUAD e AANEI (2017), o estudo da instabilidade genômica tumoral e de alterações em genes supressores tumorais e oncogenes deve ser entendido de um ponto de vista evolutivo e não só mutacional. Em situações de estresse fisiológico ou de exposição a alguns agentes patogênicos, a célula pode desenvolver respostas estruturais e funcionais reversíveis. Tais respostas adaptativas incluem hipertrofia, hiperplasia, atrofia e metaplasia. A lesão celular se instala quando os limites da resposta adaptativa forem ultrapassados, ou se as células forem expostas a agentes lesivos ou estresse, privadas de nutrientes essenciais ou ficarem comprometidas por mutações, o que ocorreria no caso de a célula possuir alterações em oncogenes, supressores tumorais e outros genes importantes. Alterações de resposta ao estresse celular, induzidas ou não por alterações em oncogenes e supressores tumorais, podem induzir à uma resistência apoptótica. Existem duas principais vias de sinalização de apoptose: a via extrínseca (via dos receptores de morte celular) e a via intrínseca (ou via da mitocôndria). Outra via mais recentemente descrita é a via perforina-granzima, que envolve células T citotóxicas. A sinalização dessas diferentes vias de apoptose leva à ativação das caspases,

ativando modificações bioquímicas na célula, como clivagem de proteínas, degradação do DNA e reconhecimento fagocítico, por exemplo (revisão em ELMORE 2007 e ALBERTS 2010). Entretanto, mesmo em tumores com mutações em *TP53* (supressor tumoral), a apoptose ocorre continuamente nas células tumorais (LLAMBI et al. 2011) e pode até mesmo desempenhar um papel evolutivo na progressão (LABI et al. 2015), tornando claro que nem todas as células tumorais seriam capazes de contornar as respostas de senescência e morte (PEREZ et al. 2014). Em resumo, a revisão de 2017 aumenta a complexidade desses conceitos, concluindo que essas primeiras características de vantagem proliferativa e resistência à apoptose seriam necessárias, embora outras seriam mais decisivas para determinar agressividade e resposta tumoral ao tratamento.

Vascularização, invasão e metástase são fatores relacionados entre si (revisão em CARMELIET 2000; CARMELIET e JAIN 2000; HANAHAN e WEINBERG 2011). Apesar de existirem outros tipos de vascularização, a mais estudada é a angiogênese. Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos, relacionada a condições normais do crescimento, mas também ligada ao desenvolvimento de diversas doenças, incluindo o câncer, que requer nutrientes e oxigênio para desenvolvimento e para invadir tecidos adjacentes e se disseminar (metástase). FOUAD e AANEI (2017) afirmam que estes eventos podem ocorrer de forma independente, mas que mais frequentemente interagem e conferem características mais agressivas aos tumores.

As demais *hallmarks* indicadas são a alteração de metabolismo e de microambiente, este último principalmente pela modulação imunológica. As respostas inflamatórias desempenham papéis decisivos em diferentes fases do desenvolvimento tumoral, incluindo iniciação, promoção, conversão de malignidade, invasão e metástase. Células imunológicas que se infiltram em tumores se envolvem em uma via de comunicação extensa e dinâmica, na qual o desafio nos estudos consiste em diferenciar os mecanismos envolvidos com a resposta imune dos mecanismos adaptativos do microambiente tumoral e a resposta imune “saudável” (GRIVENNIKOV et al. 2010).

A presença de leucócitos nos tumores, observada no século XIX por Rudolf Virchow, forneceu a primeira indicação de uma possível ligação entre a inflamação e

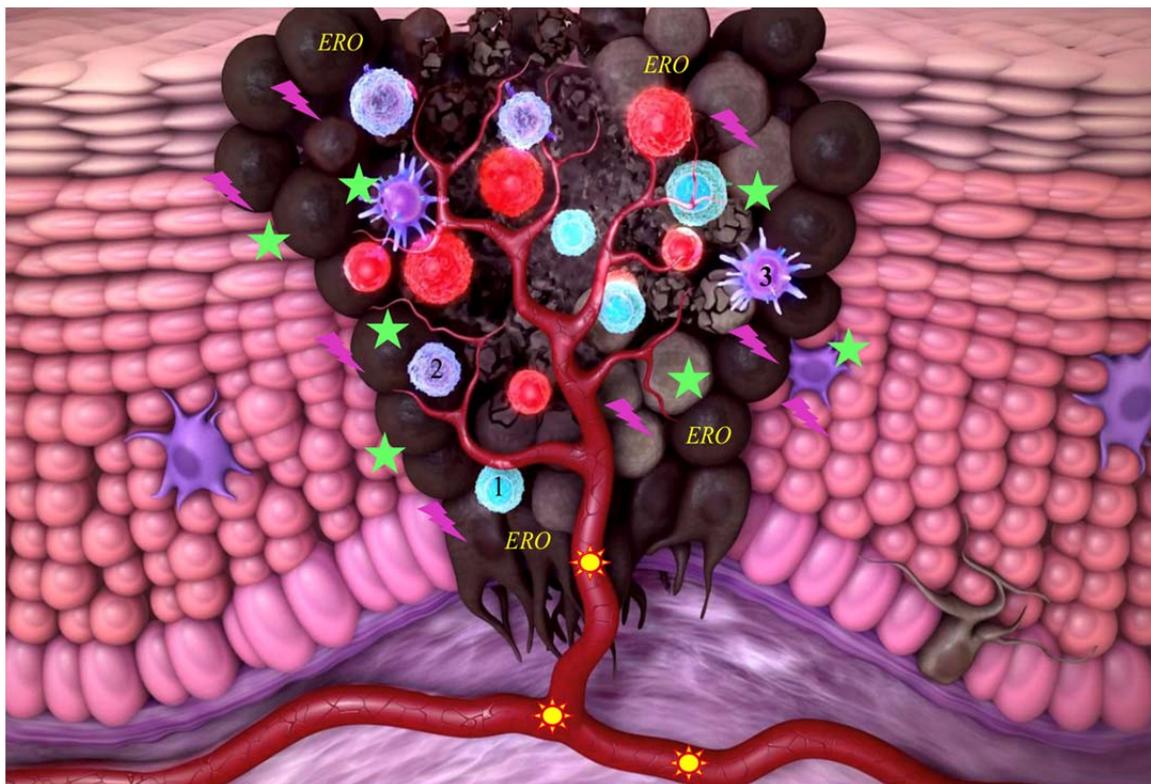
o câncer. No entanto, foi somente após os refinamentos das técnicas moleculares que se obteve evidência clara de que a inflamação desempenha um papel crítico na tumorigênese, com alguns dos mecanismos moleculares subjacentes já elucidados (KARIN 2006). Atualmente, aceita-se um papel relevante da inflamação na tumorigênese, além de ter ficado evidente que um microambiente inflamatório é um componente essencial de todos os tumores, incluindo alguns nos quais há uma relação causal direta com a inflamação, como por exemplo tumores hepáticos associados à cirrose (MANTOVANI et al. 2008).

Um estudo de GRIVENNIKOV et al. (2010) reuniu as principais informações relacionadas à associação entre sistema imune e tumorigênese. Os tipos diferentes de inflamação induzem tumores com características diferentes. Cada microambiente tumoral contém células imunes inatas (incluindo macrófagos, neutrófilos, mastócitos, células supressoras mielóides derivadas, células dendríticas e células *natural killer*) e células imunes adaptativas (linfócitos T e B), além das células tumorais e do estroma circundante (composto por fibroblastos, células endoteliais e células mesenquimais) (DE VISSER et al. 2006). As células imunes mais frequentemente encontradas no microambiente tumoral são macrófagos associados a tumores (TAMs) e linfócitos T. As células TAM promovem principalmente o crescimento de tumores e podem ser obrigatórias para angiogênese, invasão e metástase (CONDEELIS e POLLARD 2006), geralmente estando sua presença no tumor correlacionada com pior prognóstico (MURDOCH et al. 2008).

Estas células diversas comunicam-se umas com as outras por meio de contato direto ou pela produção de proteínas chamadas citocinas e quimiocinas. Citocina é um termo empregado para designar um extenso grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes. Constituem um grupo de fatores extracelulares que podem ser produzidos por diversas células. Já as quimiocinas fazem parte de uma família especializada de citocinas, que funcionam como potentes mediadores ou reguladores da inflamação, pela habilidade de recrutar e ativar subpopulações específicas de leucócitos (LICHTMAN 2005). São divididas em quatro subfamílias dependendo da posição de seus resíduos de cisteína; CC, CXC, CX3C e XC, onde X= aminoácido e C= cisteína. Na subfamília CXC um aminoácido separa as primeiras 2 cisteínas, enquanto na

subfamília CC os primeiros dois resíduos de cisteína são adjacentes um ao outro. Cada subfamília possui seu próprio receptor e tem funções diferenciadas uma da outra. As quimiocinas CXC são quimiotáticas para neutrófilos, enquanto as CC não agem neste último grupo celular e atraem monócitos, basófilos e linfócitos (MÉLIK-PARSADANIANTZ et al. 2008). A expressão de mediadores e moduladores imunológicos, bem como o estado de abundância e ativação de diferentes tipos de células no microambiente tumoral, são aspectos que determinam para qual dos lados a resposta imunológica irá pender: para o combate ao tumor ou para sua progressão (SMYTH et al. 2006; LIN e KARIN 2007).

Diferentes citocinas podem promover ou inibir o desenvolvimento e a progressão do tumor (LIN e KARIN 2007). Através da ativação de fatores de transcrição (NF-KB, AP-1, STAT e SMAD), bem como de caspases, as citocinas controlam o meio imunológico e inflamatório para favorecer a imunidade antitumoral (IL-12, IFN $\gamma$ ) ou então atuando para aumentar a progressão tumoral (IL-6, IL-17, IL-23); também podendo ter efeitos diretos no crescimento e sobrevivência das células tumorais (TRAIL, FasL, TNF- $\alpha$ , EGFR, TGF- $\beta$ , IL-6) (**Figura 2**).



**Fonte:** Imagem extraída e adaptada de *Tumour immunology and immunotherapy - Nature Channel* - Publicado em 17 de setembro de 2015 ([www.youtube.com/watch?v=K09xzIQ8zsg](http://www.youtube.com/watch?v=K09xzIQ8zsg)- acesso em setembro de 2018). Legenda adaptada de LIN e KARIN (2007); O'HAYRE et al. (2008); GRIVENNIKOV et al. (2010).

**Figura 2** - Papel da inflamação no início e na progressão tumoral de um carcinoma. As citocinas (estrelas verdes) produzidas pelas células imunitárias que se infiltram no tumor, como células *natural killer* (número 1), linfócitos T (número 2) e células dendríticas (número 3) ativam fatores de transcrição, como *STAT3*, em células pré-malignas, para controlar processos pró-tumor, incluindo sobrevivência, proliferação, crescimento, angiogênese, invasão e metástase. Em um mecanismo de retroalimentação, esses fatores induzem produção de quimiocinas (raios rosas), que atraem células imunes adicionais e o tumor passa a usar esses fatores para sua promoção. Esse tipo de ganho do microambiente tumoral pode ser explicado porque as citocinas produzidas pelas células imunes que infiltram o tumor aumentam o nível de espécies reativas de oxigênio intracelulares (ERO, em amarelo na imagem). Essa alteração pode causar mutações em células epiteliais próximas e com isso favorecer a resistência do tumor.

A última *hallmark* a ser discutida neste texto diz respeito às alterações metabólicas observadas nas células tumorais, assim como suas causas e consequências. A mudança dos metabólitos dentro da célula tumoral pode conferir vantagens na progressão (CAIRNS et al. 2016; DE BERARDINIS et al. 2016). Recentemente, PAVLOVA e THOMPSON (2016) definiram as alterações metabólicas do câncer em seis tipos: liberação desregulada de glicose e aminoácidos, aquisição de nutrientes, uso de glicólise, aumento da demanda de nitrogênio, alterações na regulação gênica controlada por metabólitos e interações metabólicas com o microambiente. Esses estudos metabólicos, apesar de iniciais, são promissores e podem representar uma nova alternativa para abordar a biologia tumoral.

Todas essas características são essenciais para a biologia tumoral, entretanto, grande parte dos estudos indica a avaliação da interação entre essas *hallmarks* de acordo com a idade de acometimento do tumor, uma vez que outra característica importante é a senescência celular e a capacidade de divisão das células-tronco em cada tecido. Um dos artigos mais respeitados sobre o assunto foi publicado em 2015 por TOMASETTI e VOGELSTEIN, no qual os autores propuseram que a variação no risco de câncer entre os diferentes tecidos seria atribuível às diferentes taxas intrínsecas em cada um de divisão de células-tronco, aumentando o risco de desenvolvimento tumoral quanto maior fosse essa taxa. Adicionalmente, a hipótese de senescência foi reforçada por descobertas como a hematopoese clonal em indivíduos idosos (STEENSMA et al. 2015), assim como alta carga de mutação em células da pele envelhecida (MARTINCORENA et al. 2015), retratando então a maioria dos cânceres que acometem adultos como doenças do envelhecimento.

O genoma tumoral carrega um painel heterogêneo de mutações somáticas (não presentes no genoma constitutivo do indivíduo) em diferentes frequências na população celular tumoral e este conjunto de mutações é progressivamente adquirido. As mutações somáticas tumorais são usualmente classificadas em *drivers* e *passengers*. *Drivers* seriam as mutações que de fato conferem uma vantagem seletiva à célula neoplásica, enquanto as mutações que surgem em decorrência do aumento dos erros de replicação e de reparo são denominadas *passengers* (HABER e SETTLEMAN 2007). Vale ressaltar que mutações *passengers* podem conferir funções tumorais importantes, como diminuição de resposta a tratamentos, e que os papéis de mutações *drivers* e *passengers* podem ser permutáveis durante a

progressão tumoral (VOGELSTEIN et al. 2013). Adicionalmente, os estudos genômicos demonstraram que tumores carregam um menor número de mutações *drivers* do que aquele inicialmente esperado. É estimado que, ao longo da progressão, cada tumor apresente entre 5 a 15 mutações *drivers* e que cada uma delas confira apenas uma pequena vantagem seletiva celular (BOZIC et al. 2010). De fato, apenas um grupo pequeno de genes apresenta mutações em vários tipos tumorais, enquanto uma proporção muito maior de genes encontra-se raramente mutado, em diferentes amostras tumorais (WOOD et al. 2007), ilustrando a heterogeneidade genética intertumoral dentro de um mesmo grupo.

Apesar dessa heterogeneidade mutacional no câncer dentro até do mesmo subtipo, estudos recentes identificaram assinaturas mutacionais específicas, relacionadas tanto à classe tumoral como à idade de acometimento e exposição a agentes mutagênicos, como luz ultravioleta ou fumo (ALEXANDROV et al. 2013). A fim de facilitar a análise qualitativa, bem como as estimativas de frequência, de mutações somáticas tumorais, os dados atualmente são compilados em bancos de dados públicos que são derivados de grandes consórcios internacionais; os mais importantes são:

COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>), e ICGC (<http://dcc.icgc.org/>) e TCGA (<http://cancergenome.nih.gov/>).

### **1.3 TUMORES PEDIÁTRICOS**

O câncer em crianças é raro, porém é a principal causa de morte por doença em países desenvolvidos. Em 2016, aproximadamente 16.000 crianças e adolescentes de 0 a 19 anos foram diagnosticadas com câncer e 1.800 morreram da doença nos Estados Unidos (SIEGEL et al. 2017).

O Brasil possui uma população jovem. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE de 2015 mostravam que 38% da população brasileira encontrava-se abaixo dos 19 anos. De acordo com relatório do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva-INCA (Ministério da Saúde 2017), assim como em países desenvolvidos, no Brasil o câncer já representa a primeira causa de morte por doença (8% do total) entre crianças e adolescentes de 0 a 19 anos (Ministério da Saúde 2017). Foram estimados cerca de 12.600 casos novos de câncer em crianças e adolescentes no Brasil em 2017. As regiões Sudeste e Nordeste apresentaram os

maiores números de casos novos, 6.050 e 2.750, respectivamente, seguidas pelas regiões Sul (1.320), Centro-Oeste (1.270) e Norte (1.210).

Os tipos mais comuns de câncer diagnosticados em crianças de 0 a 14 anos são leucemias, seguidas por tumores do sistema nervoso central, linfomas, sarcomas de partes moles (dos quais metade são rhabdomyosarcomas), neuroblastomas e tumores renais ([www.cancer.gov/types/childhood-cancers](http://www.cancer.gov/types/childhood-cancers) - Acesso em agosto de 2018). Em indivíduos de 15 a 19 anos, os cânceres mais frequentes são linfomas, seguidos por tumores do sistema nervoso central, leucemias, gonadal (testicular e ovariano), tumores de células germinativas, câncer de tireoide e melanoma. A partir de 1º de janeiro de 2014 (a data mais recente para a qual existem dados), aproximadamente 419.000 sobreviventes de câncer na infância e adolescência (diagnosticados entre 0 e 19 anos) estavam vivos nos Estados Unidos (HOWLADER et al. 2016 - [www.seer.cancer.gov/csr/1975\\_2014/](http://www.seer.cancer.gov/csr/1975_2014/) - Acesso em setembro de 2018). O número de sobreviventes continuará a aumentar, dado que a incidência de câncer infantil tem aumentado ligeiramente nas últimas décadas e que as taxas de sobrevivência em geral estão melhorando.

Melhorias significativas no tratamento de tumores pediátricos estão relacionadas com o desenvolvimento de grandes estudos cooperativos multidisciplinares, como *Children's Cancer Group*, *Pediatric Oncology Group*, *Intergroup Rhabdomyosarcoma Study*, *National Wilms' Tumor Study* e *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique*, entre diversos outros. Este tipo de abordagem tem permitido o estudo de casuísticas maiores e melhor caracterizadas, assim como o desenvolvimento de protocolos de tratamento por critérios de estadiamento, averiguação e controle de efeitos adversos em terapias e padronização de métodos laboratoriais otimizados para avaliação de marcadores tumorais, por exemplo (GROSFELD e O'NEILL 2012).

O câncer infanto-juvenil deve ser estudado separadamente do câncer do adulto por apresentar inúmeras diferenças, incluindo locais primários de acometimento, diferentes origens histológicas e comportamentos clínicos distintos. Em sua maioria, os tumores pediátricos se assemelham às células precursoras do órgão acometido, que sofreram algum tipo de erro durante a diferenciação celular (revisão em FEDERICO et al. 2011). À medida que as células no embrião passam por repetidos ciclos de crescimento e divisão, células localizadas em diferentes partes começam a assumir fenótipos distintos, sendo esse o processo de diferenciação. Cada

tipo celular tem um conjunto próprio de genes expressos que colaboram para criar um fenótipo celular específico. Caso ocorra um erro de sinalização nesse processo, isto pode resultar no impedimento da maturação e diferenciação celular, hipótese de origem de alguns tumores pediátricos (revisão em PAABY et al. 2016).

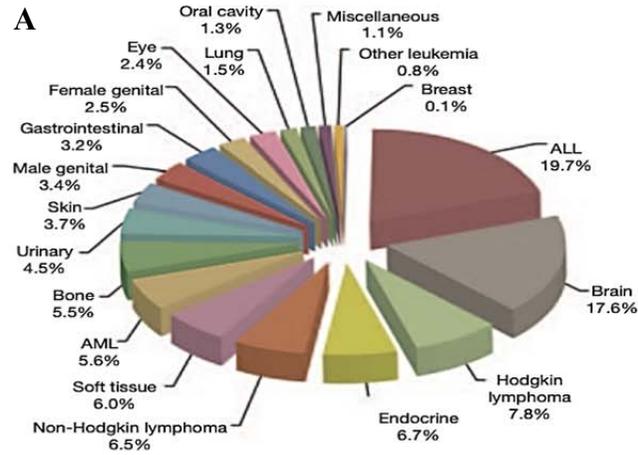
Dessa forma, as bases moleculares dos tumores pediátricos são, em certa medida, diversas daquelas de tumores de adultos, uma vez que o câncer pediátrico é uma doença do desenvolvimento. Como diferenciar a biologia tumoral de adultos e crianças? Como determinar se a senescência celular é importante ou não, uma vez que isso não se aplicaria a crianças? Quais fatores ambientais poderiam causar estresse celular? Grande parte dessas perguntas ainda não possuem respostas, entretanto grandes grupos internacionais concordam que o primeiro passo seria diferenciar o genoma dos tumores que acometem adultos dos genomas pediátricos.

O primeiro grande projeto surgiu no *St. Jude Children's Research Hospital–Washington University* (DOWNING et al. 2012), intitulado *The Pediatric Cancer Genome Project*. O espectro de cânceres que ocorrem na população pediátrica é diferente daquele observado em adultos. Por exemplo, os principais tumores cerebrais e sólidos que surgem em crianças, incluem meduloblastoma, neuroblastoma, rabdomiossarcoma, sarcoma de Ewing, osteossarcoma e tumor de Wilms, são extremamente raros em adultos (**Figura 3A**). Da mesma forma, os subtipos genéticos específicos da leucemia linfoblástica aguda - a malignidade mais comum em crianças - diferem acentuadamente entre crianças e adultos (**Figura 3B**). Esta diferença acentuada no espectro de cânceres não é inesperada, na medida em que se pensa que muitos tumores pediátricos surgem em tecidos em desenvolvimento que sofrem substancial expansão durante a formação, o crescimento e a maturação dos órgãos.

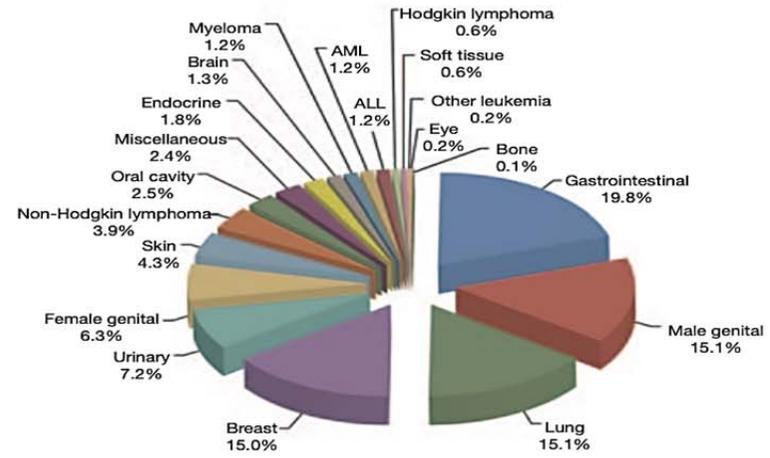
A biologia única desses tecidos em desenvolvimento sugere que o espectro de mutações que levam à transformação maligna em cânceres pediátricos diferirá do grupo de mutações de tumores de adultos, possivelmente afetando genes relacionados ao próprio processo de diferenciação celular em cada tecido.

## Tumores Pediátricos

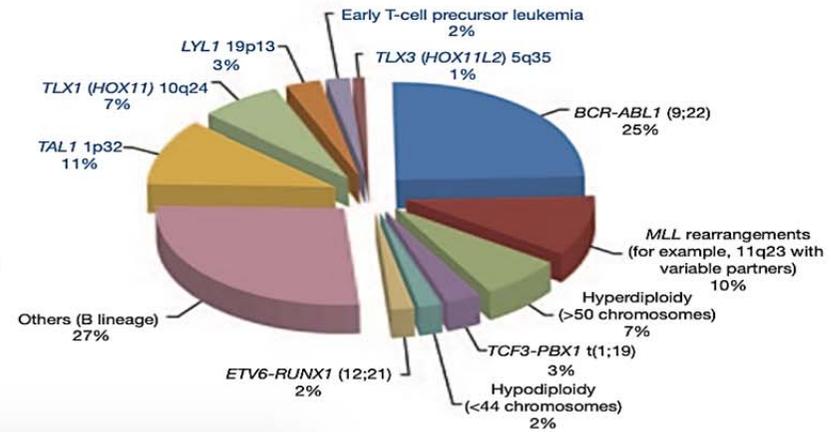
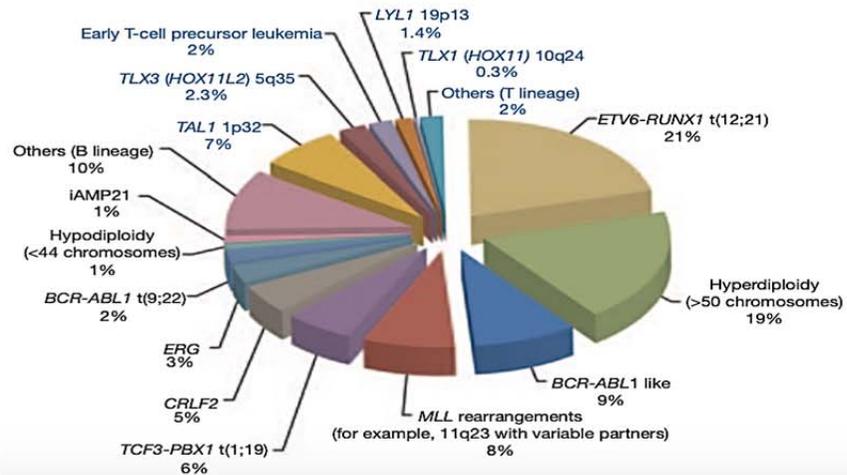
A



## Tumores Adultos



B



**Fonte:** Adaptada de DOWNING et al. (2012)

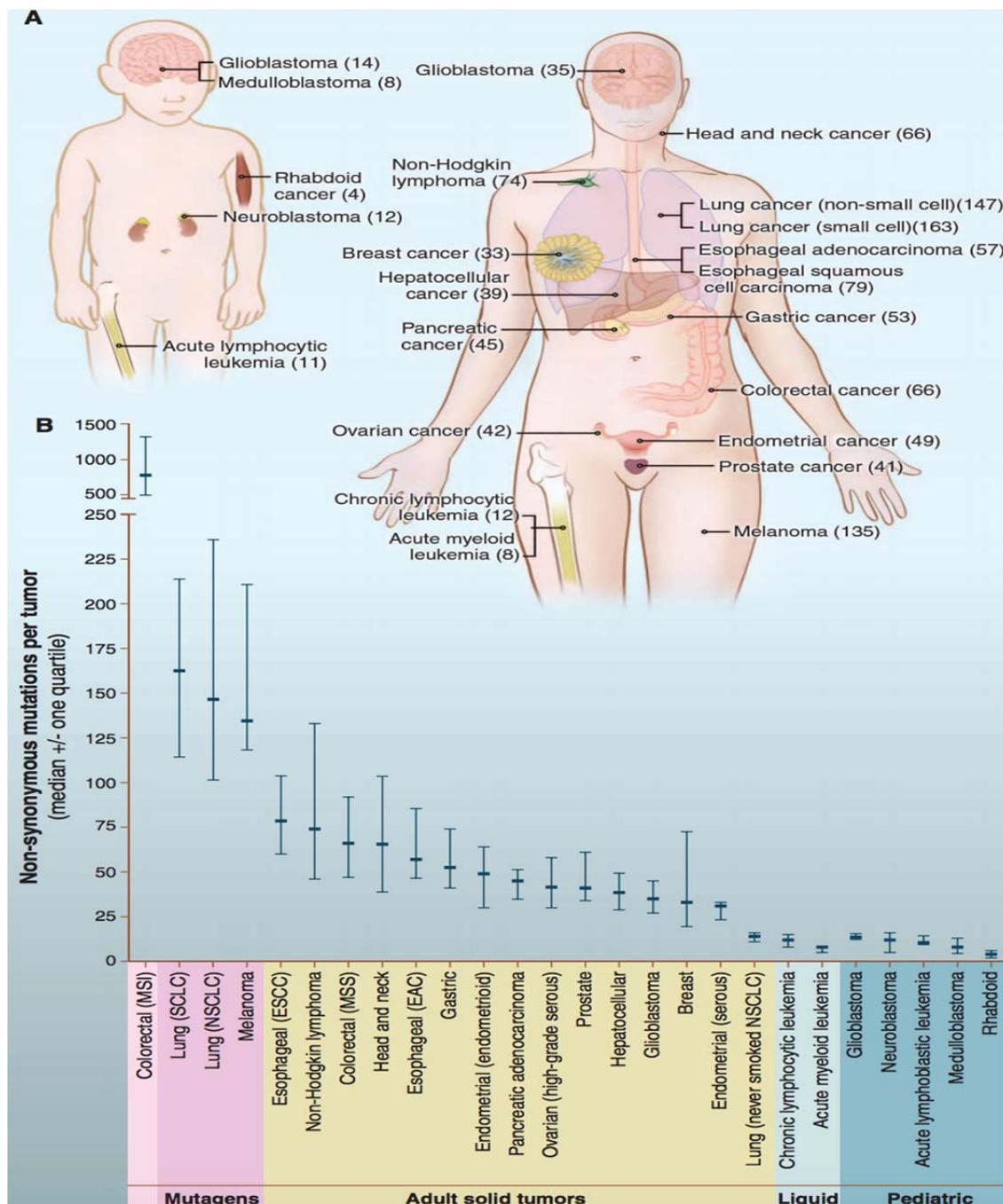
**Figura 3** - Frequência de tipos de câncer em crianças e adultos **A.** Frequência de tipos de câncer em crianças (esquerda) e adultos (direita) com base do SEER 2012. Cada gráfico é organizado com os tumores listados dos mais comuns aos menos comuns no sentido horário. **B.** Frequência de leucemia linfoblástica aguda (LLA) em crianças (esquerda) e adultos (direita), linhagens de células T (texto azul) e subtipos de linhagem de células B (texto preto).

A relevância do projeto do *St. Jude Children's Research Hospital* é reforçada por um trabalho publicado em 2013 por VOGELSTEIN et al. Este trabalho analisou os dados de sequenciamento de genoma de mais de 20 tipos de tumores, de adultos e crianças. Em tumores sólidos comuns, como aqueles derivados do cólon, mama, cérebro ou pâncreas, foram identificados em média de 33 a 66 genes que exibiam mutações somáticas em regiões codificadoras de proteínas (**Figura 4A**). Cerca de 95% dessas mutações eram substituições de base única (*single nucleotide variant* ou SNV; como C> G), enquanto o restante eram deleções ou inserções de uma ou algumas bases (*indels*; como CTT> CT). Certos tipos de tumor exibiam um padrão muito diferente em relação à média, com grande aumento ou diminuição do número de mutações (**Figura 4B**); entre esses extremos estavam os melanomas e carcinomas de pulmão, com ~200 mutações não sinônimas por tumor, números maiores que refletem a atuação de agentes mutagênicos potentes (luz ultravioleta e fumaça de cigarro, respectivamente) na patogênese. Tumores com mutações em genes de reparo de DNA também se encontravam neste extremo do espectro mutacional (GRYFE et al. 2001), podendo conter milhares de mutações não-sinônimas no exoma. No outro extremo do espectro, estão os tumores pediátricos e as leucemias, que têm muito menos mutações, em média, 9,6 por tumor.

Os autores se propuseram ainda a responder algumas questões importantes, como, por exemplo, quando essas mutações ocorrem? Baseando-se principalmente nos pontos levantados pelos estudos das *hallmarks*, VOGELSTEIN et al. (2013) tentaram entender a “causa/consequência” dessas mutações. Os tumores de adultos evoluem de lesões benignas para malignas, adquirindo uma série de mutações ao longo do tempo, um processo que tem sido particularmente bem estudado em tumores colorretais (NOWELL 1976; FEARON e VOGELSTEIN 1990). A primeira

mutação, também chamada de *gatekeeping*, proporcionaria uma vantagem seletiva de crescimento para uma célula epitelial normal ganhar malignidade. Como acima mencionado, o número de mutações em certos tumores de tecidos auto-renováveis estaria diretamente correlacionado com a idade e consequente número de divisões das células-tronco (TOMASETTI et al. 2013). Quando avaliada por meio de regressão linear, essa correlação implicaria que mais da metade das mutações somáticas identificadas nesses tumores ocorreria numa fase pré-neoplásica, durante as divisões de células-tronco normais que reabastecem continuamente os tecidos. Todas essas mutações pré-neoplásicas seriam então mutações que não têm efeito direto sobre o processo neoplásico. De acordo com VOGELSTEIN et al. (2013), essa hipótese explicaria porque um tumor colorretal em um paciente de 90 anos tem quase o dobro de mutações que um tumor colorretal morfolologicamente idêntico de um paciente com 45 anos de idade. Essa ideia também explicaria em parte porque os tumores cerebrais avançados (glioblastomas) e cânceres pancreáticos (adenocarcinomas ductais pancreáticos), que são muito agressivos, têm em geral menos mutações que tumores colorretais: as células gliais do cérebro e as células epiteliais dos ductos pancreáticos não se replicam tanto quanto as células epiteliais que revestem as criptas do cólon. Portanto, prevê-se que a mutação *gatekeeping* em um câncer pancreático ou cerebral ocorreria em uma célula precursora que contém muito menos mutações do que as presentes em uma célula precursora colorretal.

Essa linha de raciocínio também ajudaria a explicar por que tumores pediátricos têm menos mutações do que tumores de adultos, uma vez que ocorrem dentro de uma curta janela temporal. Cânceres pediátricos frequentemente ocorrem em tecidos que não são grandemente auto-renováveis após o crescimento, e aqueles que surgem em tecidos renováveis (como as leucemias) se originam de células precursoras que não se renovam tão frequentemente quanto em adultos. Além disso, os tumores pediátricos, assim como as leucemias e linfomas em adultos, podem exigir menos ciclos de expansão clonal do que os tumores sólidos em adultos (NOWELL 1976; LAURENTI et al. 2012).



Fonte: VOGELSTEIN et al. (2013)

**Figura 4** - Número de mutações somáticas não-sinônimas identificadas por estudos de sequenciamento de genoma de alguns cânceres humanos. **A**. Genomas analisados nos grupos de tumores em adultos (à direita) e pediátricos (à esquerda). Os números entre parênteses indicam o número mediano de mutações não-sinônimas por tumor. **B**. O número mediano de mutações não sinônimas por tumor de acordo com o grupo que se encontram, no eixo Y (em rosa tumores com altas cargas mutacionais; em amarelo, outros tumores sólidos em adultos; em azul claro, leucemias; em azul escuro, tumores pediátricos).

## 1.4 TUMORES EMBRIONÁRIOS

Alguns dos tumores pediátricos ocorrem muito precocemente e apresentam achados histológicos que se assemelham a tecidos fetais nos diferentes estágios de desenvolvimento, sendo chamados de tumores embrionários. Os tumores embrionários não têm ainda sua origem totalmente estabelecida, mas evidências indicam a ocorrência de falhas durante o processo normal de diferenciação ao longo do desenvolvimento fetal ou pós-natal (MARIS e DENNY 2002; MASCHIETTO et al. 2008). Este processo pode ter início em órgãos e estruturas que são acometidos por alterações moleculares durante os processos de divisão e diferenciação celular em larga escala, comuns ao desenvolvimento e crescimento. Ocorreriam mutações que conferem vantagens competitivas, como aumento na capacidade de proliferação ou de sobrevivência celular, que permitem um acúmulo de alterações adicionais e, eventualmente, originam um tumor (STRATTON et al. 2009).

Os tumores embrionários tendem a apresentar menores períodos de latência, ou seja, menor tempo decorrido entre uma presumível exposição a fatores de risco ambientais ou processos mutacionais e o surgimento da doença, sendo que a idade média ao diagnóstico varia de 1,5 a 3 anos de idade (DOWNING et al. 2012; Ministério da Saúde 2017; CZAUDERNA et al. 2018; GRÖBNER et al. 2018).

Do ponto de vista clínico, além do diagnóstico precoce, em geral crescem rapidamente, aspecto comum ao câncer infanto-juvenil, que geralmente afeta células do sistema sanguíneo ou tecidos de sustentação e são caracterizados pelo predomínio de células indiferenciadas (HAMILTON et al. 2000; MARIS e DENNY 2002; FINEGOLD et al. 2007; MASCHIETTO et al. 2008; PICKLES et al. 2018). Essa característica de maior proliferação os torna, por outro lado, tumores mais responsivos a tratamentos, sendo em sua maioria tumores de bom prognóstico (Ministério da Saúde 2017; SALETTA et al. 2014).

O **Quadro 1** indica os tumores embrionários mais frequentes e suas principais características (INCA, Coordenação de Prevenção e Vigilância 2014).

**Quadro 1** - Incidência dos principais tumores embrionários e suas características clínicas.

<b>Tipo</b>	<b>Características clínicas</b>	<b>Incidência no Brasil</b>
Neuroblastoma	Afeta os neuroblastos: células do sistema nervoso imaturas; o local mais comumente afetado são as glândulas adrenais e a idade média ao diagnóstico é de cinco anos.	~8% dos tumores pediátricos em crianças e jovens <15 anos.
Retinoblastoma	Afeta os retinoblastos: células precursoras dos fotorreceptores da retina. Pode ser detectado quando a pupila tem reflexo branco, às vezes na fotografia com flash. A idade média ao diagnóstico é de três anos.	~3% dos tumores pediátricos em crianças e jovens <15 anos.
Tumor de Wilms	O tumor de Wilms, também denominado nefroblastoma, é uma neoplasia oriunda do blastema metanéfrico. A idade média ao diagnóstico é de três anos.	~6% dos tumores pediátricos em crianças e jovens <15 anos.
Hepatoblastoma	Tumor de fígado que acomete em geral crianças menores de 3 anos de idade, presumivelmente derivado de hepatoblastos.	~2,5% dos tumores pediátricos em crianças e jovens <15 anos.

**Fonte:** Dados clínicos e epidemiológicos extraídos de DAVIDOFF et al. (2012); MARIS et al. (2007); TRUONG et al. (2015); LOPES et al. 2017; National Cancer Institute-NCI (2015 e 2018).

### 1.4.1 Tumor embrionário do Fígado: Hepatoblastoma

#### 1.4.1.1 Prevalência

Em crianças, as neoplasias hepáticas primárias são muito raras, correspondendo à 2,5% de todas as neoplasias pediátricas (SPECTOR et al. 2012; Ministério da Saúde 2017; *SEER Incidence rates 2008-2012*). Cerca de 85% destes tumores ocorrem antes dos cinco anos e os dois tipos principais são o hepatocarcinoma e o hepatoblastoma. Os hepatoblastomas são o tipo mais frequente dentre as neoplasias de fígado em crianças, correspondendo a aproximadamente 1% de todas os cânceres desta faixa etária (STILLER et al. 2006). A idade média ao diagnóstico de hepatoblastomas é de aproximadamente 3 anos (DARBARI et al. 2003).

A incidência anual de hepatoblastoma vem crescendo no mundo, em especial nos Estados Unidos. Alguns estudos indicam que essa incidência dobrou entre 1975 e 2009 (BULTERYS et al. 1999; HOWLADER et al. 2012; CZAUDERNA et al. 2018). De 1975 – 1983 a incidência era de 0,8 casos em cada um milhão de crianças

e adolescentes com menos de 19 anos; já as estatísticas de 2002- 2009 apontaram uma incidência de 1,6 casos. A causa deste aumento ainda é desconhecida, entretanto, uma das hipóteses é a de que esteja relacionado ao aumento de sobrevivência de prematuros (vide item 1.4.3. Fatores de risco ambientais e genéticos).

#### **1.4.2 Características clínicas: diagnóstico, estadiamento e tratamento do hepatoblastoma**

##### **1.4.2.1 Diagnóstico**

O diagnóstico em geral é feito pela presença de uma massa abdominal aumentada, que pode ser confirmada por ultrassonografia ou tomografia com doppler colorido. Outros sintomas incluem anorexia, perda de peso e dor (revisão em CZAUDERNA et al. 2018).

Com o avanço das técnicas de imagem, cada vez mais se recomenda procedimentos menos invasivos para diagnóstico de neoplasias (Revisão em TAM et al. 2016), em especial em pacientes pediátricos. Entretanto, em hepatoblastomas ainda se utiliza a biópsia tumoral para confirmar o diagnóstico. A biópsia permite o diagnóstico diferencial entre hepatoblastomas e hemangioma hepático infantil (GNARRA et al. 2016), hiperplasia nodular focal (VENTURI et al. 2007) ou coriocarcinoma hepático (YOON et al. 2007), patologias com tratamentos diferentes.

##### **1.4.2.2 Marcadores tumorais**

O aumento do nível de  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) no soro é o único biomarcador de hepatoblastoma (VAN TORNOUT et al. 1997), embora não seja exclusivo deste tipo tumoral. Valores de referência para indivíduos normais são 10.000 ng/mL ao nascimento e 10 ng/mL por volta de 1 ano de idade (valores extraídos do livro Diagnósticos clínicos e tratamentos por métodos laboratoriais, John Bernard Henry 2008). A AFP é uma proteína sérica fetal importante e também uma das principais proteínas carcinoembrionárias (WU et al. 2000), detectadas em tecidos fetais e tumorais, mas ausente de tecidos adultos normais, sem função fisiológica estabelecida. Suas concentrações sanguíneas ocorrem em valores de nanograma por mililitro, portanto a quantificação dessas proteínas na circulação é feita por meio de

imunoensaios. A AFP assemelha-se à albumina em muitas das propriedades físico-químicas e pode atuar como proteína de transporte ou ligação. No feto, a AFP é sintetizada pelo saco vitelino e pelos hepatócitos fetais e, em menor grau, pelos rins e trato gastrointestinal (WU et al. 1985). Apesar de não haver evidência definida sobre a relação da proteína e do hepatoblastoma, algumas hipóteses associam sua produção fisiológica no fígado fetal com a elevação nos tumores hepáticos embrionários, uma vez que, considerada a teoria de os tumores embrionários serem decorrentes de bloqueios no processo de diferenciação celular, esse erro poderia afetar o nível de AFP.

### 1.4.2.3 Histologia tumoral

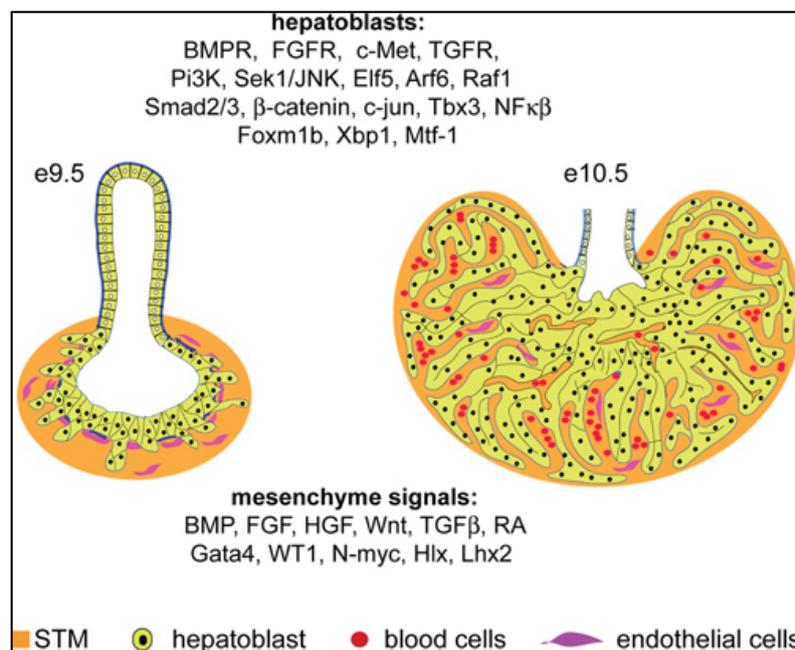
Sabe-se que o fígado é o maior órgão interno, exercendo funções metabólicas, exócrinas e endócrinas essenciais. Dentre estas estão a produção de bile, metabolismo de compostos dietéticos, desintoxicação, regulação dos níveis de glicose através do armazenamento de glicogênio e controle da homeostase do sangue por secreção de fatores de coagulação e proteínas séricas como a albumina.

Os hepatócitos são o principal tipo celular do fígado, representando ~ 70% da massa do órgão adulto. Juntamente com as células epiteliais biliares (também conhecidas como colangiócitos), os hepatócitos derivam da endoderme embrionária. Os estudos mostram que grande parte da hepatogênese é conservada evolutivamente e ocorre através de uma série progressiva de interações recíprocas entre a endoderme embrionária e a mesoderme (ZHAO e DUNCAN 2005).

A camada germinativa da endoderme é estabelecida durante a gastrulação e forma um tubo intestinal primitivo que é subdividido em regiões *foregut*, *midgut* e *hindgut*. Estudos de mapeamento no embrião de camundongo indicam que o fígado embrionário é originário da endoderme ventral do *foregut* (TREMBLAY e ZARET 2005). O primeiro sinal morfológico do fígado embrionário é a formação do divertículo hepático, uma projeção do epitélio ventral (*foregut*) espessado adjacente ao coração em desenvolvimento. A porção anterior do divertículo hepático dá origem ao fígado a partir das células de

endoderme hepática, conhecidas como hepatoblastos (HOUSSAINT 1980; MEDLOCK e HAAR 1983). Após esse momento, o fígado passa por uma fase de crescimento acelerado à medida que é vascularizado e colonizado por células hematopoiéticas, resultando no principal órgão hematopoiético fetal.

Os hepatoblastos são células bi-potenciais: uma parte residirá junto às veias porta e irá auxiliar no alinhamento dos ductos biliares intra-hepáticos, enquanto a maioria dos hepatoblastos no parênquima se diferenciará em hepatócitos. A maturação dos hepatócitos funcionais e a formação de uma rede biliar conectada aos ductos biliares extra-hepáticos são eventos graduais, iniciando durante o período embrionário e seguindo até após o nascimento para formação do órgão maduro e desenvolvimento de suas funções. Este crescimento do órgão e amadurecimento de hepatócitos são processos regulados por genes que atuam intrinsecamente nos hepatoblastos (revisão em ZORN 2008) A **Figura 5** esquematiza essa diferenciação de hepatócitos.



Fonte: ZORN (2008)

**Figura 5** - Desenvolvimento do fígado embrionário. Os esquemas retratam o início do desenvolvimento do fígado. No dia 9.5 do embrião de camundongo (à esquerda), os hepatoblastos (células amarelas) estão invadindo o septo transverso do mesênquima (STM). No dia 10.5 do embrião de camundongo (à direita), os hepatoblastos estão proliferando em "acordes" e se misturam com o mesênquima hepático; neste momento, as células hematopoiéticas (em vermelho) também colonizam o fígado. Alguns dos genes envolvidos na diferenciação e crescimento do órgão estão indicados acima e abaixo.

O hepatoblastoma provavelmente se desenvolve a partir de hepatoblastos, as células precursoras de hepatócitos e pode apresentar várias morfologias e histologias (LÓPEZ-TERRADA et al. 2014). Microscopicamente, são tumores heterogêneos, raramente compostos por apenas um tipo celular, exibindo frequentemente combinações de componentes epiteliais, estromais, mesenquimais e/ou células indiferenciadas (WEINBERG e FINEGOLD 1983). Chama-se estroma ao tecido de sustentação de um órgão, constituído predominantemente por tecido conjuntivo. A maior parte dos tecidos conjuntivos origina-se do mesoderma, mas também são originados a partir de outras estruturas embriológicas como a crista neural. Já as células epiteliais têm como função o revestimento da superfície externa e de diversas cavidades internas do organismo. A origem deste tipo celular está nos folhetos germinativos embrionários da ectoderme, mesoderme e endoderme (Revisão em SCHLESSINGER 2017).

O componente epitelial mais comum nos hepatoblastomas é o padrão embrionário, composto de células anguladas características com elevado conteúdo citoplasmático e nuclear, que se assemelham ao epitélio do fígado humano com 6-8 semanas de gestação (**Figura 6A**).

Também comumente encontrado é o padrão fetal, contendo células com núcleo central, redondo, pequeno e cromatina finamente pontilhada, com citoplasma claro ou eosinofílico misturado com aglomerados de precursores hematopoiéticos (hematopoiese extramedular) (HAAS et al. 1989; CONRAN et al. 1992). Vários estudos relataram uma correlação entre histologia fetal bem diferenciada e melhor prognóstico (KASAI et al. 1970; HAAS et al. 1989; VON SCHWEINITZ et al. 1995a; VON SCHWEINITZ et al. 1995b; SUMAZIN et al. 2017), particularmente para hepatoblastoma fetal puro com atividade mitótica mínima (WEINBERG e FINEGOLD 1983) (**Figura 6B**); no entanto, é importante ressaltar que este diagnóstico requer avaliação da amostra completa de ressecção antes de quimioterapia e não pode ser feito a partir de biópsias. O hepatoblastoma fetal pode ser bem diferenciado, mas mitoticamente ativo (**Figura 6C**), que precisa ser distinguido do padrão fetal bem diferenciado com baixa atividade mitótica, pois o primeiro requer quimioterapia, mesmo em casos de tumores ressecáveis ao diagnóstico (LÓPEZ-TERRADA et al. 2014).

Outro subtipo de hepatoblastoma foi descrito por ZIMMERMANN et al. (2002) e LIBBRECHT et al. (2003): células tumorais de hepatoblastoma com aparência fetal ou embrionária, devido à sua forma poligonal e citoplasma abundante, com características nucleares mais pleomórficas, em comparação com padrões fetais. Este padrão epitelial pleomórfico (**Figura 6D**) é incomum e mais frequentemente observado em amostras pós-quimioterapia e em metástases após a quimioterapia; pode ser difícil de distinguir do carcinoma hepatocelular, quando as células tumorais são organizadas em um padrão macrotrabecular (**Figura 6E**). Características de “anaplasia”, como tamanho de célula grande (3 a 4 vezes o de células adjacentes) e mitoses multipolares, são raras e de significado incerto no hepatoblastoma, mas devem ser documentadas.

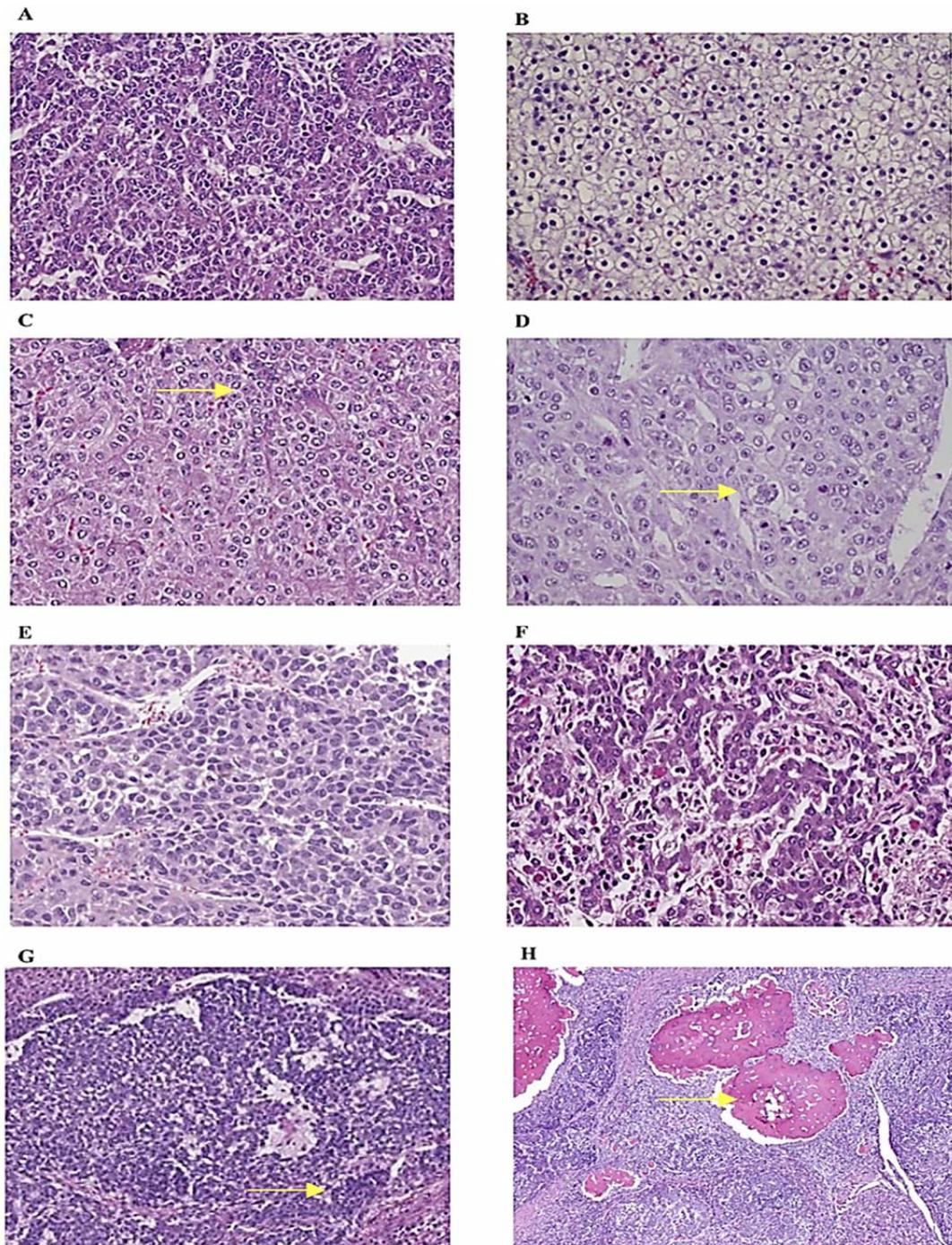
Células neoplásicas de hepatoblastoma podem ocasionalmente apresentar diferenciação colangioblástica (**Figura 6F**), expressando marcadores de colangiócitos (citoqueratinas 7 e 19) (ZIMMERMANN et al. 2002; LIBBRECHT et al. 2003). O estudo da expressão da proteína  $\beta$ -catenina pode ser muito útil para diferenciar este componente colangioblástico das estruturas tubulares encontradas em embriões, especialmente em espécimes pós-quimioterapia, quando a proliferação ductal reativa é comum, já que os ductos neoplásicos geralmente demonstram positividade nuclear em oposição à expressão membranosa em ductos benignos, quando analisados por imunohistoquímica. O diagnóstico diferencial do hepatoblastoma colangioblástico pode incluir outros tumores da placa ductal, colangiocarcinoma intra-hepático pediátrico e tumor epitelial estromal no fígado (HEEREMA et al. 2005; HILL et al. 2005).

Os hepatoblastomas podem conter pequenas células redondas (ligeiramente maiores que os linfócitos), com citoplasma escasso, cromatina nuclear fina e atividade mitótica mínima. Estas células podem ser encontradas misturadas a outros tipos de células epiteliais, formando ninhos em um padrão quase organóide. Essas pequenas células podem apresentar imunorreatividade variável para pancitoqueratina, citoqueratinas 8 e 18 e vimentina, mas não expressam AFP (ZYNGER et al. 2008). Em casos raros, o tumor inteiro é composto por esse tipo de célula pequena (hepatoblastoma anaplásico - **Figura 6G**). Esse grupo de tumores geralmente é diagnosticado em lactentes e é caracterizado por níveis séricos baixos

ou normais de AFP (DE IORIS et al. 2008; TROBAUGH-LOTRARIO et al. 2009), biologia agressiva (FEUSNER et al. 1993; DOUGLASS et al. 1993; HAAS et al. 2001) e pior sobrevida (HAAS et al. 1989; ORTEGA et al. 2000; TROBAUGH-LOTRARIO et al. 2009).

Os hepatoblastomas mistos são caracterizados pela presença de componentes epiteliais e mesenquimais. Esses derivados do estroma podem incluir células fusiformes primitivas (blastema), osteóide, músculo esquelético e cartilagem (WEINBERG e FINEGOLD 1983) (**Figura 6H**).

As amostras cirúrgicas pós-quimioterapia geralmente demonstram alterações regressivas, necrose tumoral e alterações citológicas e podem se apresentar como um desafio na avaliação do tumor persistente. As alterações pós-quimioterapia podem incluir a presença de osteóide ou tecido conjuntivo, mimetizando um hepatoblastoma misto, bem como diferenciação colangioblástica (WANG et al. 2010).



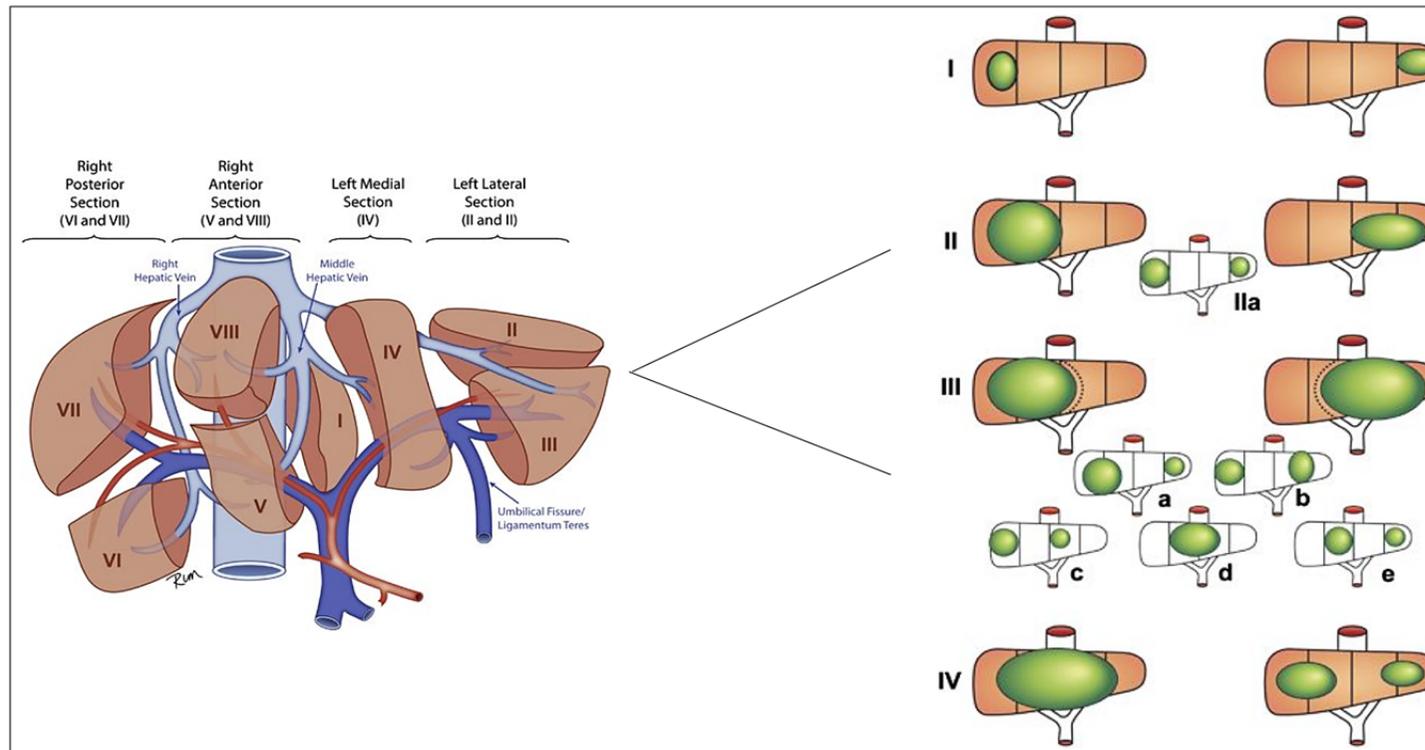
Fonte: Adaptado de LÓPEZ-TERRADA et al. (2014)

**Figura 6** - Subtipos histológicos de hepatoblastoma. **A.** Epitelial embrionário. **B.** Epitelial fetal bem diferenciado. **C.** Epitelial fetal bem diferenciado com atividade mitótica (região indicada pela seta amarela) **D.** Pleomórfico: células (indicada pela seta amarela) de forma poligonal e citoplasma abundante, com características nucleares mais pleomórficas. **E.** Hepatoblastoma com focos macrotrabeculares. **F.** Hepatoblastoma colangioblástico. **G.** Hepatoblastoma anaplásico: células pequenas, com pouco citoplasma, formando ninhos (seta amarela). **H.** Hepatoblastoma epitelial e mesenquimal misto (componente osteóide indicado pela seta amarela).

#### 1.4.2.4 Estratificação de risco de hepatoblastomas

O conhecimento da divisão hepática descrita por Couinaud no artigo de Anatomia do Fígado e Cirurgia de 1994, definindo a segmentação hepática a partir da divisão da veia porta, é fundamental para os procedimentos cirúrgicos hepáticos, já que a hemorragia é a complicação operatória mais comum (revisão em GERMAIN et al. 2014). Essa divisão hepática também auxiliou na criação de sistemas de estratificação de risco baseados em imagem.

O sistema PRETEXT (*PRE-Treatment EXTent of disease*) foi desenvolvido pela SIOPEL (*Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique – Epithelial Liver Tumor Study Group*) para estadiamento e estratificação de risco de tumores do fígado (MACKINLAY e PRITCHARD 1992; PRITCHARD et al. 2000). O PRETEXT é usado para descrever a extensão do tumor antes de qualquer terapia, permitindo assim uma comparação mais eficaz entre os estudos realizados por diferentes grupos. O fígado é virtualmente dividido em quatro setores e o tumor é classificado em quatro categorias, a depender da quantidade de setores acometidos pelo tumor e da proximidade entre eles, do envolvimento do sistema porta hepático e do acometimento de linfonodos ou metástases. A **Figura 7** ilustra as extensões esperadas para tumores classificados em cada um dos quatro grupos.



Fonte: MEYERS et al. (2012).

**Figura 7** - Representação esquemática da segmentação anatômica do fígado. O estadiamento PRETEXT é baseado no sistema de segmentação do fígado de Couinaud (à esquerda). Os segmentos do fígado são agrupados em quatro seções: segmentos II e III (seção lateral esquerda), segmento IV (seção medial esquerda), segmentos V e VIII (seção anterior direita) e segmentos VI e VII (seção posterior direita). O número PRETEXT foi derivado subtraindo o maior número de seções de fígado contíguas que não estavam envolvidas por tumor. Esse número é, grosso modo, uma estimativa da dificuldade do procedimento cirúrgico esperado. As definições são (imagem à direita): I - Uma seção está envolvida e três seções adjacentes estão livres da doença; II - Uma ou duas seções estão envolvidas, mas duas seções adjacentes estão livres da doença; III - Duas ou três seções estão envolvidas e não há duas seções adjacentes livres, como indicado nas imagens a, b, c, d, e; IV - Todas as quatro seções estão comprometidas.

Além de descrever a extensão intra-hepática do tumor primário, o sistema PRETEXT inclui alguns outros critérios, que avaliam o envolvimento da veia cava inferior, artérias hepáticas, envolvimento da veia porta, doença abdominal extra-hepática e metástases à distância.

Existem diferenças significativas entre os grupos de estudo de câncer infantil na estratificação de risco usada para determinar o tratamento. Este tipo de abordagem diferente dificulta a comparação dos resultados dos tratamentos administrados. O **Quadro 2** demonstra a variabilidade nas definições dos grupos de risco dos principais estudos.

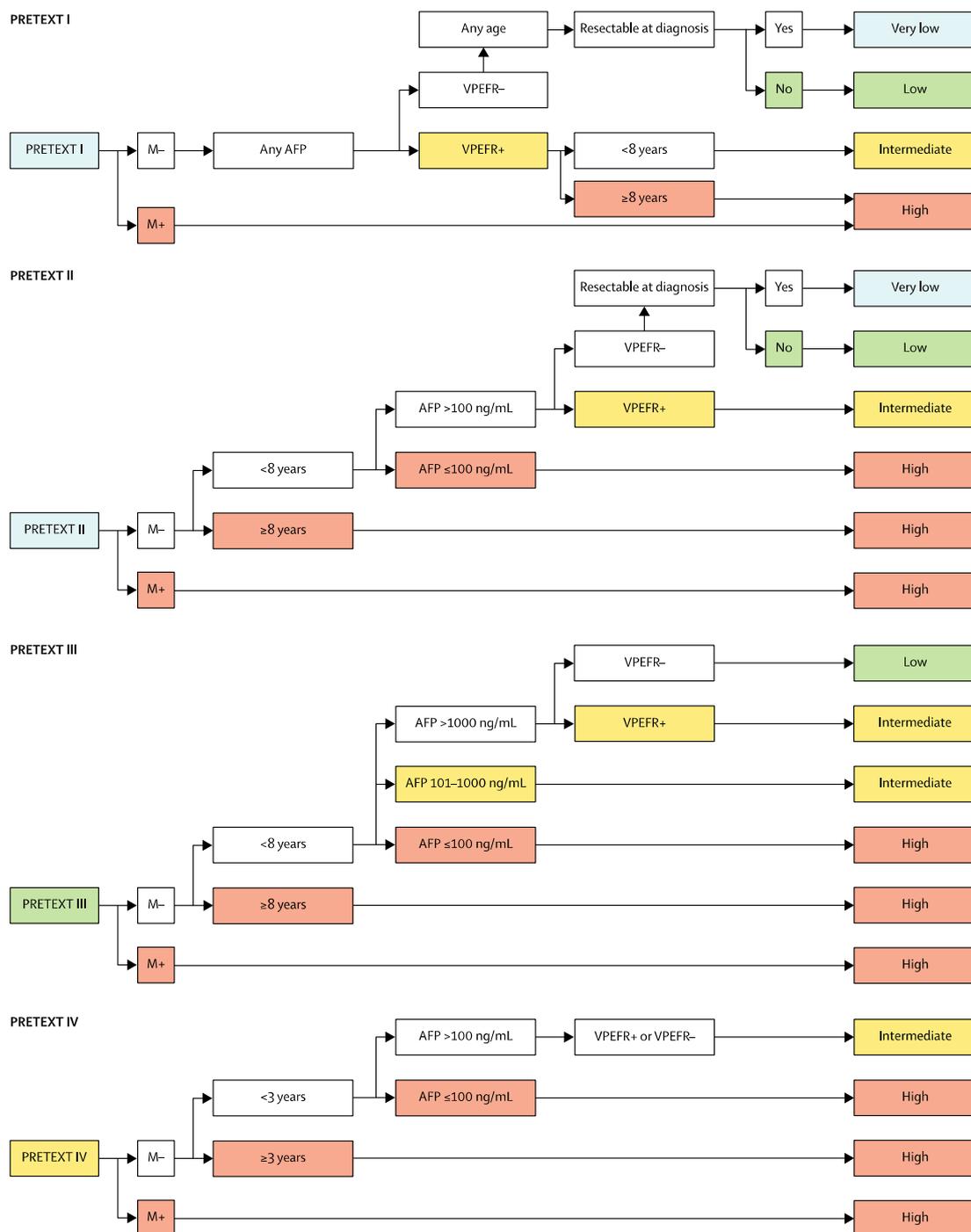
**Quadro 2** - Comparação do uso de PRETEXT em diferentes esquemas de estratificação de risco para hepatoblastoma.

	COG (AHEP-0731)	SIOPEL	GPOH	JPLT (JPLT2 e 3)
<b>Risco muito baixo</b>	PRETEXT I ou II; histologia epitelial fetal; ressecável ao diagnóstico.	(SIOPEL3, 3HR, 4, 6)		
<b>Baixo risco</b>	PRETEXT I ou II; não importa a histologia; ressecável ao diagnóstico.	PRETEXT I, II, ou III	PRETEXT I, II, ou III	PRETEXT I, II, ou III
<b>Risco intermediário</b>	PRETEXT II, III ou IV; não ressecável ao diagnóstico; V+ P+ E+ histologia HB anaplásico.			PRETEXT IV ou qualquer PRETEXT com ruptura tumoral; V+ P+ E+ ou F+.
<b>Alto risco</b>	Qualquer PRETEXT com M+; AFP <100 ng/mL.	Qualquer PRETEXT; V+, P+, E+, M+; histologia HB anaplásico; AFP <100 ng/mL; R+	Qualquer PRETEXT com V+ P+ E+ F+ M+	Qualquer PRETEXT M+; AFP <100 ng/mL

**Fonte:** Quadro adaptado de CZAUDERNA et al. (2014). COG: *Children's Oncology Group*; GPOH: *Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie* (Sociedade alemã de pediatria oncológica e hematológica); JPLT: *Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor*; V: envolvimento da veia cava ou das veias hepáticas; P: Bifurcação da veia porta; E: doença extra-hepática; F: Tumor multifocal; R: Ruptura tumoral; M: metástase; +: presença da característica.

Uma colaboração multicêntrica teve por objetivo reunir os dados clínicos dos pacientes a fim de estabelecer um critério internacional para estratificação e tratamento (CZAUDERNA et al. 2016). O *The Children's Hepatic Tumors International Collaboration-CHIC* envolveu os quatro maiores centros de tratamento de hepatoblastoma das duas últimas décadas: COG, SIOPEL, GPOH e JPLT. Com o apoio do grupo de gerenciamento de dados CINECA (*Consorzio interuniversitario per la gestione del Centro di calcolo elettronico dell'Italia nord-orientale*), o CHIC desenvolveu uma plataforma online centralizada na qual os dados de oito ensaios clínicos foram mesclados para formar um banco com 1.605 casos de hepatoblastoma tratados entre 1988 e 2010.

A primeira análise unificada deste estudo foi divulgada em 2017 por MEYERS et al. Os fatores prognósticos considerados na análise foram PRETEXT; faixas etárias diferentes (idade menor que 3 anos, idade entre 3-7 anos e idade superior a 8 anos); concentração de AFP igual ou inferior a 100 ng/mL, entre 101-1000 ng/mL e acima de 1000 ng/mL; os fatores de anotação PRETEXT, como doença metastática (M), envolvimento macrovascular de todas as veias hepáticas (V) ou bifurcação da veia porta (P), tumor extra-hepático (E), tumor multifocal (F) e ruptura espontânea (R). Foram definidos como aspectos clinicamente relevantes: PRETEXT IV; positividade dos fatores de anotação do PRETEXT (incluindo metástase); concentração de AFP  $\leq$  100 ng/mL ao diagnóstico e pacientes com mais de 8 anos de idade. Uma avaliação da ressecabilidade cirúrgica no momento do diagnóstico foi adicionada para pacientes com PRETEXT I e II. Adicionalmente, foi realizada uma análise de multivariáveis em cada subgrupo e de acordo com os resultados foram determinados quatro grupos de estratificação de risco: muito baixo, baixo, intermediário e alto. Sexo, prematuridade, baixo peso ao nascimento e síndromes como Beckwith-Wiedemann não foram significativos nessa estratificação (CZAUDERNA et al. 2016). Os riscos foram determinados seguindo as características do fluxograma apresentado na **Figura 8**.



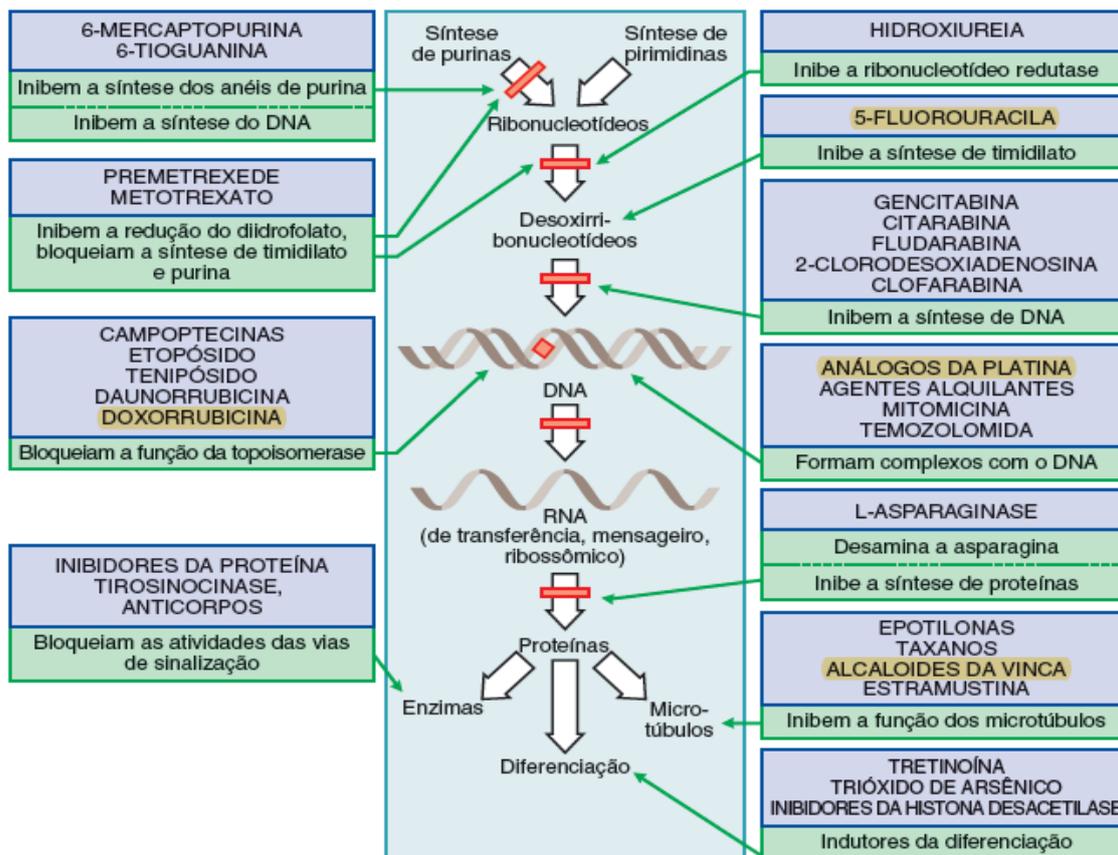
Fonte: CZAUDERNA et al. (2016), MEYERS et al. (2017)

**Figura 8** - Esquema de estratificação de risco para tumores hepáticos infantis de acordo com CHIC. Para estratificação de risco, o primeiro dado avaliado é a categoria PRETEXT, depois presença de metástase (M+ e M-); para PRETEXT I é avaliado a dosagem de AFP e para os demais grupos a idade do paciente. Após esta análise, são considerados os fatores adicionais (presentes ou ausentes): envolvimento macrovascular de todas as veias hepáticas (V) ou bifurcação da veia porta (P), tumor extra-hepático (E), tumor multifocal (F) e ruptura espontânea (R).

#### 1.4.2.5 Tratamento

Em relação ao tratamento, a cirurgia é o fator preponderante, com indicação de ressecção completa do tumor; entretanto, existem hepatoblastomas irresssecáveis em função do tamanho e grau de envolvimento do fígado (MEYERS et al. 2014). Na década de 80 foram implementados pela SIOPEL regimes de tratamento quimioterápico neoadjuvante para tumores hepáticos, derivados de estudos prospectivos randômicos que preconizam principalmente a utilização de cisplatina, frequentemente em associação com doxorubicina, dois potentes ligantes de DNA com efeitos citotóxicos (ZSIROS et al. 2010; CZAUDERNA et al. 2012; MEYERS et al. 2014).

Um estudo clínico randomizado de ORTEGA et al. (2000) demonstrou a eficácia pós-operatória dos dois esquemas quimioterápicos: 1) o primeiro esquema denominado de CVF usou os fármacos Cisplatina, Vincristina e Fluorouracila (5-FU); e 2) no segundo esquema quimioterápico denominado de CD, administrou-se Cisplatina e Doxorubicina. Esse estudo demonstrou como resultado que não houve diferenças na eficácia de ambos esquemas; entretanto, o esquema CVF causou menos toxicidade. A Cisplatina e a Carboplatina ligam-se de forma covalente a sítios nucleofílicos no DNA e compartilham muitos atributos farmacológicos com os agentes alquilantes (KRUH 2003). A Vincristina é um agente farmacológico específico do ciclo celular que inibe ou antagoniza as células em mitose, por meio de ligação com  $\beta$ -tubulina que bloqueia sua polimerização com  $\alpha$ -tubulina em microtúbulos durante a mitose. A Fluorouracila interfere na síntese de DNA inibindo a metilação do ácido desoxiuridílico para ácido timidílico, sendo indicado para tratamento de carcinomas (DINEHART 2000). A Doxorubicina é um análogo das antraciclinais naturais, possuindo a capacidade de intercalar-se com o DNA, afetando diretamente a transcrição e a replicação e levando à apoptose (CHABNER 2012)). Os diferentes fármacos usados nos esquemas terapêuticos têm seus mecanismos de ação ilustrados na **Figura 9**.



Fonte: CHABNER (2012)

**Figura 9** - Resumo dos mecanismos e locais de ação dos principais agentes quimioterápicos. Os fármacos utilizados no tratamento quimioterápico de hepatoblastomas estão destacados em amarelo.

A quimioterapia neoadjuvante auxilia tanto na redução de massa tumoral quanto na diminuição de hemorragia durante o procedimento cirúrgico. Este tipo de intervenção ocasionou um aumento da sobrevida de cinco anos de 33% (1981-1985) para 65% (1991-1995), tornando-se então mundialmente adotada. Nos casos que apresentam boa resposta à quimioterapia, com redução de massa tumoral e de níveis de AFP, segue-se o protocolo de ressecção completa do tumor por cirurgia (MEYERS et al. 2014). A ressecção parcial do tumor é desaconselhada, tendo em vista que pacientes com tumores residuais apresentam rápida progressão da doença e não respondem bem à quimioterapia (PERILONGO et al, 2000). O transplante hepático deve ser considerado para pacientes com tumores irresssecáveis mesmo após a quimioterapia (PRITCHARD et al. 2000; REYES et al. 2000; OTTE et al. 2004; PHAM et al. 2015).

Como o fígado possui capacidade de se regenerar, estudos associados com a prática clínica indicam que até 85% do órgão pode ser ressecado com segurança (STRINGER et al. 1995; revisão em GERMAIN et al. 2014). De acordo com levantamentos do CHIC (CZAUDERNA et al. 2016; MEYERS et al. 2017), aproximadamente 20% a 30% das crianças com hepatoblastoma têm doença ressecável no momento do diagnóstico. O mesmo levantamento apontou que nos últimos anos quase todas as crianças com hepatoblastoma foram tratadas com quimioterapia neo e pós- adjuvante, o que elevou a sobrevida global de 5 anos para aproximadamente 80% (PERILONGO et al. 2012; TROBAUGH-LOTRARIO et al. 2012). Essa estatística se aplica, em média, para outros países que não estavam nos dados avaliados pelo CHIC, como o Brasil. De acordo com o relatório do INCA (Ministério da Saúde 2017), a taxa de sobrevida global em cinco anos foi de 70%.

O prognóstico de pacientes com hepatoblastoma metastático ao diagnóstico não é favorável, mas a sobrevida a longo prazo e a cura são possíveis (DOUGLASS et al. 1993; ORTEGA et al. 2000; National Cancer Institute-NCI 2015, 2018). As taxas de sobrevivência em 5 anos desses casos variam de 20% a 60% (PERILONGO et al. 2000; ZSÍROS et al. 2010). Metástases de hepatoblastomas em geral ocorrem em linfonodos regionais, pulmões e abdômen, menos frequentemente em estruturas ósseas e sistema nervoso central (Revisão em CZAUDERNA et al. 2018). O tratamento de casos metastáticos é avaliado individualmente, mas no geral se baseia em quimioterapia seguida de reavaliação da ressecabilidade cirúrgica. Se a doença metastática extra-hepática não é ressecável ou o paciente não é candidato a transplante, o tratamento pode incluir quimioterapia adicional ou radioterapia (PERILONGO et al. 2000; MEYERS et al. 2007).

Recidivas (retorno do hepatoblastoma no fígado) ocorrem em menos de 12% dos pacientes tratados com quimioterapia (MEYERS et al. 2014). O prognóstico para um paciente com hepatoblastoma progressivo (doença em avanço desde o diagnóstico) ou recorrente (recidiva da doença após quimioterapia e cirurgia) depende de vários fatores, incluindo local de recorrência, tipo do tratamento anterior, além de considerações individuais do paciente. Baseado nisso, são designadas novas combinações de esquema quimioterápico, de radioterapia, ou tratamentos paliativos

(MATSUNAGA et al. 2003; SEMERARO et al. 2013; TROBAUGH-LOTRARIO et al. 2016).

### **1.4.3 Fatores de risco ambientais e genéticos do hepatoblastoma**

Diversos estudos investigam o papel de eventos ambientais durante a gestação que poderiam estar relacionados de maneira causal ao desenvolvimento de hepatoblastomas (revisão em SPECTOR et al. 2012 e revisão em AGUIAR et al. 2017). Dentre tais estudos, todos com casuística composta por menos de 200 casos, vários fatores ambientais já foram apontados, embora poucos com robustez de associação em decorrência do número pequeno de casos. Dentre eles, podemos citar pré-eclâmpsia (ANSELL et al. 2005), sobrepeso materno pré-gestacional (MCLAUGHLIN et al. 2006; PU et al. 2009), tratamento para infertilidade (MCLAUGHLIN et al. 2006), tabagismo e baixo peso ao nascimento. Os fatores associados de maneira mais consistente a aumento de risco de hepatoblastoma são uso de tabaco antes e durante a gravidez e baixo peso ao nascimento, este último relacionado ou ocasionado por diversos fatores, inclusive tabagismo materno.

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC - *The International Agency for Research on Cancer*) classificou o hepatoblastoma como um câncer relacionado ao tabaco (SECRETAN et al. 2009). No entanto, apenas três dos sete estudos de caso-controle mostraram que o tabagismo materno é um fator de risco independente para o hepatoblastoma quando se ajusta os valores para pacientes com baixo peso ao nascimento (BUCKLEY et al. 1989; HORTA et al. 1997; PANG et al. 2003; SORAHAN et al. 2004; MCLAUGHLIN et al. 2006; DE FINE et al. 2012; JOHNSON et al. 2013). O que se estuda atualmente é como o tabagismo materno está associado ao baixo peso ao nascimento de maneira geral, que aumentaria o risco de hepatoblastoma.

Atualmente, além do baixo peso ao nascer, a prematuridade também é uma condição considerada associada ao desenvolvimento do hepatoblastoma (TURCOTTE et al. 2014). No Japão, o risco relatado para o desenvolvimento de hepatoblastoma em crianças que nascem com menos de 1000g é 15 vezes maior do que para crianças que nascem com o peso normal (TANIMURA et al. 1998). Prematuros são expostos a uma série de drogas durante sua permanência em UTI e

em 2014, TURCOTTE et al. reuniram os principais estudos sobre este tema, buscando correlação com o aumento de risco para o desenvolvimento de hepatoblastomas; entretanto nenhuma relação foi encontrada, além do baixo peso inerente à condição de prematuridade.

Alterações germinativas ou constitutivas em genes de predisposição a câncer podem antecipar o acometimento tumoral (FUTREAL et al. 2004; LINDOR et al. 2008; KREPISCHI et al. 2012; SILVA et al. 2013; GREEN et al. 2017). As estimativas indicam que entre 25-30% dos casos de tumores pediátricos seriam causados por causas genéticas constitutivas herdadas ou mutações *de novo*, como em síndromes de predisposição a câncer (SCHIFFMAN et al. 2013), incluindo também síndromes de doenças genéticas congênitas. Síndromes genéticas, como Beckwith-Wiedemann (BWS) e polipose adenomatosa familiar (FAP), causadas por mutações germinativas em genes conhecidos, apresentam, entre outros sinais clínicos, predisposição aumentada à ocorrência deste tipo de câncer (revisão em SPECTOR et al. 2012 e revisão em AGUIAR et al. 2017).

A polipose adenomatosa familiar (FAP) é associada a aumento de risco de hepatoblastoma (KINGSTON et al. 1983; GARBER et al. 1988). O risco estimado de desenvolvimento de hepatoblastoma em portadores da FAP é de 0,5% (HUGHES et al. 1992; ARETZ et al. 2006; revisão em TROBAUGH-LOTRARIO et al. 2018). A FAP é decorrente de mutações germinativas no gene *APC* que levam ao desenvolvimento de múltiplos pólipos no cólon a partir da adolescência, com progressão para câncer de cólon na idade adulta. Em um estudo com 93 casos de hepatoblastomas, oito (8,6%) relataram histórico familiar de câncer de cólon com início precoce, ou múltiplos pólipos colônicos em membros da família, consistente com um diagnóstico de FAP. A análise desses casos levou à detecção de mutações ou deleções germinativas no gene *APC* (HIRSCHMAN et al. 2005; revisão em SPECTOR et al. 2012). O reconhecimento da FAP em crianças com hepatoblastoma é fundamental para o acompanhamento adequado dos sobreviventes a longo prazo. Além disso, pode permitir a avaliação de risco para o desenvolvimento de pólipos e câncer colorretal na família, pela investigação genética de outros membros (revisão em TROBAUGH-LOTRARIO et al. 2018).

A síndrome de Beckwith-Wiedemann é um distúrbio de crescimento caracterizado por macrosomia, macroglossia, visceromegalia, entre outros sinais clínicos, e está associada com predisposição ao desenvolvimento de tumores embrionários, incluindo tumor de Wilms, neuroblastoma, carcinoma adrenocortical e hepatoblastoma (WIEDEMANN et al. 1964; BECKWITH et al. 1969; publicado por HOOFT 1969). Os defeitos moleculares subjacentes à síndrome de Beckwith-Wiedemann envolvem alterações no mecanismo de *imprinting* do segmento de 11p15.5 que contém os genes *H19* e *IGF2* (BLIEK et al. 2004). O risco relativo de desenvolvimento de hepatoblastoma em Beckwith-Wiedemann parece ser 2-3 vezes maior do que na população (DEBAUN et al. 1998).

Outra síndrome de aumento de crescimento associada com o desenvolvimento de hepatoblastoma é a síndrome de Simpson-Golabi-Behmel, que compartilha sinais clínicos com BWS e é causada por mutações no gene *GPC3*, localizado em Xq26 (TORETSKY et al. 2001; BUONUOMO et al. 2005; ZYNGER et al. 2008). Houve descrição também de hepatoblastoma em pacientes com síndrome de Sotos, outra doença genética com características de crescimento aumentado, que é causada por mutação ou deleção do gene *NSDI* (KATO et al. 2009).

Assim, diversas síndromes de aumento de crescimento reconhecidamente apresentam, dentre seus sinais clínicos, predisposição ao desenvolvimento de tumores embrionários, incluindo hepatoblastomas: síndrome de Sotos, Beckwith-Wiedemann, Fraser e Simpson-Golabi-Behmel. A ocorrência de predisposição ao desenvolvimento de hepatoblastomas em síndromes genéticas de aumento de crescimento originou uma teoria acerca de sobreposição tanto fenotípica quanto molecular nestes pacientes (MUSSA et al. 2010). Na verdade, a sobreposição fenotípica entre Sotos e a Síndrome de Beckwith-Wiedemann pode ocorrer. É notável que a sobreposição molecular também tenha sido demonstrada, com alterações epigenéticas em 11p15.5 nos fenótipos relacionados à Sotos e mutações em *NSDI* nos fenótipos de Beckwith-Wiedemann (BAUJAT et al. 2004). Esses achados levaram à especulação de que a proteína NSD1, uma metiltransferase de histona envolvida na regulação gênica, poderia estar envolvida no estabelecimento ou manutenção do *imprinting* genômico de 11p15.5.

Em 2009, KAMIEN et al. descreveram associação entre a Síndrome de Aicardi e hepatoblastoma, com base em um único caso. A síndrome de Aicardi é uma doença genética rara caracterizada pela ausência parcial ou total do corpo caloso, anomalias na retina e convulsões. Outros danos neurológicos que podem ser encontrados nos portadores da doença incluem o alargamento do sistema ventricular e hidrocefalia (AICARDI 1969; AICARDI 1999). A causa genética da síndrome é ainda desconhecida, mas apenas mulheres são afetadas, indicando herança ligada ao cromossomo X.

Adicionalmente, duas ocorrências de hepatoblastoma em populações asiáticas foram descritas em famílias com síndrome de Li-Fraumeni (SAMESHIMA et al. 1992; TOGUCHIDA et al. 1992), que é causada por mutações germinativas no gene *TP53*; finalmente, houve descrição de irmãos com doença recessiva de armazenamento de glicogênio com desenvolvimento de hepatoblastoma (ITO et al. 1987). Em 2016, PINTO et al. publicou um caso de paciente brasileiro com doença de Hirschprung e hepatoblastoma (única descrição na literatura científica).

A associação de hepatoblastoma e Trissomia do cromossomo 18 (Síndrome de Edwards) foi descrita em alguns casos (DASOUKI et al. 1987; BOVE et al. 1996; MARUYAMA et al. 2001; KITANOVSKI et al. 2009); considerando a raridade de ambas as condições clínicas, foi levantada a hipótese de associação entre a aneuploidia do cromossomo 18 e predisposição a hepatoblastomas.

É interessante observar que JOHNSON et al. (2017) realizaram uma revisão sistemática de mais de 14 mil artigos relacionados com fatores de risco em tumores pediátricos. A presença de anomalias congênitas foi o fator mais comumente associado, que estaria então relacionada com aumento de risco de desenvolvimento de tumor pediátrico em geral, incluindo hepatoblastomas.

#### **1.4.4 Alterações no genoma de hepatoblastomas**

##### **1.4.4.1 Citogenética**

As alterações citogenéticas mais comuns em hepatoblastoma são ganho ou perda de cromossomos inteiros (aneuploidias). No entanto, ainda não está bem estabelecido se o que contribui para a tumorigênese de hepatoblastomas são as alterações no número de cópias (e, portanto, dosagem) de genes específicos

mapeados nessas aneuploidias ou se as próprias alterações cromossômicas já refletiriam erros mitóticos inerentes ao desenvolvimento destes tumores (SOUKUP et al. 1991; TONK et al. 1994; TOMLINSON et al. 2005). Rearranjos cromossômicos estruturais também foram observados em hepatoblastomas, como por exemplo a translocação recorrente der(4)t(1;4)(q12;q34) descrita por SCHNEIDER et al. (1997) em três casos.

Os ganhos cromossômicos mais comuns afetam os cromossomos 2, 8, e 20, ao passo que a aneuploidia de perda mais comumente detectada é a do cromossomo 18 (revisão em CZAUDERNA et al. 2014 e AGUIAR et al. 2017). Um trabalho do nosso grupo (RODRIGUES et al. 2014) avaliou o padrão de alterações cromossômicas de ganhos e perdas em nove amostras de hepatoblastomas esporádicos, incluídos neste presente estudo também, utilizando o método de hibridação comparativa de genomas em microarranjos (array-CGH). Além de aneuploidias levando a ganhos em 1q, 8 e 20, a análise revelou ganho recorrente de 2q, incluindo uma alteração focal de amplificação em 2q24. Estudos anteriores já haviam identificado ganhos em 2q24 em hepatoblastomas (KUMON et al. 2001; ARAI et al. 2010), e nosso achado restringiu o segmento genômico amplificado para uma região de ~10 Mb contendo 48 genes. Dentre tais genes, dois deles, *DAPL1* e *ERMN*, exibiram aumento de expressão nos tumores em relação ao fígado não-tumoral, sendo então sugeridos como potencialmente relevantes para a tumorigênese de hepatoblastomas.

#### 1.4.4.2 Epigenética

O termo epigenética é utilizado para definir modificações bioquímicas na cromatina que controlam a expressão gênica sem, no entanto, serem decorrentes de alteração na sequência de DNA (FEINBERG et al. 2006; WAGGONER et al. 2007; revisão em ATLASI et al. 2017). Os mecanismos epigenéticos incluem a metilação do DNA, mudanças na conformação da cromatina mediadas por alterações em histonas, assim como regulação gênica por RNAs longos não-codificadores de proteínas (revisão BROOKES et al. 2014; revisão em FLAVAHAN et al. 2017).

No câncer, a alteração epigenética mais estudada tem sido os perfis aberrantes de metilação do DNA quando comparado ao tecido normal de origem. A

hipometilação global do DNA foi a primeira anormalidade epigenética identificada em câncer (FEINBERG e VOGELSTEIN 1983a). Por outro lado, a hipermetilação de *loci* específicos em câncer está em geral relacionada ao silenciamento transcricional de muitos supressores tumorais, em especial quando ocorre em ilhas CpG mapeadas nos promotores de tais genes. Desde a descoberta da hipermetilação da região promotora do gene *RB* em retinoblastoma (GREGER et al. 1989), muitos supressores de tumor têm sido descritos como hipermetilados em amostras tumorais. A hipometilação de ilhas CpG localizadas em promotores de oncogenes pode, ao contrário, levar à ativação destes genes, promovendo a proliferação celular; este mecanismo foi descrito, por exemplo, para o oncogenes *HRAS* (FEINBERG e VOGELSTEIN 1983b).

Vários trabalhos estudaram alterações na metilação do DNA em hepatoblastomas, possivelmente relacionadas ao silenciamento de alguns genes, tais como o *SFRP1* e o *APC*, devido à hipermetilação de seus promotores (SAKAMOTO et al. 2010). Alterações de metilação do gene *SOCS1* já foi associada com a histologia fetal do tumor (HONDA et al. 2008), de *CASP8* com a recorrência da doença (HONDA et al. 2016), de *MTIG* com prognóstico ruim (SAKAMOTO et al. 2010) e, mais notavelmente, a metilação de *RASSF1A* já foi correlacionada com diversas características diferentes, tais como idade mais tardia ao diagnóstico, estadiamento tumoral avançado, pior prognóstico e resistência à cisplatina na quimioterapia (SUGAWARA et al. 2007).

Um estudo prévio do nosso grupo (MASCHIETTO et al. 2016) fez análise de metilação global (plataforma 450k Illumina) de oito hepatoblastomas e seus respectivos tecidos hepáticos não tumorais (incluídos no presente trabalho). Os dados foram validados em um grupo independente de 11 hepatoblastomas e, em comparação com o fígado não-tumoral, os tumores exibiram um padrão generalizado e não estocástico de redução de metilação global em sequências não repetitivas. Adicionalmente, a análise revelou 1.359 sítios CpG diferencialmente metilados entre hepatoblastomas e tecido hepático normal, associados a 765 genes com enriquecimento em vias de sinalização envolvidas no metabolismo, processos de diferenciação celular, desenvolvimento do fígado, câncer e via de sinalização Wnt.

#### 1.4.4.3 Mutações de ponto em câncer e sequenciamento paralelo massivo

Com o avanço das tecnologias de sequenciamento de DNA na última década, houve a incorporação de novas técnicas de amplificação e marcação de DNA, com utilização de adaptadores e equipamentos automatizados, em um processo de sequenciamento paralelo massivo denominado *next-generation sequencing* (sequenciamento de nova geração - NGS). Este processo tornou possível a obtenção simultânea de milhões de sequências de grandes porções do genoma e até de genomas inteiros (MARDIS 2013; SHENDURE e JI 2008). Os estudos demonstram que a geração atual de plataformas de sequenciamento paralelo massivo possui capacidade para identificar no genoma tumoral uma enorme variedade de alterações genéticas adquiridas somaticamente, presentes em diferentes frequências (PATEL et al. 2013).

Nos últimos anos, as discussões estão voltadas para as vantagens e desvantagens do sequenciamento de exoma ou genoma completo. Duas revisões sistemáticas (BELKADI et al. 2015; SCHWARZE et al. 2018) comparam os custos e os benefícios científicos de cada escolha. A primeira sequência do genoma humano foi obtida em 2003 e custou entre US\$ 500 milhões e US\$ 1 bilhão. Por muitos anos, o custo do sequenciamento de um genoma inteiro permaneceu proibitivo para uso rotineiro na prática clínica, estimado em US\$ 20-25 milhões em 2006 (*National Human Genome Research Institute. The Cost of Sequencing a Human Genome - www.genome.gov/sequencingcosts* - acesso em outubro de 2018). No entanto, desde 2008, quando as abordagens de NGS entraram no ambiente de pesquisa, houve um declínio significativo nos custos de sequenciamento. Essas abordagens permitem que todo o genoma (via sequenciamento do genoma completo (WGS) ou partes dele, como sequenciamento completo de exoma (WES) ou painéis direcionados) seja sequenciado mais rapidamente, com grande profundidade e aumentando a sensibilidade, com redução nos custos que tornou a aplicação clínica de WES e WGS mais viável (CHISHOLM 2017).

O WES é direcionado para todas as regiões codificadoras de proteína, portanto, as sequências obtidas correspondem a aproximadamente 1% do genoma. Em relação ao genoma completo, o custo de sequenciamento do exoma em alta profundidade é muito reduzido, assim como as necessidades referentes ao

armazenamento de dados e sua análise. Embora o sequenciamento do genoma completo permita a detecção de uma gama mais ampla de alterações genéticas, incluindo alterações cromossômicas estruturais e regiões não-codificadoras, a implementação de ferramentas de análise desses dados representa um desafio para a maioria dos grupos clínicos e de pesquisa, assim como o significado funcional de alterações da maior parte de nosso genoma ainda permanece obscuro. Dessa forma, grande parte dos estudos científicos e da prática clínica atuais preferencialmente utilizam dados derivados de sequenciamento de exoma, cenário que pode se modificar nos próximos anos.

#### 1.4.4.4 Mutações em hepatoblastomas

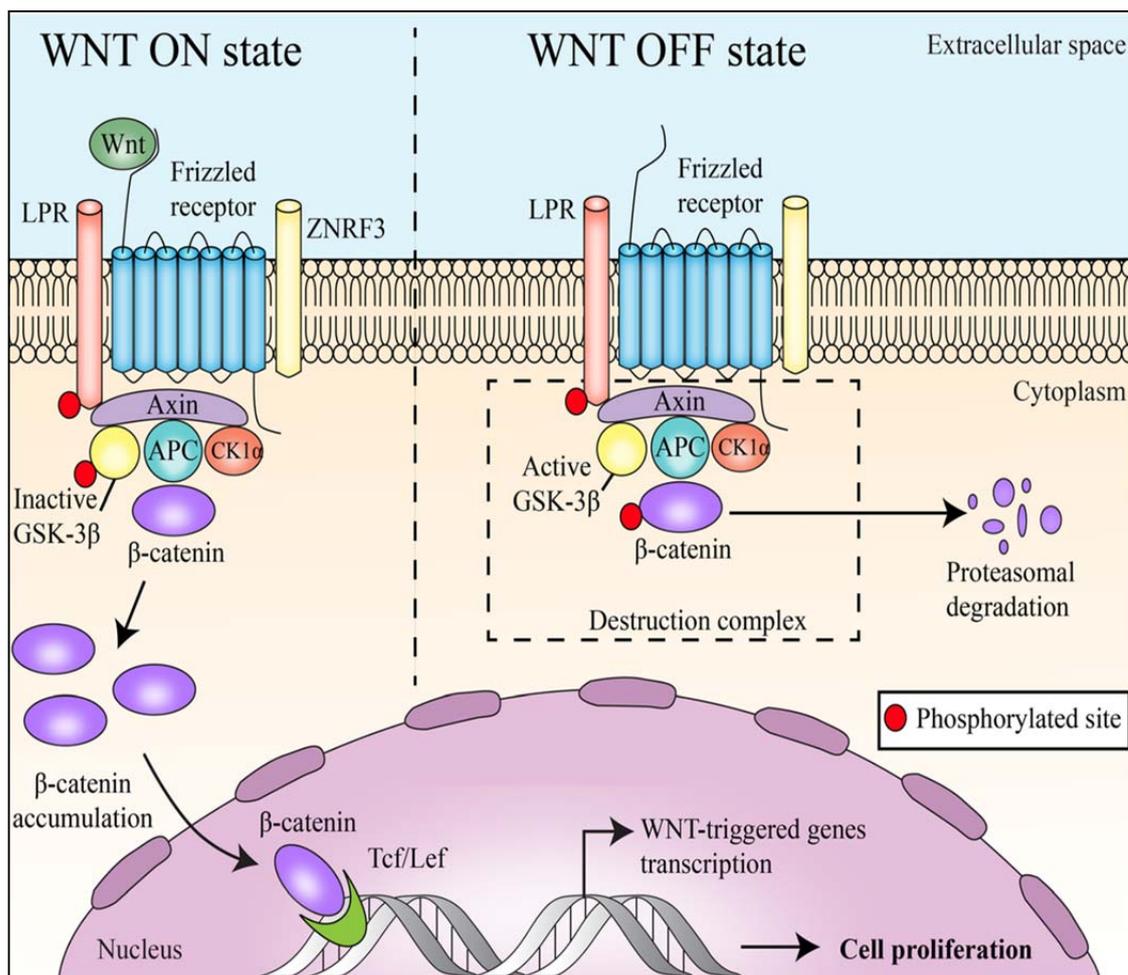
Em hepatoblastomas, mutações de ponto foram inicialmente identificadas em estudos de genes específicos, sendo que as mais comumente encontradas são as mutações ativadoras do gene *CTNNB1* (KOCH et al. 1999; UDATSU et al. 2001; CURIA et al. 2008; SUMAZIN et al. 2017). O gene *CTNNB1* está mapeado em 3p21 e codifica a proteína citosólica chamada  $\beta$ -catenina, presente em muitos tipos celulares e que desempenha papel importante na adesão e comunicação celular (KOCH et al. 1999), estando envolvida na via de sinalização Wnt (UDATSU et al. 2001).

A via de sinalização Wnt é importante no desenvolvimento embrionário de diversos órgãos. Proteínas da via Wnt podem se ligar a diferentes tipos de receptores Frizzled e atuar através de diferentes vias de sinalização (KAWANO et al. 2003; VEEMAN et al. 2003). A ligação da via a um complexo formado pelos receptores Frizzled e os co-receptores *low density lipoprotein receptor related protein-5* ou *-6* (*LRP 5/6*) gera um sinal que é transduzido para a fosfoproteína citoplasmática Dishevelled (*DVL*) e, a partir deste sinal, três vias independentes da Wnt podem ser ativadas: a via canônica; a não-canônica e a via Wnt/ $\text{Ca}^{++}$  (HABAS et al. 2001; HABAS et al. 2003; WALLINGFORD e HABAS 2005).

O gene *CTNNB1* atua na via Wnt e mutações neste gene (em especial no éxon 3, região de ubiquitinação – vide **Figura 14**) apresentam como resultado final a migração da proteína  $\beta$ -catenina para o núcleo, o que só ocorre em condições normais, durante a embriogênese. Esse resultado decorre do fato de que a ativação da

via canônica Wnt em eventos não relacionados ao desenvolvimento embrionário resulta na incapacidade de proteínas de degradação (Axin, gene *AXIN1*; Adenomas poliposis coli, gene *APC*; Casein Kinase 1a, gene *CKLA*; glycogen synthase kinase3  $\beta$ , gene *GSK3 $\beta$* ) fosforilarem a  $\beta$ -catenina; em maior concentração citoplasmática, a  $\beta$ -catenina é translocada para o núcleo. No núcleo, essa proteína se liga a fatores de transcrição *T-cell specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor-1* (*TCF/LEF1*) que, por sua vez, ativam a transcrição de genes alvos da via, dentre os quais podemos citar *MYC* e *CCND1* (IKEDA et al. 1998; SAKAMOTO et al. 2004).

As proteínas que inibem a via Wnt são conhecidas como SFRPs (*secreted frizzled related proteins*) porque se ligam aos receptores Frizzled e impedem a ativação (DENNIS et al. 1999); sem essa ativação, ocorre fosforilação da  $\beta$ -catenina livre por *GSK3B*, que rapidamente é submetida à ubiquitinação e subsequente degradação pelo proteossoma. A **Figura 10** abaixo ilustra o funcionamento canônico da via Wnt.



Fonte: PAI et al. (2017)

**Figura 10** - Ilustração da via canônica Wnt mediada por  $\beta$ -catenina.

Estado “*WNT ON*”: proteínas WNT, se ligam aos receptores frizzled e aos co-receptores LRP, agindo para suprimir a atividade de GSK3 $\beta$ . ZNRF3 promove o desligamento do funcionamento do receptor WNT como supressor de tumor. Isso impede a fosforilação de moléculas a jusante, permitindo a associação de  $\beta$ -catenina com Tcf / Lef no núcleo e subsequente aumento da proliferação celular. O estado “*WNT ON*” ocorre durante o período embrionário e nos casos de tumores com ativação da via Wnt.

Estado “*WNT OFF*”: na ausência de ligante WNT, o complexo de degradação da  $\beta$ -catenina (marcado por uma linha pontilhada e formado pelas proteínas Axin, APC, CK1 $\alpha$  e GSK3 $\beta$  ativo) realiza a fosforilação da  $\beta$ -catenina, que subsequentemente sofre degradação proteasomal.

No fígado, a via Wnt atua simultaneamente nas funções de reprimir e de promover o crescimento hepático, uma vez que durante os estágios iniciais estão ativos os antagonistas desta via, que impedem a proliferação celular; em estágios mais avançados da embriogênese, em associação com o *FGF4*, a via Wnt se torna ativa, atuando na diferenciação de hepatócitos, bem como na proliferação das células hepáticas, o que leva ao crescimento do fígado (MONGA et al. 2003; SUKSAWEANG et al. 2004; MCLIN et al. 2007; TAN et al. 2008).

Mutações nos genes *AXIN1* e *AXIN2*, componentes *downstream* da via Wnt que participam da degradação da  $\beta$ -catenina, também foram documentadas por estudos gene-específicos em hepatoblastomas, tanto variantes somáticas quanto germinativas (TANIGUCHI et al. 2002; MIAO et al. 2003; KOCH et al. 2004). Também foi descrita mutação no gene *PIK3CA*, cuja via de sinalização está envolvida com fatores de crescimento, como *IGF2*, este último com mutação germinativa associada à síndrome de Beckwith-Wiedemann (ZATKOVA et al. 2004). Poucos hepatoblastomas estudados apresentaram mutações no gene *TP53*, sendo que este tipo de alteração genética foi relacionado a tumores anaplásicos (CURIA et al. 2008).

Apenas quatro trabalhos investigaram mutações somáticas em hepatoblastomas por sequenciamento de exoma, sendo que dois deles foram estudos de casos únicos.

JIA et al. publicou em 2014 resultados do sequenciamento de exoma de seis amostras de hepatoblastomas. Foram identificadas 24 mutações somáticas não-sinônimas, mapeadas em 21 diferentes genes, incluindo uma mutação não previamente descrita no gene *CTNNB1* (G512V) e duas no gene *CAPRIN2* (R968H/S969), ambos envolvidos na via Wnt, além de outros genes relacionados com o complexo de ubiquitina ligase (*SPOP*, *KLHL22*, *TRPC4AP* e *RNF169*). Tais achados reforçam o modelo de ativação da via Wnt em hepatoblastomas, sendo comprovados por imunohistoquímica da  $\beta$ -catenina em casuística de 42 tumores, uma vez que *CAPRIN2* codifica uma proteína reguladora dos co-receptores LRP6 (DING et al. 2008), ao passo que genes relacionados com o complexo ubiquitina ligase, são responsáveis por sinalizar a degradação da  $\beta$ -catenina (KITAGAWA et al. 1999). Os autores propõem o gene *CAPRIN2* como um oncogene em

hepatoblastomas e, baseando-se nos dados obtidos com linhagens celulares, propõem *SPOP*, *OR511* e *CDC20B* como supressores tumorais.

Dois estudos de exoma foram realizados em pacientes com síndromes genéticas causadas por mutações germinativas que provavelmente aumentaram a predisposição ao desenvolvimento de hepatoblastoma (FUJITA et al. 2014; KOSAKI et al. 2014). Em Fujita et al, foi selecionada para estudo uma paciente que possuía o diagnóstico de osteopatia estriada com esclerose craniana, que desenvolveu hepatoblastoma. Foi identificada uma mutação *nonsense* em heterozigose (c.1045C>T, p. Glu349) no gene *WTX*, gene supressor tumoral já relacionado a tumor de Wilms. Essa mutação identificada em sangue periférico foi também detectada no tumor, indicando se tratar de uma mutação germinativa responsável pela síndrome e provavelmente associada ao desenvolvimento do hepatoblastoma. No estudo de Kosaki et al, apenas um paciente foi investigado também, diagnosticado com síndrome de Simpson-Golabi-Behmel; a análise identificou na amostra de hepatoblastoma uma mutação somática no gene *CTNNB1* (p.Ile35Ser), já relatada anteriormente em hepatoblastoma e em outros tipos de câncer, assim como mutação germinativa em *GPC3*, que causa a Síndrome de Simpson-Golabi- Behmel.

Em 2014, EICHENMÜLLER et al. investigaram um subtipo agressivo de hepatoblastoma (n=15 tumores subtipo hepatoblastoma HCC), que acomete crianças acima de 5 anos de idade, com características clínicas e histopatológicas que se assemelham ao carcinoma hepatocelular (PROKURAT et al. 2002); um dos objetivos do trabalho era avaliar se esses tumores compartilhariam alguma via de diferenciação. Os autores relatam um genoma relativamente simples para os hepatoblastomas estudados, já que foram encontradas ~2,9 mutações em regiões codificadoras por tumor, sendo as mutações em *CTNNB1* (12/15 casos) e *NFE2L2* (2/15 casos) as mais recorrentes. O gene *NFE2L2* produz uma proteína que é reconhecida pelo complexo KEAP1/CUL3, atuante na degradação proteossômica. As mutações identificadas neste gene alteram a estrutura da proteína, que conseqüentemente não é reconhecida pelo complexo KEAP1/CUL3 e se acumula no citoplasma, o que foi confirmado por imunohistoquímica. Os dados demonstraram que ocorre superexpressão de *NFE2L2* nas células em associação a metástase e invasão vascular. Além destas mutações em *NFE2L2*, foram encontradas deleções

em *RAD17* e em *TP53*, além de mutações no promotor do gene *TERT*. Este estudo sugere que mutações em *CTNNB1* e *NFE2L2*, perda de estabilidade genômica na via KEAP1 e mutações no promotor do gene *TERT* são características importantes relacionadas com agressividade do hepatoblastoma subtipo HCC.

Por fim, um grande estudo recente de tumores pediátricos (GRÖBNER et al. 2018), considerado Pan-Cancer (estudo de vários tipos tumorais para identificação de fatores em comum e específicos), incluiu 16 hepatoblastomas na coorte, identificando apenas mutações nos genes *CTNNB1* e *TERT*.

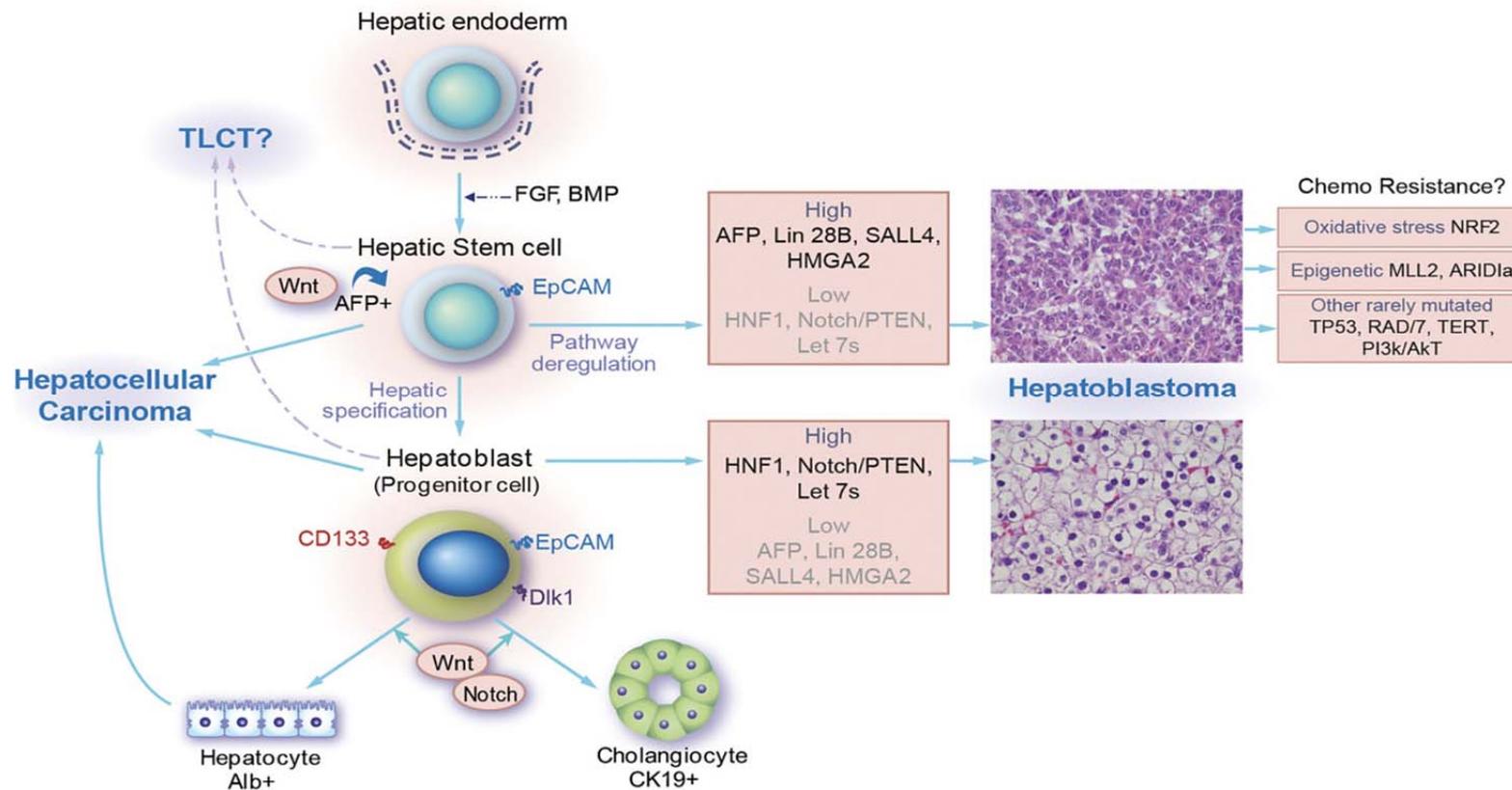
Esse cenário de poucas mutações representa um desafio para a adequada estratificação e ajuste do regime terapêutico e por este motivo subclassificações moleculares incluindo assinaturas gênicas foram propostas (CAIRO et al. 2008; LÓPEZ-TERRADA et al. 2014; SUMAZIN et al. 2017). Dois trabalhos são diferenciados neste sentido. CAIRO et al. (2008), propuseram uma estratificação de agressividade tumoral de acordo com a expressão de 16 genes, chamadas de assinaturas C1 e C2. Nas assinaturas de expressão gênica, a  $\beta$ -catenina aparece super-expressa nos dois grupos de hepatoblastomas e a diferença ocorre em marcadores de células hepáticas progenitoras (hepatoblastos), que aparecem com expressão alterada principalmente nos tumores considerados de histologia menos diferenciada. Esta subclasse altamente proliferativa (denominada assinatura C2) também apresentou ganhos recorrentes dos cromossomos 2p e 8q, com ativação do gene *MYC*, proto-oncogene que desempenha um papel importante na progressão do ciclo celular, apoptose e transformação celular (HAYMAN 1983; LANG et al. 1988). Esta assinatura C2 foi identificada em tumores com maior poder invasivo e metastático, portanto identificando tumores de pior prognóstico. Outro estudo excepcional foi publicado por SUMAZIN et al. (2017); utilizando as duas assinaturas gênicas propostas em 2008, o grupo também buscava identificar grupos de hepatoblastomas que se assemelhassem por características histológicas, clínicas e moleculares. Foram analisados neste trabalho 88 tumores, o que permitiu que três subtipos moleculares de estratificação de risco fossem caracterizados, em especial pela ativação diferencial de marcadores de células progenitoras hepáticas. Estes três subtipos foram classificados em: 1) prognóstico favorável, que se caracteriza pela expressão normal de *HNFI1A*, *NOTCH* e *PTEN*; 2) prognóstico desfavorável,

exibindo três características – alteração na via de sinalização de progenitores hepáticos (*EPCAM*, *LIN28B/LET7*, *SALL4*, *HMGA2*, *AFP*), regulação de stress oxidativo (mutação ou super-expressão de *NRF2*) e aumento na expressão de genes envolvidos em remodelamento da cromatina (*MLL2* e *ARID1A*); 3) o terceiro subgrupo corresponde àqueles tumores que se assemelham com HCC ou que são classificados em TLCT (*Transitional liver cell tumors*), que possuem como características a instabilidade genômica, com alterações em *TP53*, deleções em *RAD17*, alterações da via PI3K/AKT e mutações no promotor do gene *TERT*. Este grupo 3 possui como principal característica clínica a idade média ao diagnóstico de mais de 8 anos.

O estudo de 2017 conclui que os hepatoblastomas demonstram uma gama diversificada de fenótipos histológicos e comportamentos clínicos que podem resultar da proliferação de células-tronco transformadas ou células precursoras de hepatócitos com diferentes graus de diferenciação. A desregulação de várias vias pode determinar a capacidade das células-tronco hepáticas mutantes se diferenciarem e progredirem para neoplasias agressivas (**Figura 11**). Consequentemente, é esperado que hepatoblastomas epiteliais e mesenquimais mistos possam surgir de células precursoras transformadas que mantiveram a capacidade de se diferenciarem em ambas as linhagens (OISHI et al. 2014).

Diversos estudos provenientes de colaborações internacionais vêm reforçando a importância de investimentos em pesquisas relacionadas ao câncer infantil (Anonymus 2017). As justificativas destes estudos estão baseadas principalmente em diagnóstico precoce e tratamento personalizado para não só aumentar a sobrevida dos pacientes como, também, diminuir efeitos colaterais dos tratamentos.

Os estudos moleculares em hepatoblastoma buscam a identificação de genes relevantes e assinaturas moleculares subjacentes a subtipos clínicos, para incorporação em sistemas de estratificação de risco unificados. Nosso projeto visou adicionar dados genômicos a este cenário, mediante a identificação de novas mutações, vias biológicas e assinaturas mutacionais específicas de hepatoblastomas.



Fonte: SUMAZIN et al. (2017)

**Figura 11** - Diferenciação das células hepáticas precursoras e os diferentes tipos de origens do hepatoblastoma. A origem celular dos hepatoblastomas e as principais vias desreguladas na tumorigênese sugerem que a expressão de marcadores hepáticos e vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento e diferenciação de hepatoblastos, hepatócitos e colangioblastos poderiam ser indicativos do estágio de desenvolvimento de qualquer tumor. A desregulação das vias de desenvolvimento pode determinar a capacidade das células progenitoras / tronco hepáticas mutantes de se diferenciarem e progredirem para hepatoblastomas mais ou menos agressivos.

---

# *OBJETIVOS*

---

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

O objetivo deste estudo foi a caracterização clínica e molecular de um grupo de pacientes e seus tumores do tipo hepatoblastoma, tendo como foco central a análise de dados de sequenciamento de exoma dos tumores para identificação de mutações somáticas e vias biológicas relevantes.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Levantamento e análise de dados clínicos e epidemiológicos de pacientes brasileiros com hepatoblastoma diagnosticados e/ou tratados em três Instituições de câncer pediátrico do Estado de São Paulo;

II. Investigação de mutações somáticas codificadoras não-sinônimas em hepatoblastomas.

*II.1 Análise do sequenciamento de exoma de um grupo de 10 hepatoblastomas (coorte inicial) pareados com tecidos não-tumorais (fígado e/ou sangue periférico) para prospecção de mutações somáticas não-sinônimas em regiões codificadoras do genoma; validação de mutações e investigação de coorte adicional (12 hepatoblastomas) por meio de painel gênico.*

*II.2. Avaliação de gene candidato CX3CL1 e de seu receptor CX3CR1 por análise de expressão gênica e proteica, com validação dos resultados em coortes independentes.*

*II.3. Investigação de assinaturas mutacionais com base nos dados de mutações somáticas do exoma.*

III. Investigação de mutações germinativas de predisposição a câncer e/ou anomalias congênitas em pacientes com hepatoblastomas.

---

*PACIENTES E  
METODOLOGIA*

---

### 3 PACIENTES E METODOLOGIA

Este projeto obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP – A.C.Camargo Cancer Center, com o número de registro 1987/14, sendo um estudo misto de caráter retrospectivo e prospectivo.

#### 3.1 PACIENTES

Todas as amostras foram coletadas após consentimento informado assinado por pais ou responsáveis legais. A **Tabela 1** apresenta a lista total de casos estudados e uma descrição dos tipos de experimentos realizados com cada amostra. A **Tabela 2** indica os casos nos quais foram coletadas amostras de sangue periférico para obtenção de DNA germinativo de pacientes e genitores visando análises futuras de aCGH e sequenciamento de exoma.

**Tabela 1 - Informações sobre os casos estudados e tipos de experimentos realizados com cada amostra.**

<b>ID/sexo/idade ao diagnóstico</b>	<b>Instituição</b>	<b>Histologia</b>	<b>Tipo de Análise</b>
HB15, F 18m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial Embrionário	Sequenciamento de exoma, screening por sequenciamento de Sanger, expressão gênica e IHQ
HB16, M, 9m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial Fetal	Sequenciamento de exoma, screening por sequenciamento de Sanger e IHQ
HB17, F, 36m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial Fetal	Sequenciamento de exoma, screening por sequenciamento de Sanger, expressão gênica e IHQ
HB18, M, 9m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial e mesenquimal misto	Sequenciamento de exoma, screening por sequenciamento de Sanger, expressão gênica e IHQ
HB28, M 17y	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial e mesenquimal misto	Sequenciamento de exoma, screening por sequenciamento de Sanger e expressão gênica
HB30, M, 54m	A.C Camargo Cancer Center	HB e HCC	Sequenciamento de exoma, screening por sequenciamento de Sanger, expressão gênica e IHQ
HB31, M, 30m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial Fetal	Sequenciamento de exoma, screening por sequenciamento de Sanger, expressão gênica e IHQ
HB32, F, 36m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial e mesenquimal misto	Sequenciamento de exoma, screening por sequenciamento de Sanger, expressão gênica e IHQ
HB33, F 1m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial Embrionário e Fetal	Sequenciamento de exoma, screening por sequenciamento de Sanger, expressão gênica e IHQ
HB46, M 28m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial e mesenquimal misto	Sequenciamento de exoma, screening por sequenciamento de Sanger, expressão gênica e IHQ
HB34, F 19m	GRAACC	Epitelial Fetal	Target sequencing, screening por sequenciamento de Sanger e expressão gênica
HB35, M 26m	GRAACC	Epitelial Fetal	Target sequencing, screening por sequenciamento de Sanger e expressão gênica
HB36, M, 31m	GRAACC	Epitelial Embrionário e Fetal	Target sequencing, screening por sequenciamento de Sanger e expressão gênica
HB38, F 147m	GRAACC	Epitelial Fetal	Target sequencing, screening por sequenciamento de Sanger e expressão gênica
HB39, M, 84m	GRAACC	Epitelial Embrionário e macrotrabecular	Target sequencing, screening por sequenciamento de Sanger e expressão gênica
HB40, M 22m	GRAACC	Epitelial Embrionário e Fetal	Target sequencing, screening por sequenciamento de Sanger e expressão gênica
HB41, M 21m	GRAACC	Epitelial Embrionário e Fetal	Screening por sequenciamento de Sanger
HB42, M, 45m	GRAACC	Epitelial Fetal	Target sequencing, screening por sequenciamento de Sanger e expressão gênica
HB43, M 20m	GRAACC	Epitelial Embrionário	Target sequencing, screening por sequenciamento de Sanger e expressão gênica
HB44, M, 5m	GRAACC	Epitelial e mesenquimal misto	Target sequencing, screening por sequenciamento de Sanger e expressão gênica
HB45, F, 5m	GRAACC	Epitelial Fetal	Target sequencing, screening por sequenciamento de Sanger e expressão gênica
HB66, M 10m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial Embrionário e Fetal	Target sequencing, screening por sequenciamento de Sanger
TCH306, M 132m	TCH	Epitelial Embrionário e Fetal	Screening por sequenciamento de Sanger
TCH307, M, 84m	TCH	HB com características de HCC	Screening por sequenciamento de Sanger e IHQ
TCH310, M 24m	TCH	HB e HCC bifásico	Screening por sequenciamento de Sanger
TCH311, F 132m	TCH	Epitelial Fetal	Screening por sequenciamento de Sanger
TCH321, M 12m	TCH	Epitelial Fetal	IHQ
TCH323, F, 84m	TCH	Epitelial Embrionário e macrotrabecular	IHQ

<b>ID/sexo/idade ao diagnóstico</b>	<b>Instituição</b>	<b>Histologia</b>	<b>Tipo de Análise</b>
TCH324, M, 60m	TCH	Epitelial Embrionário	Screening por sequenciamento de Sanger e IHQ
TCH325, F, 72m	TCH	HB com características de HCC	Screening por sequenciamento de Sanger
TCH327, M 12m	TCH	Epitelial e mesenquimal misto	Screening por sequenciamento de Sanger e IHQ
TCH433, M 120m	TCH	Epitelial Embrionário e Fetal	Screening por sequenciamento de Sanger
TCH442, M 24m	TCH	HB com características de HCC	Screening por sequenciamento de Sanger
TCH444, F 12m	TCH	Epitelial Embrionário e Fetal	Screening por sequenciamento de Sanger
TCH352, M 12m	TCH	Epitelial Fetal com hematopoiese extramedular	Screening por sequenciamento de Sanger
TCH353, M, 7m	TCH	Epitelial com colangioblastos	Screening por sequenciamento de Sanger e IHQ
TCH360, M 24m	TCH	Epitelial Fetal e Mesenquimal misto	Screening por sequenciamento de Sanger e IHQ
TCH361, M 12m	TCH	Epitelial Fetal e Mesenquimal misto	Screening por sequenciamento de Sanger e IHQ
HB_TMA01, F 11m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial Embrionário e Fetal	Screening por sequenciamento de Sanger e IHQ
HB_TMA02, M 16m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial Embrionário e Fetal	Screening por sequenciamento de Sanger e IHQ
HB_TMA03, M, 52m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial Fetal	IHQ
HB_TMA04, M, 30m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial Fetal	Screening por sequenciamento de Sanger e IHQ
HB_TMA05, M 18m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial e mesenquimal misto	Screening por sequenciamento de Sanger e IHQ
HB_TMA06, F, 39m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial Embrionário	Screening por sequenciamento de Sanger e IHQ
HB_TMA07, M, 7m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial e mesenquimal misto	IHQ
HB_TMA08, F, 81m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial Embrionário e Fetal	IHQ
HB_TMA09, M 24m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial Embrionário e Fetal	Screening por sequenciamento de Sanger e IHQ
HB_TMA10, M, 9m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial e mesenquimal misto	IHQ
HB_TMA11, F 12m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial Embrionário e Fetal	Screening por sequenciamento de Sanger e IHQ
HB_TMA12, M, 42m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial e mesenquimal misto	Screening por sequenciamento de Sanger e IHQ
HB_TMA13, F, 85m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial Embrionário e Fetal	Screening por sequenciamento de Sanger e IHQ
HB_TMA14, M 24m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial e mesenquimal misto	Screening por sequenciamento de Sanger e IHQ
HB_TMA15, M 23m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial Embrionário e Fetal	Screening por sequenciamento de Sanger e IHQ
HB_TMA16, F, 32m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial Fetal	Screening por sequenciamento de Sanger e IHQ
HB_TMA18, F, 32m	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial Embrionário e Fetal	Screening por sequenciamento de Sanger e IHQ

As amostras indicadas por HB correspondem aos hepatoblastomas obtidos em instituições brasileiras, enquanto aquelas nomeadas TCH são tumores derivados do Texas Children's Hospital, onde foram estudados.

**Tabela 2** - Descrição de pacientes dos quais foram coletadas amostras de sangue periférico para estudo de alterações germinativas.

<b>ID/ sexo</b>	<b>Instituição origem</b>	<b>DNA genitores</b>
HB_TMA12, M	A.C Camargo Cancer Center	Pai e Mãe
HB06, M	A.C Camargo Cancer Center	Mãe
HB16, M	A.C Camargo Cancer Center	Mãe
HB17, F	A.C Camargo Cancer Center	Mãe
HB28, M	A.C Camargo Cancer Center	Não
HB30, M	A.C Camargo Cancer Center	Não
HB31, M	A.C Camargo Cancer Center	Não
HB32, F	A.C Camargo Cancer Center	Mãe
HB33, F	A.C Camargo Cancer Center	Mãe
HB46, M	A.C Camargo Cancer Center	Pai e Mãe
HB49, M	A.C Camargo Cancer Center	Mãe
HB54, M	A.C Camargo Cancer Center	Pai e Mãe
HB64, F	Hospital da Baleia- BH	Mãe
HB65, M	Hospital da Criança Conceição- POA	Pai
HB67, M	A.C Camargo Cancer Center	Mãe
HB69, M	A.C Camargo Cancer Center	Pai e Mãe
HB71, F	ITACI	Pai e Mãe
HB72, M	GRAACC	Pai e Mãe
HB73, M	A.C Camargo Cancer Center	Pai e Mãe
HB74, M	ITACI	Pai e Mãe
HB75, M	ITACI	Mãe
HB76, M	ITACI	Mãe
HB77, M	ITACI	Pai, Mãe, Irmão
HB78, M	A.C Camargo Cancer Center	Pai e Mãe

## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1 Extração de Biomoléculas

Secções de cortes histológicos dos tumores foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E) para análise histológica detalhada e confirmação de diagnóstico, bem como seleção do tecido de interesse para extração de DNA e RNA. Todas as amostras da coorte inicial de exomas e da coorte de validação foram realizadas pela patologista Dra. Isabela Werneck, no Departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center.

A extração de DNA e RNA das amostras foi realizada pelo Banco de Macromoléculas do A.C.Camargo Cancer Center, seguindo os procedimentos técnicos e éticos (CAMPOS et al. 2012; OLIVIERI et al. 2014) da instituição. Foram utilizados os kits QIASymphony DNA Mini (QIAGEN) e RNeasy Mini Kit (QIAGEN) para extração de tecidos hepáticos e de sangue periférico. Para os tecidos parafinados, foram feitos cortes de 10µg no bloco e a extração de DNA foi feita com fenol- clorofórmio.

As amostras de DNA foram analisadas em gel de agarose 0,8% para análise de pureza e integridade e quantificadas pelos equipamentos Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen), que mensura a quantidade de DNA dupla-fita na amostra através do sistema fluorométrico. Também foi utilizado o equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), que estima por meio de espectrofotometria a absorbância da amostra, permitindo quantificar DNA (260 nm) e a proporção de contaminantes na amostra (proteínas a 280 nm e compostos orgânicos a 230 nm). As amostras de RNA foram avaliadas por eletroforese de microfluidos no sistema Bioanalyzer (Agilent Technologies); somente amostras com alta qualidade [RIN > 7.0; *RNA Integrity Number (RIN)* – Standardization of RNA Quality Control – Agilent 2004] foram usadas para os experimentos de expressão gênica.

Todas as amostras tumorais foram extraídas de regiões com mais de 70% de tumor viável, de acordo com análise da patologista.

### **3.2.2 Construção das bibliotecas genômicas para sequenciamento de exoma e de painel de genes**

Os dados de exoma de 10 amostras de hepatoblastoma com seus respectivos tecidos não tumorais foram obtidos utilizando diferentes plataformas de captura e construções de bibliotecas genômicas (**Quadro 3**), uma vez que os pacientes foram averiguados em diferentes períodos desde o início do projeto, parte em tese anterior de doutoramento (RODRIGUES 2014). Também realizamos sequenciamento de exoma de três pacientes e seus genitores.

**Quadro 3** - Informação sobre o kit de construção das bibliotecas genômicas.

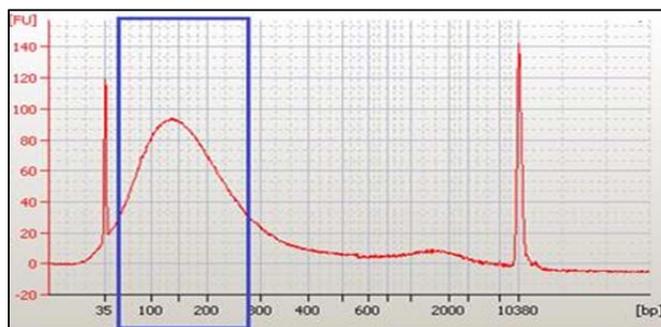
ID	Kit Captura
HB15_T	OneSeq_agilent
HB16_T	Sureselect 244K_V3_agilent
HB17_T	Sureselect 244K_V3_agilent
HB18_T	Sureselect 244K_V3_agilent
HB28_T	Sureselect 244K_V3_agilent
HB30_T	OneSeq_agilent
HB31_T	OneSeq_agilent
HB32_T	Sureselect 244K_V3_agilent
HB33_T	Sureselect 244K_V3_agilent
HB46_T	QXT_Sureselect_V6_agilent
HB15_FN	OneSeq_agilent
HB16_S	QXT_Sureselect_V6_agilent
HB17_S	QXT_Sureselect_V6_agilent
HB18_FN	Sureselect 244K_V3_agilent
HB28_S	Sureselect 244K_V3_agilent
HB30_S	QXT_Sureselect_V6_agilent
HB31_S	OneSeq_agilent
HB32_S	QXT_Sureselect_V6_agilent
HB33_S	QXT_Sureselect_V6_agilent
HB33_M	QXT_Sureselect_V6_agilent
HB46_S	QXT_Sureselect_V6_agilent
HB64_S	QXT_Sureselect_V6_agilent
HB64_M	QXT_Sureselect_V6_agilent
HB65_S	QXT_Sureselect_V6_agilent
HB65_P	OneSeq_agilent

Ao final de cada número do ID as letras correspondentes são do tipo de amostra: T: tumor, FN: tecido normal hepático, S: DNA extraído do sangue do paciente; M: DNA extraído do sangue da mãe do paciente; P: DNA extraído do sangue do pai do paciente.

As bibliotecas enriquecidas foram sequenciadas pela plataforma *Illumina*® *HiSeq2500*, usando um protocolo de 150pb *paired-end*, para produzir uma cobertura média de sequenciamento do alvo de no mínimo 50x.

A primeira etapa consiste em quantificar as amostras, medindo a concentração de DNA pelo equipamento Qubit (Invitrogen), para diluição final de 200ng de DNA em 50µl. Após a quantificação é realizada a fragmentação do DNA. Para os protocolos QXT Surelect V6 e OneSeq Constitutional Research Panel, a fragmentação é enzimática, de acordo com os reagentes indicados pelo fabricante.

Entretanto, para o protocolo Sureselect 244K V3, a fragmentação é baseada em processos físicos no equipamento COVARIS SONICADOR (S220). São esperados fragmentos de 120-150pb no protocolo utilizado, que serão avaliados e quantificados pelo equipamento Bioanalyzer 2100- Agilent (Kit High Sensitivity) (**Figura 12**).

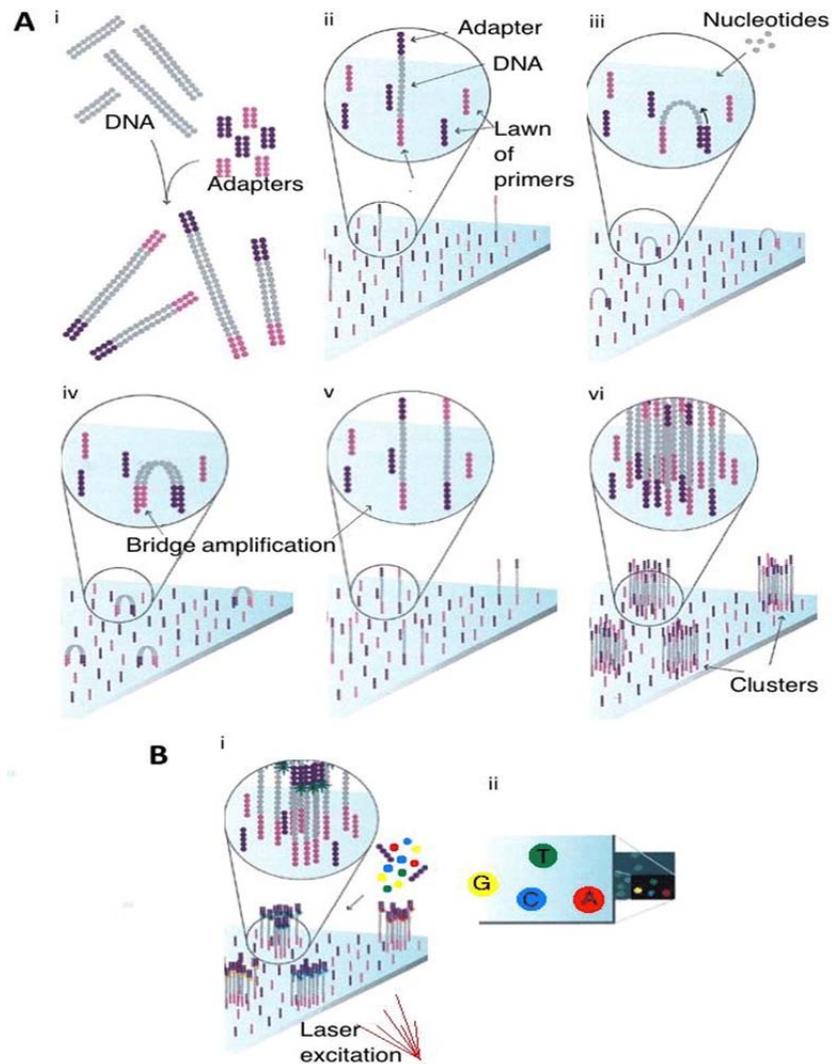


**Figura 12** - Fragmentação de DNA pré-captura da biblioteca. Eletroferograma indicando a quantificação de uma das amostras de DNA pelo equipamento Bioanalyzer, após a fragmentação realizada no Covaris. O box em azul contém o pico no qual está concentrada a maioria dos fragmentos, indicando que se encontram na faixa adequada de tamanho – 150pb.

O próximo passo foi a construção da biblioteca dos fragmentos de interesse. Para cada plataforma, os fabricantes fornecem sondas biotinizadas de RNA para captura das regiões-alvo, que irão hibridar nas amostras de DNA. Para capturar somente as regiões que foram hibridizadas, adicionam-se *beads* que contém estreptavidina, molécula que possui afinidade pela biotina. Essas *beads* se associarão às sequências que anelaram nas sondas biotinizadas. Por meio de etapas consecutivas de lavagem e de digestão enzimática, conseguiremos obter apenas os fragmentos que temos interesse em sequenciar.

Após purificação dos fragmentos capturados, a biblioteca foi submetida a uma etapa de PCR para amplificação e ligação a *indexes* específicos, que fornecem marcação diferencial de cada amostra a ser sequenciada. Após a etapa de amplificação, realizamos mais uma análise no equipamento Bioanalyzer 2100, para confirmar o tamanho dos fragmentos a serem sequenciados (250-350pb), bem como determinar a concentração e molaridade de cada amostra.

A **Figura 13** ilustra as etapas da reação de sequenciamento nas plataformas Illumina.



**Fonte:** Imagem extraída do site Illumina - [www.illumina.com](http://www.illumina.com)

**Figura 13** - Ilustração de como funciona a técnica de sequenciamento de nova geração de DNA. A. i - O DNA é fragmentado aleatoriamente e ligado a adaptadores (rosa e roxo) em ambas as extremidades. ii - As moléculas de DNA são aderidas por afinidade ao suporte sólido onde estão também aderidos em alta densidade oligonucleotídeos complementares aos adaptadores. iii - Durante a etapa de anelamento ou hibridização no primeiro ciclo de amplificação da PCR em fase sólida, o adaptador da extremidade livre da molécula aderida ao suporte encontra o oligonucleotídeo complementar, formando uma estrutura em ponte. iv - Uma vez fornecidos os reagentes necessários, a PCR é iniciada utilizando a extremidade 3' livre do oligonucleotídeo como primer. v - Na etapa de desnaturação, a "ponte" é desfeita mediante elevação de temperatura. Repete-se a etapa de anelamento, formando novas estruturas em ponte e iniciando um novo ciclo de amplificação. vi - Após uma série desses ciclos, serão obtidos clusters de moléculas idênticas ligadas ao suporte. B. i - Com a incorporação de nucleotídeos terminadores marcados e excitação a laser, é gerado sinal, o qual é captado por dispositivo de leitura e interpretado como um dos quatro possíveis nucleotídeos componentes da cadeia. O processo de incorporação de nucleotídeo marcado, excitação e leitura é repetido para cada nucleotídeo componente da sequência. ii - A leitura é feita de forma sequencial, o que permite a montagem da sequência completa de cada cluster.

Após a análise dos dados do exoma, foi elaborado um painel de genes para *target sequencing*, visando a validação dos achados nos tumores estudados e também a investigação destes genes candidatos em uma coorte independente. No total, foram avaliadas neste painel 22 amostras de tecido tumoral congelado (10 HBs provenientes da coorte inicial e 12 HBs adicionais). O painel foi desenhado na plataforma Agilent SureDesign, com um total de 18.539 sondas em 117 genes. Para a captura seletiva das sequências de DNA utilizamos o sistema 244K *Agilent SureSelect Target Enrichment* (Agilent Technologies), com o sequenciamento realizado utilizando o kit *TruSeq v2 chemistry - 500 ciclos 250pb paired – end*, na plataforma Illumina MySeq.

Todos os procedimentos de sequenciamento foram realizados no Centro de Estudos sobre o Genoma Humano e Células-tronco do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP.

### **3.2.3 Obtenção dos dados de sequenciamento de nova geração**

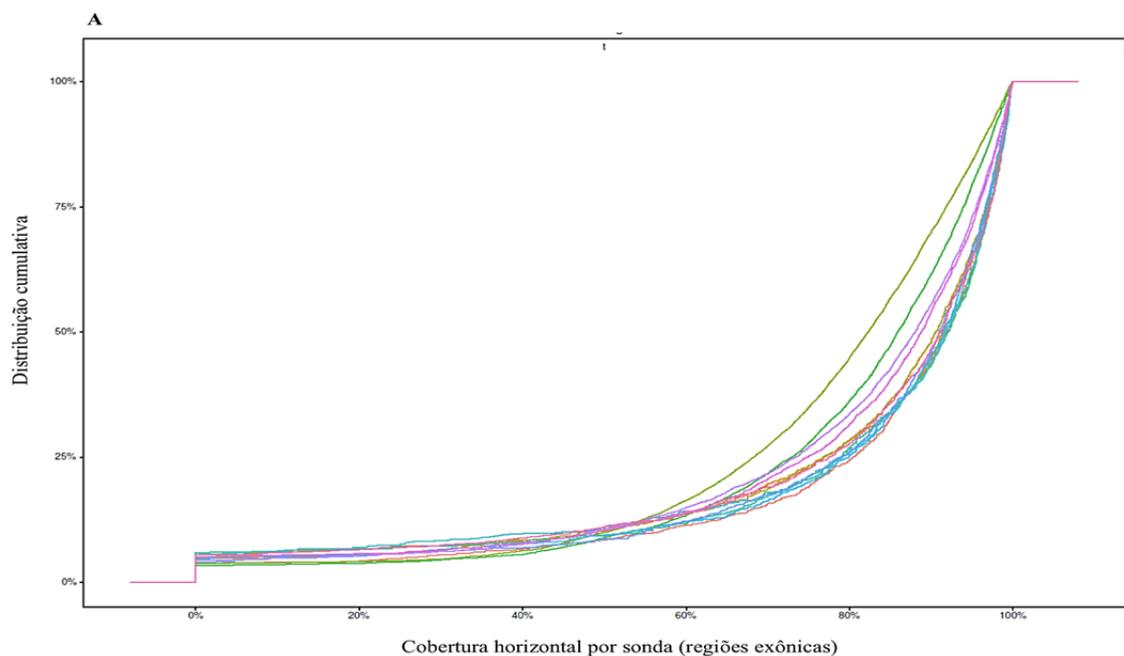
As análises de Bioinformática foram realizadas pela equipe do Laboratório de Biologia Computacional e Bioinformática do CIPE, coordenado pelo Dr. Israel Tojal. Esse procedimento pode ser dividido em três etapas principais: análise de qualidade; alinhamento das sequências ao genoma de referência e chamada de variantes (do inglês *variant call*), com posterior análise dos arquivos BAM se necessário.

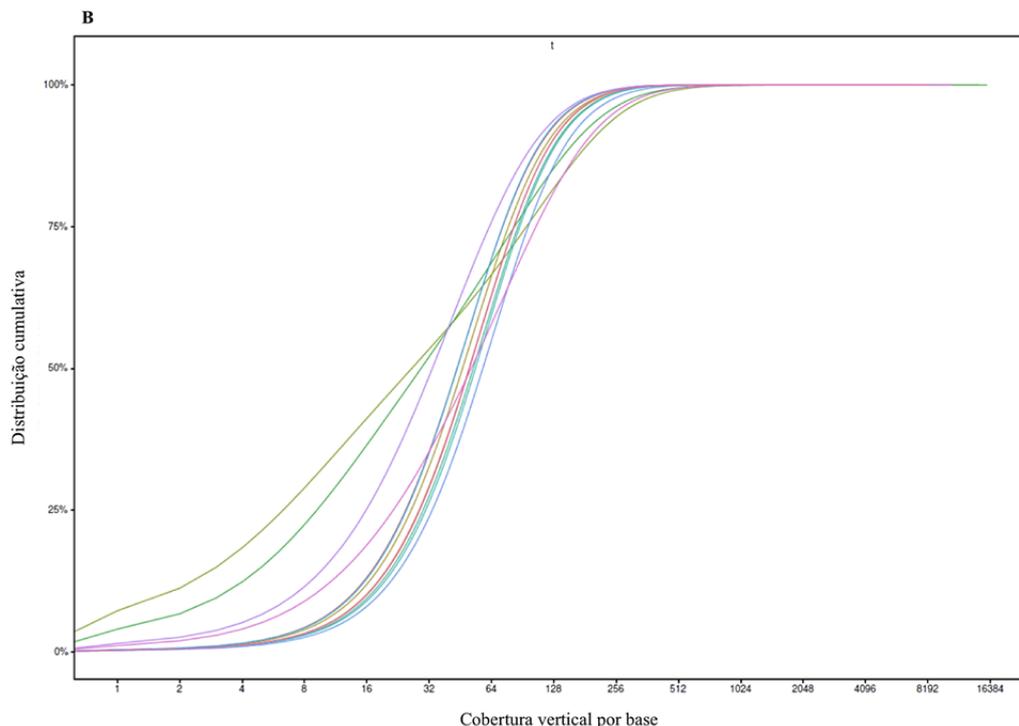
Etapa 1) Análise de qualidade: as sequências geradas no sequenciamento se denominam *reads*. As *reads* estão no formato FASTQ, que contém a sequência de nucleotídeos e a qualidade correspondente a cada base em um único arquivo; este arquivo é gerado através do processo de desmultiplexagem, que lê a sequência do index ligada a cada cluster para determinar a partir de qual amostra aquele conjunto foi originado. Após isso, os arquivos do tipo FASTQ são gravados em formato texto, sendo gerado durante o processo de sequenciamento (COCK et al. 2010). A primeira análise de qualidade é feita em uma escala chamada Phred (valor de qualidade 'Q'), que calcula a probabilidade de erro na determinação de um nucleotídeo; tipicamente, os valores de Phred estão entre 1 e 40. Primeiramente, as *reads* foram analisadas no programa FastQC (Babraham Bioinformatics, Cambridge, UK), que fornece um relatório no qual podemos avaliar a quantidade de *reads* gerada para cada biblioteca,

a qualidade relativa a cada base, a qualidade média da sequência, o tamanho médio de cada *read*.

Etapa 2) Alinhamento das sequências ao genoma de referência: as *reads* obtidas foram então alinhadas ao genoma referência (versão hg19/GRCh37). Nesta etapa, foi utilizado o pacote Burrows-Wheeler Aligner (BWA) versão 0.6.1 (LI e DURBIN 2010) (biobwa.sourceforge.net).

Ao final destas duas etapas de análise de qualidade e alinhamento, foram computados 53,43 gigabases de sequências com leitura e alinhamento de alta qualidade (média de 4,45 gigabases por amostra). Mais de 95% das bases sequenciadas apresentaram Phred score  $> 20$ , demonstrando, assim, alta confiabilidade na determinação dos nucleotídeos. Uma cobertura média de  $\sim 42X$  por amostra foi alcançada, com 78,5% do alvo coberto ao menos 20X (**Figura 14**).





**Figura 14** - Gráficos indicando qualidade do sequenciamento de exoma, em distribuição cumulativa. **A.** Qualidade da distribuição horizontal: analisa a % de sondas, no caso das regiões exônicas que alinharam no genoma e estão dentro dos padrões descritos de qualidade. **B.** Cobertura vertical: indica o número de vezes que o nucleotídeo foi sequenciado

Etapa 3) Chamada de variantes e inspeção visual de arquivos BAM: realinhamento com as *reads* mapeadas foi realizado utilizando pacote GATK versão 3.8 (DEPRISTO et al. 2011) seguindo as práticas disponibilizadas pela equipe de desenvolvedores desse software ([software.broadinstitute.org/gatk/](http://software.broadinstitute.org/gatk/)). Esta ferramenta utiliza um modelo de probabilidade Bayesiano para determinar simultaneamente o genótipo mais provável e a frequência alélica em uma população de N amostras, estimando um genótipo para cada amostra. Em seguida, a marcação das *reads* amplificadas em duplicata foi realizada pelo algoritmo Picard versão 2.18 ([picard.sourceforge.net](http://picard.sourceforge.net)), abordagem reduz a probabilidade de realizar a chamada de falsos SNPs. Outras manipulações de alinhamento e filtro foram feitas nos arquivos BAM, usando o Samtools 1.7. O arquivo final dessa etapa é do tipo *VCF* (*Variant Call format*), contendo informação sobre as variantes encontradas em posições específicas em um genoma de referência.

### 3.2.4 Análise dos dados de exoma e painel de genes para prospecção de variantes de interesse

Utilizamos o software Varseq (Golden Helix) para anotação das variantes utilizando bancos de dados públicos, contendo dados sobre sequências gênicas e tipo de variante em relação aos transcritos (UCSC RefSeq genes, site), frequência populacional (dbSNP version 138 - [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP); EXAC - [exac.broadinstitute.org](http://exac.broadinstitute.org); gnomAD - [gnomad.broadinstitute.org](http://gnomad.broadinstitute.org); 1000 genomes - [1000genomes.org](http://1000genomes.org) e ABraOM - [abraom.ib.usp.br/](http://abraom.ib.usp.br/)), variantes detectadas em câncer (COSMIC versão 67 [cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic](http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic); ICGC - [icgc.org](http://icgc.org)) e dados clínicos e de pacientes (OMIM - [www.omim.org](http://www.omim.org); ClinVar - [www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/)). As variantes do tipo substituição de aminoácido (*missense*) foram anotadas utilizando o banco dbNSFP (<http://varianttools.sourceforge.net/Annotation/DbNSFP>), que contém dados sobre avaliação *in silico* de patogenicidade de todas as possíveis variantes deste tipo em sequências codificadoras do genoma humano; essa avaliação acerca da previsão de patogenicidade de mutações *missense* foi realizada utilizando cinco diferentes algoritmos: SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant- <http://sift.bii.aster.edu.sg/>), Polyphen 2 (Polymorphism Phenotyping v2 - <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), Mutation Assessor (<http://mutationassessor.org/>) e FATHMM (Functional Analysis through Hidden Markov Models (v2.3) - <http://fathmm.biocompute.org.uk/>).

A abordagem de análise dos exomas foi baseada na identificação de variantes somáticas utilizando os arquivos VCF e BAM de cada amostra, comparando o exoma tumoral com o exoma germinativo de cada paciente. Portanto, foram selecionadas variantes ausentes das amostras germinativas pareadas (considerando apenas regiões igualmente cobertos nas duas amostras comparadas), aplicando também os critérios a seguir: frequência em bancos de dados populacionais inferior a 0,001%, cobertura vertical mínima da posição de 10x e mínimo de 10% da base variante no total de *reads*, *Phred score* >17; não-sinônimas, do tipo *missense* ou de perda de função (*loss of function* – *LoF*: mudança de quadro de leitura, *frameshift*; introdução de códon de parada prematuro, *nonsense*; processamento de RNA primário, *splicing*).

As mutações somáticas selecionadas de acordo com os critérios acima foram inspecionadas visualmente utilizando os arquivos BAM, pelo software VarSeq ou IGV versão 2.3 (*Integrative Genomics Viewer, Broad Institute* <http://www.broadinstitute.org/igv/>), visando exclusão de possíveis artefatos de sequenciamento e variantes germinativas.

Os genes do conjunto final de mutações somáticas identificadas no grupo de 10 hepatoblastomas foram selecionados para elaboração do painel de genes para validação dos achados.

### 3.2.5 Assinatura mutacional

Os dados completos do sequenciamento de exoma de 10 hepatoblastomas e respectivos tecidos germinativos pareados foram usados para avaliação de assinaturas mutacionais específicas. As análises foram feitas pelo grupo de Bioinformática do CIPE, sob supervisão do Dr. Israel Tojal.

Neste estudo, foram analisados os VCFs de 20 exomas disponíveis (10 tumores e 10 amostras germinativas pareadas); todas as alterações somáticas de troca de um nucleotídeo foram mapeadas em seqüências de trinucleotídeos, para construir uma matriz de mutações somáticas. Após isso, foi utilizado o algoritmo *signeR* (ROSALES et al. 2016; <http://bioconductor.org/packages/signer>) para estimar o número de processos mutacionais e as assinaturas. Uma análise de similaridade também foi utilizada para comparar as assinaturas obtidas nos hepatoblastomas com aquelas disponíveis no catálogo PanCancer do COSMIC, que contem 30 diferentes assinaturas mutacionais.

### 3.2.6 Sequenciamento Sanger

Para validação de algumas variantes, foi utilizado o sequenciamento de Sanger (SANGER et al. 1977). Dez diferentes seqüências foram avaliadas (**Tabela 3**), cujos pares de iniciadores (*primers*) foram desenhados utilizando o programa *Primer3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>), com validação pelo UCSC PCR In Silico (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>).

Foram sequenciadas as 10 amostras da coorte principal (usadas para os estudos de sequenciamento de exoma) 12 amostras da coorte de validação e mais 12

amostras do *tissue microarrays* (DNA extraído de bloco parafina). Além dessas 14 amostras provenientes do *Texas Children's Hospital* foram testadas para a variante identificada no gene *CX3CL1*.

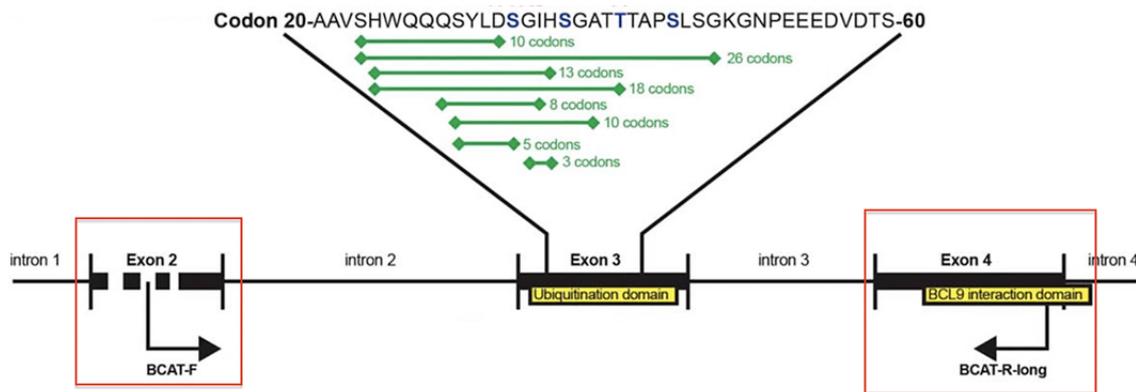
**Tabela 3** - Informações sobre os pares de primers utilizados para sequenciamento Sanger.

Chr:Pos	Primer Foward	Primer Reverse	Amplicon	Anelamento	Gene
chr3:41266022_41266245	TTGATGGAGTTGGACATGGC	TCAGCTACTTGTCTTGAGTGA	225 pb	61°	<i>CTNNB1</i>
chr3:41265932_41266300	CAATGGGTCATATCACAGATTCTT	AGTTCTCAAAAAGTGCATTCTGACTT	368 pb	59°	<i>CTNNB1</i>
chr3:41265550_41266700	AGCGTGGACAATGGCTACTCAA	ACCTGGTCTCGTCATTAGCA	1151pb	56°	<i>CTNNB1 Large</i>
chr3:41265975_41266297	CATTTCCAATCTACTAATGCTAATACT	TCTCAAAAAGTGCATTCTGACTTT	325pb	58°	<i>CTNNB1 Exon 3</i>
chr12:30863054_30863530	ATTGCTTTTGTGTTTGGAAATTTACT	CTGCCAGCTTTAGCATGTGA	320pb	60°	<i>CAPRIN2</i>
chr12:30863054_30863530	ATTGCTTTTGTGTTTGGAAATTTACT	CTGCCAGCTTTAGCATGTGA	320pb	60°	<i>CAPRIN2</i>
chr16:57382469_57382578	GCTGAGGCAAAGACCTCTGA	ACACGCTGGCCTTCAGAC	260pb	60°	<i>CX3CL1</i>
chr16:347011_347266	CACCGGAGGCCAGGGCGACT	TGGCAAAGCAGGCCCCACGA	256pb	58°	<i>AXIN1</i>
chr16:338067_338326	CACGCCGTCCCTGCCAC	GACACCCGTGCCCGCCAA	290pb	59°	<i>AXIN1</i>
chr22:32214946_32215237	GCTCTGGTTTCACTGTGGTTC	GGCTCTCTTAAGCAACCAA	280pb	58°	<i>DEPDC5</i>

A tabela contém as informações da localização da região estudada, sequência *Forward* e *Reverse* de cada primer, o tamanho do amplicon esperado, a temperatura de anelamento na PCR e o símbolo do gene.

As reações de PCR foram realizadas utilizando Taq DNA Polymerase (Life Technologies), com aproximadamente 100 ng de DNA para um volume de reação final de 35 µL. Os fragmentos amplificados de PCR foram purificados com ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) e sequenciados em ambos os sentidos. Os produtos foram analisados usando um sequenciador de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), e as sequências foram alinhadas com a respectiva sequência de referência usando o software Chromas Lite (Techelysium).

Dois amplicons foram produzidos utilizando reações diferenciadas. Uma PCR longa foi realizada para sequência intragênica de *CTNNB1* para gerar um amplicon de 1151pb; outro amplicon de 325pb foi produzido somente para o éxon 3 de *CTNNB1*. Ambos foram previamente descritos nos estudos SUMAZIN et al. (2017) e LÓPEZ-TERRADA et al. (2014). A **Figura 15** foi extraída do trabalho de 2017 e mostra que utilizando estes pares de primers é possível detectar deleções intragênicas afetando os éxons 3 e 4, regiões mais comumente deletadas em hepatoblastomas.



**Figura 15** - Imagem extraída do trabalho Genomic Analysis of Hepatoblastoma Identifies Distinct Molecular and Prognostic Subgroups (SUMAZIN et al. 2017), mostrando no box em vermelho a região dos primers usados em nosso trabalho para detectar grandes deleções no gene *CTNNB1*.

Utilizamos a DNA polimerase AmpliTaq Gold (Thermo Fisher), uma enzima modificada que pode ser ativada parcial ou completamente nas etapas de desnaturação da PCR.. A sequência abaixo corresponde à região do gene *CTNNB1* que pode ser amplificada utilizando os primers descritos anteriormente. Em verde estão os primers que correspondem ao amplicon de 1151pb, em vermelho os primers que corresponderiam apenas à sequência do exon 3 (em negrito) do gene.

```

AGCGTGGACAATGGCTACTCAAGTTTGTGTCATTAAATCTTTAGTTACTGAATTGGGGC
TCTGCTTCGTTGCCATTAAGCCAGTCTGGCTGAGATCCCCCTGCTTTCCTCTCCTGCTT
ACTTGTGCTCAGGCTACCTTTTGTCCATTTTCTGCTCACTCCTCCTAATGGCTTGGTGAAATA
GCAAACAAGCCACCAGCAGGAATCTAGTCTGGATGACTGCTTCTGGAGCCTGGATGCAG
TACCATTCTTCCACTGATTCAGTGAGTAACTGTTAGGTGGTTCCTAAGGGATTAGGTATT
TCATCACTGAGCTAACCCTGGCTATCATTCTGCTTTTCTTGGCTGTCTTTCAGATTTGACTT
TATTTCTAAAAATATTTCAATGGGTCATATCACAGATTCTTTTTTTTTTAAATTAAGTAAC
ATTCCAATCTACTAATGCTAATACTGTTTCGTATTTATAGCTGATTTGATGGAGTTGG
ACATGGCCATGGAACCAGACAGAAAAGCGGCTGTTAGTCACTGGCAGCAACAGTCT
TACCTGGACTCTGGAATCCATTCTGGTGCCACTACCACAGCTCCTTCTCTGAGTGGT
AAAGGCAATCCTGAGGAAGAGGATGTGGATACCTCCCAAGTCCTGTATGAGTGGGA
ACAGGGATTTTCTCAGTCCTTCACTCAAGAACAAGTAGCTGGTAAGAGTATTATTTT
TCATTGCCTTACTGAAAGTCAGAAATGCAGTTTTGAGAACTAAAAGTTAGTGTATAATA
GTTTAAATAAAAATGTTGTGGTGAAGAAAAGAGAGTAATAGCAATGTCACCTTTACCATTT
AGGATAGCAAATACTTAGGTAATGCTGAACTGTGGATAGTGAGTGTGAAATTAACCTTT
TCCAGATATTGATGGACAGTATGCAATGACTCGAGCTCAGAGGGTACGAGCTGCTATGTT
CCCTGAGACATTAGATGAGGGCATGCAGATCCCATCTACACAGTTTGATGCTGCTCATCC
CACTAATGTCCAGCGTTTGGCTGAACCATCACAGATGCTGAAACATGCAGTTGTAAACTT
GATTAAGTATCAAGATGATGCAGAACTTGCCACACGTGCAATCCCTGAACTGACAAAAC
GCTAAATGACGAGGACCAGGT

```

### 3.2.7 Análise de expressão gênica por PCR em tempo real

A reação de transcrição reversa, seguida da reação da polimerase em cadeia (RT-PCR), possui como molde inicial a molécula de RNA (KUBISTA et al. 2006). qRT-PCR é uma técnica muito utilizada em estudos de expressão gênica através da análise quantitativa de ácidos nucleicos, tendo como uma de suas principais vantagens ser um método preciso e de rápida execução (FRONHOFFS et al. 2002). Neste caso, a extração do RNA da amostra é realizada, seguida por conversão deste RNA em cDNA pela técnica de transcrição reversa e, finalmente, amplificação do cDNA por PCR (ação da DNA polimerase). Este cDNA é utilizado nas reações da PCR em tempo real, aplicando-se primers específicos para a sequência gênica-alvo que se deseja estudar.

O estudo de expressão gênica foi realizado em colaboração com a doutoranda Maria Prates Rivas, que desenvolve projeto de pesquisa em expressão gênica. Foram utilizadas neste estudo nove amostras da coorte principal 10 da coorte de validação e seis linhagens celulares de tumor hepático (HEPG2, C3A, SNU-423, SNU-429 e SNU-475). A conversão do RNA para cDNA foi realizada utilizando o kit High Capacity RNA to cDNA da Applied Biosystems seguindo o protocolo do fabricante. Feita a conversão, foi realizada uma PCR utilizando primer para o gene que produz proteína endógena da  $\beta$ -actina visando confirmar a eficiência da conversão para cDNA.

As reações foram preparadas com reagentes padronizados para PCR em tempo real (TaqMan Universal PCR Master Mix II, Applied Biosystems) adicionado dos conjuntos de primers e sonda específico para cada gene estudado (*CX3CLI* #4331182\_Assay ID: Hs01011407\_m1 e *CX3CRI* #4331182\_Hs01922583\_s1). As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento 7500 Real-Time PCR (APPLIED BIOSYSTEMS) a cada ciclo de amplificação. Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de flutuações na leitura decorrentes a variações de volume e evaporação ao longo da reação. O resultado, expresso em valor de CT, se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal o fluorescente atinja o limiar de detecção.

A quantificação da expressão dos genes foi feita pela comparação da expressão em um grupo de interesse a um outro grupo, denominado grupo controle. Para testar a eficiência de amplificação de cada um dos genes-alvo, diluições seriadas de cDNA foram testadas e os resultados da reação (dados pelo valor de CT) foram tabeladas para o cálculo do R-quadrado. O uso de um gene constitutivo como controle endógeno na reação de PCR quantitativo e como fator de normalização dos dados é controverso (BUSTIN 2000). Um dos requisitos mais importantes para a escolha de um gene candidato a controle endógeno é a sua presença constante em todas as amostras testadas com pouca variação na expressão por influência de estímulos externos ou mudanças no metabolismo celular. Seguindo esse raciocínio, as flutuações decorrentes de variações de pipetagem e conseqüentemente na concentração final dos reagentes, da amostra ou variações nas condições das reações de RT ou de PCR seriam corrigidas pelo ROX (APPLIED BIOSYSTEMS 2004). O gene de RNA ribossômico 18S (*RNAr 18S*) foi selecionado em comparação a outros três genes testados (*B2M*, *GAPDH*, *ACTA1*) como o mais apropriado para ser o gene referência; essa determinação do gene de referência apropriado foi realizada utilizando o algoritmo geNorm (VANDESOMPELE e PATTYN 2002).

Os experimentos foram feitos em triplicatas e as médias foram comparadas entre os grupos (grupo de tumores e grupo controle, composto por bordas de fígado não tumoral), considerando o gene diferencialmente expresso se o *fold change* fosse  $\geq | 2 |$  através do método quantitativo relativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e  $p\text{-value} \leq 0.05$  (teste de Mann-Whitney) usando o *software* Prism 6 (GraphPad Software, CA, EUA).

### **3.2.8 Amostras de linhagens celulares de tumor hepático**

O cultivo das linhagens celulares também foi feito em colaboração com Maria Prates Rivas. As linhagens de hepatoblastoma [HEPG2] (ATCC® HB-8065™), hepatocarcinoma celular [C3A] (ATCC® CRL-10741™) e adenocarcinoma [SK-HEP-1] (ATCC® HTB-52™) foram cultivadas em garrafas de 100 ml em meio *Minimum Essential Medium* (MEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB), sendo mantidas em estufa a 37° e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura das células foi substituído duas vezes por semana e, ao atingir 80% de confluência, as células foram tripsinizadas para novas garrafas de cultura. As

linhagens de carcinoma hepatocelular [SNU-387 (ATCC® CRL-2237™); SNU-423 (ATCC® CRL-2238™); SNU-449 (ATCC® CRL-2234™) e SNU-475 (ATCC® CRL-2236™)] foram cultivadas em garrafas de 100 mm em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, e foram mantidas em estufa a 37° e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura destas células foi substituído a cada 2 dias e, ao atingir 80% de confluência, as células foram tripsinizadas para novas garrafas de cultura. O congelamento das células foi feito em meio de cultura específico de cada linhagem suplementado com SFB e adicionado de 5% de dimetilsulfóxido (DMSO). As células congeladas foram criopreservadas em nitrogênio líquido.

### 3.2.9 Imunohistoquímica

A imunohistoquímica é um método de localização de antígenos em tecidos, explorando o princípio da ligação específica de anticorpos a antígenos no tecido biológico (revisão em RAMOS 2005). É amplamente utilizada na pesquisa básica para compreender a distribuição e localização de biomarcadores e proteínas diferentemente expressas em diferentes partes de um tecido biológico. A visualização de uma interação antígeno anticorpo pode ser obtida de diversas formas. Na situação mais comum, um anticorpo é conjugado a uma enzima, como uma peroxidase, que pode catalisar uma reação que produzirá coloração. Alternativamente, o anticorpo pode também ser marcado com um fluoróforo, como fluoresceína.

Foram estudados 34 casos de hepatoblastoma por imunohistoquímica, sendo nove hepatoblastomas da coorte inicial e 17 casos adicionais do *tissue microarray* (previamente confeccionado no A.C.Camargo Cancer Center). Adicionalmente, foram avaliadas oito amostras do *Texas Children`s Hospital*.

As reações foram realizadas no Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center e os dados foram analisados pela Dra. Isabela Werneck. No caso das amostras do TCH, os experimentos foram feitos pelo Departamento de Patologia e Imunologia do *Texas Children`s Hospital* e as análises foram feitas pela Dra. Dolores López-Terrada.

O detalhamento de cada anticorpo utilizado neste projeto segue abaixo:

- CX3CR1 *Polyclonal Antibody* (ThermoFisher - PA5-19910) IHQ automatizada (Ventana); 1/4000 (recuperação antigênica feita com 30

minutos de incubação com CC1 - pH 9.0 + 32 minutos de incubação do anticorpo + *ultrawash*);

- CX3CL1 *Polyclonal Antibody* (ThermoFisher - PA5-23062) IHQ manual (kit Novolink da Novocastra); 1/25 (recuperação antigênica feita com banho e citrato pH 6.0 + 1 hora de incubação do anticorpo)
- empresa VENTANA clone 14 - monoclonal mouse (específico para a  $\beta$ -catenina); reações são automatizadas no equipamento BenchMark Ultra-VENTANA, e o anticorpo é *ready-to-use*.

### 3.2.10 *Tissue microarray*

O *tissue microarray* consiste na produção de um bloco de parafina com múltiplas amostras teciduais (até 1000), de 0,6 a 2mm (KONONEN et al. 1998), que permite a avaliação de vários casos simultaneamente para estudos populacionais de fatores prognósticos, preditivos e diagnósticos, testes de padrão de reatividade de novos anticorpos e sondas e teste de novas técnicas, além de possibilitar a criação de um microbanco de tecidos.

O *tissue microarray* de hepatoblastomas previamente construído no A.C.Camargo Cancer Center contém 19 casos tumores, dos quais dois fazem parte de nossa casuística de amostras com exoma (HB15 e HB16), que foram avaliados para expressão da proteína diretamente. As demais amostras foram nomeadas HB\_TMA\_XX.

A lâmina havia sido confeccionada para um trabalho anterior da Instituição (CAJAIBA et al. 2006), que investigou os padrões da imunohistoquímica de AFP e de citoqueratina nestas amostras.

---

*RESULTADOS E  
DISCUSSÃO*

---

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este projeto foi iniciado como mestrado em agosto de 2014, tendo se tornado doutorado em fevereiro de 2016.

Os resultados e discussões deste estudo foram divididos em três capítulos:

### **Capítulo 1. Análise dos dados epidemiológicos e clínicos de pacientes com hepatoblastoma**

Descrição do levantamento dos dados disponíveis de pacientes com hepatoblastoma que foram tratados e/ou diagnosticados em três Instituições – A.C.Camargo Cancer Center, GRAACC e ITACI, todas da cidade de São Paulo (SP); dois casos específicos da associação de hepatoblastoma e Hirschprung, um proveniente do Hospital da Baleia (MG), e outro do Hospital da Criança Conceição (RS). Com exceção das amostras provenientes do TCH, recuperamos para 85 casos dados clínicos detalhados.

### **Capítulo 2. Estudo de mutações somáticas em hepatoblastomas para identificação de genes e vias envolvidas na tumorigênese**

Durante este período de estudo de exomas dos tumores, com o propósito de entender melhor a biologia tumoral de hepatoblastomas e mecanismos moleculares associados a seu desenvolvimento, realizamos revisão da literatura científica, o que resultou na publicação de uma pequena revisão: *The genetic and epigenetic landscapes of hepatoblastomas* (*Applied Cancer Research* 2017 37:20 - <https://doi.org/10.1186/s41241-017-0021-0> - **Anexo 1**).

Este capítulo foi dividido em três partes:

- I) Análise de mutações somáticas identificadas em sequenciamento de exoma de um grupo de 10 hepatoblastomas (coorte inicial) pareados com tecidos não-tumorais (fígado e/ou sangue periférico). Após essa análise inicial, foi feita a validação de variantes selecionadas na corte inicial e investigação em coorte adicional de 12 tumores, por meio de painel de sequenciamento de nova

geração. Também realizamos uma análise *in silico* dos genes mutados para identificação de vias biológicas enriquecidas, bem como um estudo de assinatura mutacional de hepatoblastomas baseado nos dados de exoma.

- II) Resultados de sequenciamento de Sanger de genes específicos para detecção de mutações em genes conhecidos de hepatoblastomas (deleção de *CTNNB1*, mutações de *CAPRN2* e *AXIN*), assim como apresentação da análise por imunohistoquímica da proteína beta-catenina.
- III) Resultados e discussão dos estudos de expressão gênica e proteica do gene *CX3CL1* e seu receptor *CX3CR1* em hepatoblastomas.

### **Capítulo 3. Investigação de mutações germinativas de predisposição a câncer e/ou anomalias congênicas em pacientes com hepatoblastomas.**

Este projeto foi iniciado no final do doutoramento e irá continuar após seu término. A proposta é baseada na investigação de mutações germinativas de predisposição a câncer em pacientes com hepatoblastomas, por meio de investigação de alterações de número de cópias genômicas por microarranjo genômico e sequenciamento de exoma. Neste capítulo serão apresentados dados preliminares de variantes germinativas detectadas em três pacientes.

A **Tabela 4** apresentada abaixo resume os principais achados experimentais (correspondentes aos Capítulos 2 e 3) deste trabalho, para cada amostra.

**Tabela 4** - Resumo dos principais achados experimentais deste estudo, referentes à análise de mutações somáticas, assinaturas mutacionais e expressão gênica.

ID	Mutações somáticas sequenciamento de exoma	<i>Sanger CX3CLI</i>	<i>Sanger CTNNB1</i>	Identificação nuclear $\beta$ -catenina (IHQ)	Expressão proteica CX3CLI (IHQ)	Expressão proteica CX3CRI (IHQ)	Expressão gênica CX3CLI (qPCR)	Expressão gênica CX3CRI (qPCR)	Assinatura mutacional predominante	Variantes germinativas
HB15	17	<i>Wild type</i>	A5_A80del	Positivo	Positivo	Negativo	RQ>2	RQ>2	HB-S3	ND
HB16	1	<i>Wild type</i>	G34E	Positivo	Positivo	Negativo	ND	ND	HB-S2	Amostra coletada
HB17	Nenhuma variante identificada	<i>Wild type</i>	<i>Wild type</i>	Negativo	Positivo	Negativo	RQ<2	RQ>2	HB-S2	Amostra coletada
HB18	2	<i>Wild type</i>	T41A	Positivo	Positivo	Negativo	RQ>2	RQ>2	HB-S1	ND
HB28	Nenhuma variante identificada	<i>Wild type</i>	<i>Wild type</i>	ND	ND	ND	RQ<2	RQ>2	HB-S2	Amostra coletada
HB30	15	<i>Wild type</i>	<i>Wild type</i>	Negativo	Positivo	Negativo	RQ<2	RQ<2	HB-S3	Amostra coletada
HB31	13	<i>Wild type</i>	A5_Y142del	Positivo	Positivo	Negativo	RQ>2	RQ<2	HB-S3	Amostra coletada
HB32	1	A235G	<i>Wild type</i>	Positivo	Positivo	Positivo	RQ>2	RQ>2	HB-S1	Amostra coletada
HB33	38	A235G	G34V	Positivo	Positivo	Positivo	RQ>2	RQ<2	HB-S2	18 variantes; aCGH feito
HB46	7	<i>Wild type</i>	G34E	Positivo	Positivo	Negativo	RQ<2	RQ<2	HB-S1	Exoma e aCGH feitos
HB34	ND	<i>Wild type</i>	<i>Wild type</i>	ND	ND	ND	RQ>2	RQ<2	ND	ND
HB35	ND	<i>Wild type</i>	S29F/D32A	ND	ND	ND	RQ>2	RQ<2	ND	ND
HB36	ND	<i>Wild type</i>	<i>Wild type</i>	ND	ND	ND	RQ<2	RQ>2	ND	ND
HB38	ND	<i>Wild type</i>	<i>Wild type</i>	ND	ND	ND	RQ>2	RQ<2	ND	ND
HB39	ND	<i>Wild type</i>	T41A	ND	ND	ND	RQ<2	RQ<2	ND	ND
HB40	ND	<i>Wild type</i>	A21_Ser33del	ND	ND	ND	RQ>2	RQ<2	ND	ND
HB41	ND	<i>Wild type</i>	<i>Wild type</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HB42	ND	<i>Wild type</i>	<i>Wild type</i>	ND	ND	ND	RQ>2	RQ<2	ND	ND
HB43	ND	<i>Wild type</i>	A5_Y142del	ND	ND	ND	RQ<2	RQ<2	ND	ND
HB44	ND	<i>Wild type</i>	<i>Wild type</i>	ND	ND	ND	RQ<2	RQ<2	ND	ND
HB45	ND	<i>Wild type</i>	A5_A80del	ND	ND	ND	RQ>2	RQ<2	ND	ND
HB66	ND	<i>Wild type</i>	S33C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCH306	ND	<i>Wild type</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCH307	ND	<i>Wild type</i>	ND	ND	Positivo	Positivo	ND	ND	ND	ND
TCH310	ND	<i>Wild type</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCH311	ND	<i>Wild type</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCH321	ND	ND	ND	ND	Positivo	Positivo	ND	ND	ND	ND
TCH323	ND	ND	ND	ND	Positivo	Positivo	ND	ND	ND	ND
TCH324	ND	<i>Wild type</i>	ND	ND	Positivo	Positivo	ND	ND	ND	ND
TCH325	ND	<i>Wild type</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCH327	ND	<i>Wild type</i>	ND	ND	Positivo	Positivo	ND	ND	ND	ND

Cont. /Tabela 4

ID	Mutações somáticas sequenciamento de exoma	Sanger CX3CL1	Sanger CTNNB1	Identificação nuclear β-catenina (IHQ)	Expressão proteica CX3CL1 (IHQ)	Expressão proteica CX3CR1 (IHQ)	Expressão gênica CX3CL1 (qPCR)	Expressão gênica CX3CR1 (qPCR)	Assinatura mutacional predominante	Variantes germinativas
TCH352	ND	Wild type	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCH353	ND	Wild type	ND	ND	Positivo	Positivo	ND	ND	ND	ND
TCH360	ND	Wild type	ND	ND	Positivo	Positivo	ND	ND	ND	ND
TCH361	ND	Wild type	ND	ND	Positivo	Positivo	ND	ND	ND	ND
TCH433	ND	Wild type	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCH442	ND	Wild type	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCH444	ND	Wild type	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HB_TMA01	ND	ND	ND	Positivo	Positivo	Negativo	ND	ND	ND	ND
HB_TMA02	ND	Wild type	Wild type	Positivo	Positivo	Negativo	ND	ND	ND	ND
HB_TMA03	ND	ND	ND	Negativo	Negativo	Negativo	ND	ND	ND	ND
HB_TMA04	ND	Wild type	Wild type	Positivo	Negativo	Negativo	ND	ND	ND	ND
HB_TMA05	ND	Wild type	Wild type	Positivo	Positivo	Negativo	ND	ND	ND	ND
HB_TMA06	ND	Wild type	Wild type	Positivo	Negativo	Negativo	ND	ND	ND	ND
HB_TMA07	ND	ND	ND	Positivo	Positivo	Negativo	ND	ND	ND	ND
HB_TMA08	ND	ND	ND	Negativo	Positivo	Negativo	ND	ND	ND	ND
HB_TMA09	ND	Wild type	Wild type	Positivo	Positivo	Negativo	ND	ND	ND	ND
HB_TMA10	ND	ND	ND	Negativo	Negativo	Negativo	ND	ND	ND	ND
HB_TMA11	ND	Wild type	Wild type	Positivo	Negativo	Negativo	ND	ND	ND	ND
HB_TMA12	ND	Wild type	Wild type	Negativo	Negativo	Negativo	ND	ND	ND	Amostra coletada
HB_TMA13	ND	Wild type	Wild type	Positivo	Positivo	Negativo	ND	ND	ND	ND
HB_TMA14	ND	Wild type	Wild type	Positivo	Positivo	Negativo	ND	ND	ND	ND
HB_TMA15	ND	Wild type	Wild type	Positivo	Positivo	Negativo	ND	ND	ND	ND
HB_TMA16	ND	Wild type	Wild type	Positivo	Positivo	Negativo	ND	ND	ND	ND
HB_TMA18	ND	Wild type	Wild type	Positivo	Negativo	Negativo	ND	ND	ND	ND
HB06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Amostra coletada
HB49	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Amostra coletada
HB54	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Amostra coletada
HB64	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Exoma e aCGH feitos
HB65	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Exoma e aCGH feitos
HB67	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Amostra coletada
HB69	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Amostra coletada
HB71	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Amostra coletada
HB72	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Exoma e aCGH feitos
HB73	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Amostra coletada
HB74	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Amostra coletada
HB77	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Amostra coletada
HB78	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Amostra coletada

ND corresponde aos casos que não tinham amostras disponíveis para o experimento, ou casos que não foram testados. Para as análises de imunohistoquímica (IHQ), o resultado foi simplificado na tabela, entretanto maiores detalhes serão apresentados ao longo da discussão sobre os resultados obtidos. RQ>2 corresponde ao valor absoluto de RQ e foi considerado como aumento de expressão em relação ao controle

## **CAPÍTULO 1**

### **Análise dos dados epidemiológicos e clínicos de pacientes com hepatoblastoma**

#### 4.1.1 Definindo as variáveis

O tratamento do câncer é cada vez mais definido por estratégias individualizadas. A identificação e validação de marcadores biológicos está diretamente associada à coleta adequada de dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes. Para tumores muito raros, como o hepatoblastoma, a identificação de fatores de risco e o estabelecimento de biomarcadores continuam sendo aspectos muito desafiadores.

A maioria dos registros de câncer apresenta seus dados dispostos em categorias de idade com intervalos de 5 anos e por localização primária do tumor. Apesar deste formato ser satisfatório para a maioria dos tumores do adulto, ele se mostra inadequado para o câncer infantil. A utilização de intervalos de tempo tão longos impossibilita a detecção de grandes variações nas taxas específicas de cada subtipo tumoral por idade, ano a ano, assim como mascara possíveis padrões demográficos.

Outra dificuldade relevante se deve à periodicidade de 10 anos dos censos demográficos brasileiros, o que faz com que as taxas de incidência e mortalidade sejam calculadas com base em populações estimadas intercensitárias. Este artifício matemático induz a erros, sobretudo quando o numerador se constitui de números muito pequenos, caso dos tumores pediátricos (INCA – “O problema do câncer no Brasil” 1997).

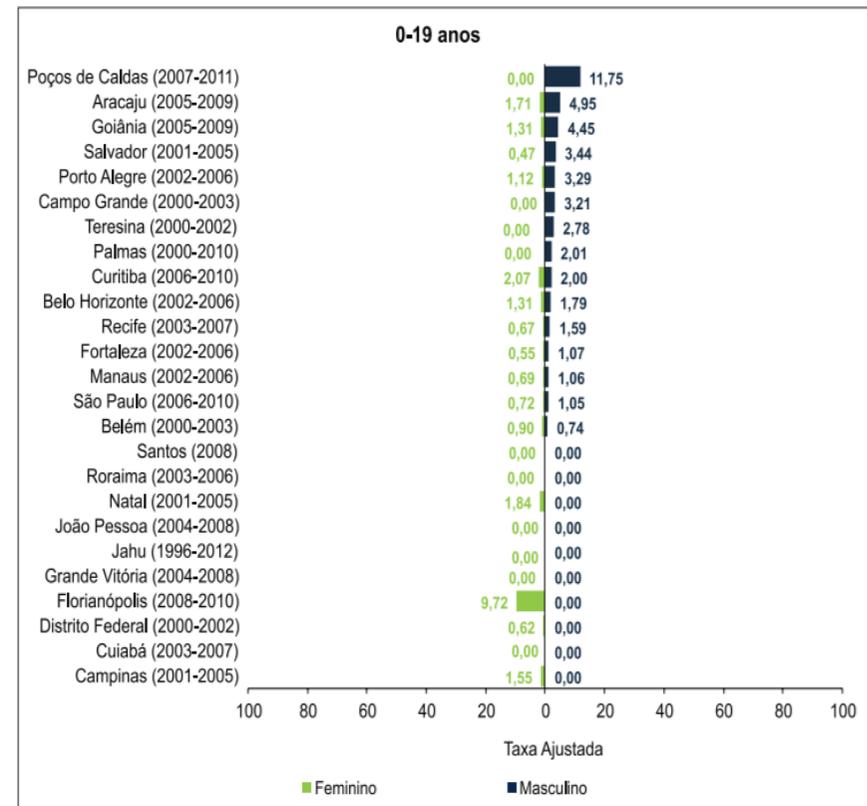
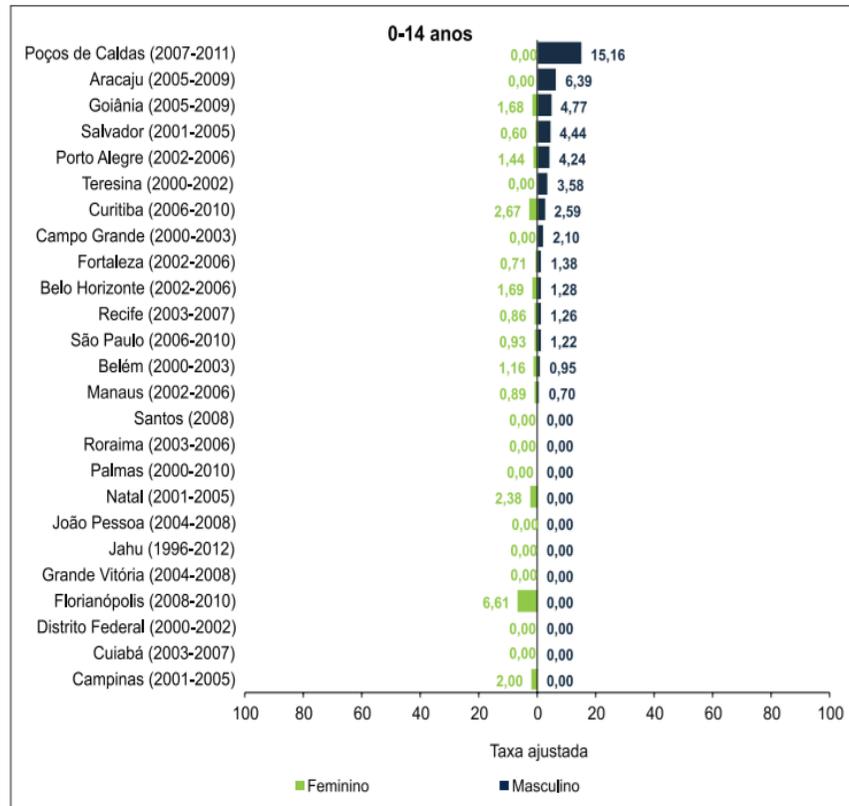
Vale considerar, também, que a cada dia as classificações dos tumores ganham mais detalhamento, em decorrência de avanços no conhecimento científico e médico. A incorporação desses novos conhecimentos disponíveis é essencial à prática da Oncologia Pediátrica e aos estudos sobre a etiologia dos tumores na infância; entretanto, dependem não apenas da transferência de tecnologias sofisticadas para a prática clínica, como assinaturas gênicas, como também de recursos para realizar estes testes.

Como mencionado anteriormente, de acordo com o *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program-SEER* a prevalência de hepatoblastomas nos EUA praticamente dobrou nas últimas décadas. A causa do aumento do número de casos não pode ser atribuída apenas à maior precisão no diagnóstico; essa causa (ou causas) ainda é desconhecida, mas uma das possíveis explicações

seria o aumento na sobrevivência de prematuros com baixo peso ao nascimento, um dos fatores de risco associados ao desenvolvimento de hepatoblastomas (TURCOTTE et al. 2014). Adicionalmente, todos os trabalhos já feitos indicam a incidência maior em meninos, entretanto sem explicação ainda conhecida.

No Brasil, os dados acerca de ocorrência de hepatoblastoma do país são coletados pelo INCA, a partir dos Registros de câncer de bases populacionais de cada estado. O **Figura 16** mostra a prevalência de tumores hepáticos do tipo hepatoblastoma em crianças e adolescentes em diferentes regiões do país. Estas informações foram divulgadas no relatório de 2017 do INCA, também evidenciando maior prevalência de meninos na maioria das regiões (Ministério da Saúde 2017)

De maneira notável, algumas regiões se sobressaem por terem notificado um número muito maior de casos no período (Poços de Caldas e Florianópolis, nesta última cidade com prevalência maior de meninas). No entanto, não existe na literatura uma justificativa (ou estudo) para tal aumento de casos de hepatoblastoma nessas regiões; uma das limitações apontadas pelo INCA é o erro de anotação da informação, ou seja, notifica-se um caso com CID de hepatoblastoma, entretanto não se trata de fato deste tipo tumoral (Ministério da Saúde 2018).



Fonte: Ministério da Saúde (2017)

**Figura 16** - Taxas de incidência de Tumores Hepáticos (grupo VII - Hepatoblastoma) ajustadas por idade, para um milhão de crianças e adolescentes, segundo sexo (feminino em verde claro e masculino em verde escuro). As taxas são ajustadas com base nos dados obtidos dos respectivos Registros de câncer de bases populacionais e período de referência.

Realizamos uma extensa caracterização dos casos de hepatoblastomas que estudamos neste projeto, baseada principalmente nos estudos de estratificação de risco para este subtipo tumoral, como os dois publicados pelo CHIC (CZAUDERNA et al. 2016 e MEYERS et al. 2017). Essa análise mais detalhada tinha como objetivo central a estratificação de risco dos pacientes com hepatoblastomas de nossa casuística atendidos na instituição A.C.Camargo Cancer Center e também no GRAACC e ITACI, casos para os quais haviam sido coletadas amostras de tumor, visando a correlação com dados obtidos nas análises moleculares que foram realizadas. Entretanto, esse levantamento propiciou uma visão geral, quantitativa e qualitativa dos pacientes, de quantas amostras biológicas estavam disponíveis e também o reconhecimento de pacientes que ainda estavam em acompanhamento, para contato e proposição de estudos futuros relacionados ao estudo de mutações germinativas. Adicionalmente, como este projeto foi desenvolvido em uma das maiores instituições de referência em câncer no Brasil, utilizamos todo o banco de dados do A.C.Camargo Cancer Center para realizar um levantamento acerca de dados clínicos e epidemiológicos de casos de hepatoblastomas registrados a partir de 1977, independentemente da inclusão de amostras biológicas.

Foram anotadas as seguintes informações: idade ao diagnóstico, sexo, laudo anatomopatológico, dosagem de AFP no momento do diagnóstico e pós-tratamento, envolvimento da veia cava, bifurcação da veia porta, tumor multifocal, ruptura tumoral, PRETEXT, esquema quimioterápico empregado, com início e término do tratamento, ocorrência de hepatectomia parcial ou transplante, recidiva, metástase, sobrevida global, intercorrências durante o pré e pós natal, presença de sinais clínicos adicionais não relacionados ao tumor (dismorfismos, atraso de desenvolvimento, anomalias congênitas), baixo peso ao nascimento para a idade gestacional, prematuridade, antecedentes familiares e pessoais de câncer ou outras patologias, como infecções.

Uma publicação de 2014, da Organização Mundial da Saúde (*Global Nutrition Targets 2025: low birth weight policy brief*), considera como baixo peso ao nascer neonatos abaixo de 2500g, sem prematuridade. O baixo peso ao nascer

continua a ser um problema de saúde pública significativo em todo o mundo e está associado a uma série de consequências a curto e a longo prazo.

No geral, estima-se que em todo o mundo de 15% a 20% dos neonatos estão com baixo peso ao nascer, representando mais de 20 milhões de nascimentos por ano. A prematuridade é definida como o bebê que nasce com menos de 37 semanas de gestação (36 semanas e 6 dias). No Brasil, os bebês prematuros correspondem a 12,4% dos nascidos vivos, de acordo com dados do Sistema de Informações Sobre Nascidos Vivos (SINASC) e do Ministério da Saúde (dados de 2014).

#### **4.1.2 Análise descritiva**

Os dados clínicos disponíveis foram recuperados dos prontuários armazenados no Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do AC Camargo Cancer Center, sob supervisão da Dra. Cecília Maria Lima da Costa. Os dados clínicos referentes às amostras do GRAACC foram recuperados com o auxílio das Dras. Silvia Regina Caminada Toledo e Monica dos Santos Cypriano. No ITACI, os dados foram coletados com o auxílio do Dr. Vicente Odone e da Dra. Lilian Cristofani.

Ao todo foram coletadas informações sobre 85 pacientes afetados por hepatoblastomas, com diagnóstico entre os anos de 1977 e 2017. No A.C. Camargo Cancer Center resgatamos dados de 64 pacientes; 13 pacientes são provenientes do GRAACC e seis pacientes do ITACI. Dois casos específicos da associação de hepatoblastoma e Hirschprung também foram contabilizados, um proveniente do Hospital da Baleia (MG) e outro do Hospital da Criança Conceição (RS). A **Tabela 5** abaixo apresenta a identificação que demos às amostras, instituição de origem, sexo, idade ao diagnóstico, laudo anatomopatológico e sobrevida global.

**Tabela 5** - Principais informações clínicas de 85 casos de pacientes com hepatoblastoma atendidos nas instituições de câncer pediátrico colaboradoras.

ID	Idade ao diagnóstico	Sexo	Instituição	Histologia	Metástase	Sobrevida global
HB_TMA01	11 meses	F	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial com predomínio fetal	Não	>5 anos
HB_TMA02	1 ano	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial com predomínio fetal	Não	>5 anos
HB_TMA03	4 anos	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial fetal	Não	>5 anos
HB_TMA04	2 anos	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial fetal	Não	6 anos
HB_TMA05	1 ano	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial com predomínio embrionário e mesenquimal misto	Não	2 meses
HB_TMA06	3 anos	F	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial embrionário	ND	ND
HB_TMA07	7 meses	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial com predomínio embrionário e mesenquimal (osteóide) misto	Não	>5 anos
HB_TMA08	6 anos	F	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial com predomínio fetal	Não	1 ano
HB_TMA09	2 anos	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial embrionário e fetal	Não	>5 anos
HB_TMA10	9 meses	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial com predomínio fetal e mesenquimal misto	ND	>5 anos
HB_TMA11	1 ano	F	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial com predomínio fetal	Não	>5 anos
HB_TMA12	3 anos	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial com predomínio fetal e mesenquimal misto	Pulmonar	>5 anos
HB_TMA13	7 anos	F	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial embrionário e fetal	Não	>5 anos
HB_TMA14	2 anos	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial e mesenquimal (osteóide) misto	Não	>5 anos
HB_TMA15	1 ano	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial embrionário e fetal	Não	>5 anos
HB_TMA16	2 anos	F	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial fetal	Não	>2 anos
HB_TMA18	2 anos	F	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial com predomínio embrionário	Não	>5 anos
HB01	7 meses	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial fetal	Não	7 meses
HB02	1 mês	M	A.C Camargo Cancer Center	Mesenquimal (osteóide)	Não	>5 anos
HB03	5 anos	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial fetal	Pulmonar	6 meses
HB04	1 ano	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial embrionário e fetal	Pulmonar	>5 anos
HB05	1 ano	M	A.C Camargo Cancer Center	Mesenquimal (osteóide)	Não	>5 anos
HB06	12 meses	M	A.C Camargo Cancer Center	Mesenquimal (osteóide)	Pulmonar	>5 anos
HB07	1 ano	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial fetal	Intestino	10 anos
HB08	2 anos	F	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial fetal	Não	ND
HB09	ND	M	A.C Camargo Cancer Center	ND	ND	ND
HB10	4 anos	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial fetal	Não	1 ano
HB11	1 ano	F	A.C Camargo Cancer Center	ND	Não	>5 anos
HB12	6 anos	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial embrionário	Não	ND
HB13	8 meses	M	A.C Camargo Cancer Center	Hepatoblastoma anaplásico	Pulmonar	>5 anos
HB14	10 meses	F	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial embrionário	Óssea	1 ano
HB15	1 ano	F	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial embrionário	Não	1 ano
HB16	9 meses	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial fetal	Não	>5 anos
HB17	3 anos	F	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial fetal	Não	>5 anos
HB18	9 meses	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial com predomínio fetal e mesenquimal misto	Não	>5 anos
HB28	17 anos	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial e mesenquimal misto	Não	4 anos
HB30	4 anos	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial com predomínio fetal - HCC features	Pulmonar	5 anos
HB31	2 anos	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial fetal	Não	>5 anos

Cont. / Tabela 5

ID	Idade ao diagnóstico	Sexo	Instituição	Histologia	Metástase	Sobrevida global
HB32	3 anos	F	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial com componentes padrão tubular	Pulmonar	>5 anos
HB33	1 mês	F	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial embrionário e fetal	Não	>5 anos
HB34	1 ano	F	GRAACC	Epitelial fetal	Não	>5 anos
HB35	2 anos	M	GRAACC	Epitelial fetal	Não	>5 anos
HB36	2 anos	M	GRAACC	Epitelial com predomínio fetal	Não	>3 anos
HB37	1 ano	F	GRAACC	Epitelial com predomínio embrionário	Não	>5 anos
HB38	12 anos	F	GRAACC	Epitelial fetal	Não	>2 anos
HB39	7 anos	M	GRAACC	Epitelial com focos macrotrabeculares	Não	6 meses
HB40	1 ano	M	GRAACC	Epitelial embrionário e fetal	Não	>5 anos
HB41	1 ano	M	GRAACC	Epitelial com predomínio fetal	Pulmonar	>5 anos
HB42	3 anos	M	GRAACC	Epitelial fetal	Não	>5 anos
HB43	1 ano	M	GRAACC	Epitelial embrionário	Não	>5 anos
HB44	5 meses	M	GRAACC	Epitelial e mesenquimal misto, com componente teratóide	Não	>5 anos
HB45	5 meses	F	GRAACC	Epitelial fetal	Não	1 ano
HB46	2 anos	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial e mesenquimal misto, com componente teratóide	Pulmonar	>2 anos
HB47	7 meses	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial fetal	Não	>5 anos
HB48	2 anos	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial embrionário e fetal	Não	>2 anos
HB49	7 meses	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial com predomínio fetal e mesenquimal misto	Pulmonar	>1 ano
HB50	1 mês	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial e mesenquimal misto	Não	1 ano
HB51	3 anos	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial embrionário e fetal	Não	2 meses
HB52	3 anos	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial com predomínio fetal e mesenquimal misto	Não	>3 anos
HB53	2 anos	F	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial embrionário	Pulmonar e cerebral	1 ano
HB54	1 ano	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial com predomínio fetal	Não	>6 meses
HB55	8 meses	M	A.C Camargo Cancer Center	ND	Não	3 meses
HB56	11 anos	F	A.C Camargo Cancer Center	ND	Não	>5 anos
HB57	1 ano	F	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial fetal	Não	>5 anos
HB58	7 meses	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial e mesenquimal misto	Não	>5 anos
HB59	10 meses	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial e mesenquimal misto	Pulmonar	1 ano
HB60	7 anos	F	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial e mesenquimal misto	Não	>5 anos
HB61	1 ano	F	A.C Camargo Cancer Center	ND	Não	>5 anos
HB62	2 anos	F	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial fetal	Não	>5 anos
HB63	4 anos	F	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial e mesenquimal misto	Não	2 meses
HB64	4 anos	F	H.B.	Epitelial com predomínio embrionário	Não	1 ano
HB65	1 ano	M	H.C.C.	Epitelial fetal	Não	>2 anos
HB66	10 meses	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial com predomínio embrionário	Pulmonar	1 ano
HB67	2 meses	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial embrionário e fetal	Pulmonar	>1 ano
HB68	1 ano	F	A.C Camargo Cancer Center	ND	Não	>5 anos
HB69	7 meses	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial e mesenquimal misto	Não	ND
HB70	6 anos	F	ITACI	Epitelial fetal	Pulmonar	20 meses

**Cont. / Tabela 5**

<b>ID</b>	<b>Idade ao diagnóstico</b>	<b>Sexo</b>	<b>Instituição</b>	<b>Histologia</b>	<b>Metástase</b>	<b>Sobrevida global</b>
HB71	1 ano	F	ITACI	Epitelial embrionário e fetal	Não	10 meses
HB72	5 meses	M	GRAACC	Epitelial fetal	Não	>1 ano
HB73	6 meses	M	A.C Camargo Cancer Center	Epitelial embrionário e fetal	Pulmonar	>1 ano
HB74	ND	M	ITACI	ND	ND	ND
HB75	3 meses	M	ITACI	Epitelial fetal	ND	ND
HB76	ND	M	ITACI	ND	ND	ND
HB77	9 anos	M	ITACI	Epitelial fetal	ND	ND
HB78	9 meses	M	A.C Camargo Cancer Center	ND	Não	>1 ano

**Legenda:** ID: Identificação da amostra; HB: hepatoblastoma; HB\_TMA: casos de hepatoblastomas contidos em *tissue microarray* feito no A.C.Camargo Cancer Center (CAJAIBA et al.2006); M: masculino; F: feminino; ND: dado não disponível.

Os dados apontados nesta tabela mostram prevalência de meninos (66%) e idade média ao diagnóstico de 2 anos e 6 meses. O tipo histológico tumoral mais frequente foi Epitelial Fetal; dentre os casos com informação sobre metástase (71/85) 25% apresentaram metástase ao diagnóstico (15 pacientes com metástase pulmonar, sendo 11 meninos; um caso com metástases pulmonar e cerebral; um caso com metástase intestinal; um de metástase óssea). Dentre os 76 pacientes com informação de sobrevida global 22 casos foram a óbito pela doença em até 5 anos (22%); houve registro de um caso de óbito após 10 anos do diagnóstico por overdose de substâncias ilícitas.

Outras informações relevantes neste levantamento foram recuperadas com relação ao tratamento para 67 pacientes. Dois pacientes tinham tumores ressecáveis ao diagnóstico, sem quimioterapia neoadjuvante, e um tinha indicação direta de transplante hepático. A quimioterapia neoadjuvante foi realizada em 64 desses pacientes, sendo o protocolo da SIOPEL3 o mais frequente; desses, após a quimioterapia neoadjuvante, 49 realizaram hepatectomia parcial 11 foram indicados para transplante, um paciente foi à óbito antes do término dos ciclos de quimioterapia, e em dois casos foi perdido o seguimento, sem informações sobre continuidade do tratamento. Dentre estes pacientes, nove sofreram recidiva local, ao passo que outros dois apresentaram tumores secundários, linfoma (não especificado o subtipo) e carcinoma mucoepidermóide, respectivamente.

Doze pacientes nasceram antes de 37 semanas (prematturos), dentre os quais 11 possuíam baixo peso (abaixo de 1100g) em decorrência da prematuridade. Oito mães relataram problemas gestacionais diferentes (descritos no item 4 deste capítulo) em associação com condições clínicas específicas.

Outra característica possível de ser avaliada é a quantidade de pacientes diagnosticados em cada ano, desde 1977 até 2017. A média geral do número de diagnósticos ao longo dos 40 anos, foi de 2,05 pacientes por ano.

#### **4.1.3 Análise estatística considerando variáveis de risco e gênero**

Dentre os dados levantados nesta casuística, 56 pacientes eram meninos e 29 meninas (1,9:1), indicando concordância com os dados da literatura, em relação ao maior número de casos em meninos. Das 26 variáveis coletadas, foi possível

aplicar o teste de Qui-quadrado de Pearson para 17 delas, com o objetivo de determinar se alguma das características da casuística teria significância estatística, em relação ao sexo do paciente. Foram selecionadas variáveis indicadas nos estudos de estratificação de risco do CHIC, que foram associadas a pior prognóstico: idade ao diagnóstico (**>8 anos**), subtipo histológico, dosagem de AFP ( $\geq 1000$  ng/mL; 101-1000 ng/mL;  **$\leq 100$ ng/mL**), PRETEXT IV, VPEFR positivo (envolvimento de veia cava, tumor multifocal, invasão vascular, bifurcação da veia porta, ruptura tumoral), metástase, transplante, recidiva, prematuridade (abaixo de 37 semanas de gestação), baixo peso ao nascimento (abaixo de 2500g), apresentação de outras condições clínicas não relacionadas com o hepatoblastoma e óbito pela doença.

A **Tabela 6** reúne os resultados desta análise, que foram feitos usando o *IBM SPSS Statistics software* (Stable release: 25.0 / August 8 2017).

**Tabela 6** - Análise estatística entre as variáveis consideradas de pior prognóstico (CHIC e outras) e o gênero dos pacientes.

	Meninos (n=56/85)	Meninas (n= 29/85)	Valor $\chi^2$	p-valor
Idade >8 anos (n= 4/84)	2	2	0,44	0,50
<b>Subtipo histológico</b>				
<b>Epitelial Embrionário (n= 10/76)</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>6,55</b>	<b>0,01</b>
Epitelial Fetal (n= 31/76)	19	12	0,47	0,49
Epitelial Embrionário e Fetal (n= 11/76)	8	3	0,27	0,60
<b>Epitelial e Mesenquimal misto (n= 17/76)</b>	<b>15</b>	<b>2</b>	<b>4,90</b>	<b>0,02</b>
Outros (n= 7/76)	5	2	0,10	0,74
<b>Nível de alfafeto-proteína (AFP)</b>				
≤ 100 ng/mL (n= 0/37)	0	0	.	.
101-1000 ng/mL (n= 2/37)	1	1	0,20	0,65
≥ 1001 ng/mL (n= 35/37)	23	12	0,20	0,65
Metástase (n= 18/71)	14	4	1,78	0,18
PRETEXT IV (n= 23/61)	15	8	1,72	0,18
VPEFR + (n= 21/62)	16	5	0,69	0,40
Transplante (n= 16/74)	9	7	0,46	0,49
Recidiva (n= 11/69)	5	6	1,5	0,20
Prematuro (n= 12/60)	7	5	0,30	0,57
Baixo peso ao nascimento (n= 11/60)	6	5	0,89	0,34
Outras condições clínicas (n= 19/60)	10	9	2,46	0,11
Óbito pela doença (n= 22/ 76)	13	9	0,62	0,43

**Legenda:** Os valores de n correspondem ao número de casos que tinham aquela variável dentre todos os casos para os quais existia a informação. O Valor  $\chi^2$  corresponde ao valor da equação de Qui-quadrado e o valor de *p* a significância estatística desta análise de variantes entre meninos e meninas portadores de hepatoblastoma. Os valores em vermelho correspondem ao  $p \leq 0,05$ , indicando variáveis que não são independentes.

Os valores de n correspondem ao número de casos que tinham aquela variável dentre todos os casos para os quais existia a informação. Como exemplo, para o item idade, recuperamos o dado para 84 pacientes, sendo que em 4 casos a afirmação >8 anos era verdadeira, sendo assim n=4/84.

A análise sugere uma associação apenas de subtipo histológico com gênero, sendo tumores do tipo Epitelial Embrionário mais frequentes em meninas e Epitelial e Mesenquimal misto em meninos. O subtipo Epitelial Embrionário apresenta maior similaridade morfológica com hepatoblastos, que são células ainda

não totalmente diferenciadas, sendo caracterizado como pior prognóstico (LÓPEZ-TERRADA et al. 2012; SUMAZIN et al. 2017). De fato, das sete meninas que desenvolveram hepatoblastomas epitelial, quatro foram à óbito; cinco foram diagnosticadas como PRETEXT IV, duas apresentaram metástases ao diagnóstico, quatro receberam transplante e duas recidivaram.

Não houve associação estatística significativa entre os fatores clínicos avaliados, com exceção de gênero e tipo histológico.

#### **4.1.4 Análise qualitativa dos pacientes - intercorrências no período pré/perinatal e sinais clínicos adicionais**

Quatro mães desenvolveram hipertensão e/ou diabetes gestacional (HB36, HB38, HB66 e HB73), sendo todos pacientes nascidos prematuros e abaixo do peso, como esperado, com exceção de HB73. Dentre esses, três deles possuem ressalvas em relação à prematuridade e também ao diagnóstico e evolução do tumor:

- HB38 permaneceu 23 dias na UTI em intubação endotraqueal e com diagnóstico de neuropatia anóxica isquêmica por prematuridade extrema. É uma paciente do sexo feminino, que possui um dos diagnósticos mais tardios da casuística (12 anos) e que apresentou recidiva local. A família relata dois casos de câncer, avô materno com melanoma e avó paterna com carcinoma hepatocelular em idade avançada.

- Além da hipertensão gestacional, a mãe do paciente HB66 relatou ser portadora de Artrite de Takayasu - vasculite crônica desencadeada por uma reação autoimune em pessoas com predisposição genética (OMIM #207600). Essa doença acomete principalmente a aorta e seus ramos principais, levando ao espessamento inflamatório e ao dano da parede dos vasos, com subsequente estenose ou formação de aneurisma (TAKAYASU 1908; NUNES et al. 2010). Após o nascimento, o paciente HB66, do sexo masculino, ficou internado por aproximadamente quatro meses com pneumonia de repetição por aspiração. Foi diagnosticado com hepatoblastoma aos dez meses, com histologia do subtipo Epitelial Embrionário e com metástase pulmonar ao diagnóstico, ambos caracterizando um pior prognóstico. Foi indicado tratamento quimioterápico

SIOPEL6, com hepatectomia parcial, entretanto o paciente recidivou e foi a óbito um ano após o diagnóstico. Este paciente apresentava outras co-morbidades antes do diagnóstico do tumor: atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, surdez neurossensorial e rins em ferradura.

- HB73, do sexo masculino, logo após o nascimento apresentou uma icterícia neonatal, sem necessidade de fototerapia. O tumor foi diagnosticado aos 6 meses, com metástase pulmonar. Foi recomendado protocolo SIOPEL6 e o paciente se encontra em acompanhamento.

A mãe da paciente HB34 relatou a ocorrência de hepatite C não tratada durante o período gestacional. A paciente HB45 foi diagnosticada com cinco meses com tumor do subtipo Epitelial Fetal e tinha como único fator de prognóstico desfavorável o nível de AFP < 100ng/mL, mas foi à óbito após um ano do diagnóstico; a mãe relatou infecção urinária durante a gestação e um parto com intercorrências, no qual o neonato fraturou a clavícula esquerda e recebeu por dois dias fototerapia.

No caso do paciente HB72, a mãe apresentou eventos de hipoglicemia no terceiro trimestre da gestação e recebeu soro glicosado. O paciente, do sexo masculino, foi diagnosticado aos cinco meses com um tumor de risco intermediário (PRETEXT IV sem metástases, AFP > 2.000.000 ng/mL, tumores multifocais e envolvimento da veia cava). A mãe relatou que desde o nascimento foi observado um aumento abdominal, entretanto assintomático; por esta razão, este hepatoblastoma foi considerado congênito. O paciente foi submetido ao protocolo quimioterápico AHEP 0731 do COG, seguido por ressecção cirúrgica; encontra-se em acompanhamento pós-tratamento.

Dois pacientes síndrômicos diagnosticados com doença de Hirschprung que posteriormente desenvolveram hepatoblastomas foram incluídos em nosso estudo. Os detalhes destes pacientes encontram-se no **Capítulo 3**.

Outras características da casuística merecem um detalhamento. A paciente HB53, foi a primeira a nascer de uma gestação gemelar, na qual sua irmã faleceu após 52 dias de vida, por sepse. O nascimento foi prematuro (25 semanas), tendo permanecido por quatro meses na UTI neonatal, três destes em ventilação mecânica. Aos seis meses desenvolveu insuficiência da válvula tricúspide, em

decorrência de endocardite bacteriana, sendo submetida à valvoplastia. O tumor hepatoblastoma foi diagnosticado aos dois anos, subtipo Epitelial Embrionário, PRETEXT IV, multifocal e com envolvimento da veia cava. Ao diagnóstico, a paciente tinha metástase pulmonar e posteriormente foi detectado um nódulo cerebral. Foi submetida ao protocolo SIOPEL6, entretanto não teve boa resposta ao tratamento e recebeu um transplante hepático, proveniente de seu pai. Após a cirurgia, recebeu mais alguns ciclos de quimioterapia, mas teve recidiva local e foi à óbito. A família paterna desta paciente tinha histórico de câncer: avô com câncer de pele não especificado; bisavô com câncer de fígado e de pele, também não especificados subtipos; e bisavó, câncer de intestino e pâncreas.

O paciente HB69 também foi proveniente de uma gestação trigemelar (segundo a nascer). As crianças nasceram prematuras (30 semanas), mas apenas o paciente HB69 apresentou complicações graves: sepse neonatal, hérnia inguinal bilateral, hemorragia intraventricular grau II, colestase, broncodisplasia e hipotireoidismo neonatal. Passou seis meses na UTI com ventilação mecânica. Além disso, tinha refluxo gastroesofágico e seria portador de doença metabólica óssea (apontamento na ficha sem detalhamento). A Doença Metabólica Óssea diz respeito às alterações de mineralização esquelética observadas em prematuros, quando comparado ao esqueleto fetal normal, e apresenta como sintomas quadro de desconforto respiratório tardio (pela falta de sustentação da caixa torácica), com o desenvolvimento de atelectasias, agravando quadros de displasia broncopulmonar (MAYNE et al. 1991).

O tumor foi diagnosticado aos sete meses, subtipo Epitelial e Mesenquimal misto; o paciente foi submetido ao protocolo SIOPEL6, seguido de hepatectomia, ainda em acompanhamento pós-tratamento.

Outro paciente também apresentou intercorrências durante o pós-natal. HB46, do sexo masculino, nasceu prematuro de 27 semanas (peso 945g) e ficou internado por cinco meses, recebendo ventilação mecânica. Avaliado por geneticista clínica, apresentava atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, atraso de fala e craniossinostose complexa. Foi diagnosticado com hepatoblastoma aos dois anos, PRETEXT IV, histologia do subtipo Epitelial e Mesenquimal misto, com componente teratóide e metástase pulmonar; foi submetido ao tratamento

SIOPEL6, seguido de hepatectomia parcial. A mãe relatou que o paciente era seu segundo filho, tendo o primogênito falecido com 60 dias de vida, por prematuridade extrema.

HB28 e HB33, junto com HB72 (congenito) representam os outros dois casos de diagnóstico em idade mais atípica: o HB33 é o segundo da casuística com hepatoblastoma congênito (diagnóstico com um mês), e o HB28 teve diagnóstico aos 17 anos. HB33, do sexo feminino, foi diagnosticada com um tumor PRETEXT II, subtipo Epitelial Embrionário e Fetal. Recebeu tratamento SIOPEL3 seguido de hepatectomia e evoluiu satisfatoriamente. Neste momento, a paciente está com mais de dez anos, sem eventos relacionados à doença. Além do hepatoblastoma congênito, a paciente nasceu com agenesia renal. O paciente HB28 nasceu com discreta hepatomegalia, mas sem outras intercorrências; o tumor foi diagnosticado em idade avançada para este subtipo (aos 17 anos); foi classificado como PRETEXT IV, subtipo Epitelial e Mesenquimal misto e submetido ao protocolo SIOPEL4. Cinco anos após o diagnóstico, apresentou recidiva local e foi à óbito.

Outro paciente da casuística, além de HB33 e HB66, também apresentou alteração renal, tendo nascido com os dois rins, mas somente o direito era funcional (HB31); este paciente foi diagnosticado aos dois anos, subtipo Epitelial Fetal, PRETEXT III e, assim como HB33, apresentou uma evolução boa da doença, com exceção de ototoxicidade irreversível em decorrência do uso da cisplatina.

O paciente HB50 também tinha em seu histórico diagnóstico do tumor com um mês de vida (congenito), entretanto, apresentou um histórico pós-natal de complicações diversas, do qual não foi possível coletar mais detalhes, tendo ido a óbito antes do início do tratamento.

## **CAPÍTULO 2**

**Estudo de mutações somáticas em hepatoblastomas para identificação  
de genes e vias envolvidas na tumorigênese**

#### 4.2.1 Coorte de pacientes

Para identificação de variantes somáticas por sequenciamento de exoma foram estudadas amostras de 10 hepatoblastomas (DNA extraído de tecido congelado; **Tabela 7**) e seus respectivos tecidos germinativos. As variantes foram validadas por *target sequencing* e/ou *Sanger Sequencing*. Grande parte dos resultados apresentados neste capítulo estão em um manuscrito pronto para submissão.

Além dessa coorte inicial de 10 pacientes, uma coorte independente (coorte de validação) foi agregada ao estudo para avaliar a frequência dos achados provenientes da análise do exoma, assim como para análise de expressão gênica de dois alvos específicos (11 amostras de tumores de pacientes do GRAACC e uma amostra de paciente do A.C.Camargo Cancer Center; **Tabela 8**).

Um grupo adicional de hepatoblastomas foi utilizado para estudo de expressão proteica, sendo constituído por 17 casos contidos em *tissue microarray* previamente construído na instituição (CAJAIBA et al. 2006 **Tabela 9**).

Adicionalmente, durante estágio de doutorado-sanduiche no Texas Children's Hospital sob supervisão da Dra. Dolores Lopez-Terrada 16 hepatoblastomas foram avaliados quanto a aspectos pontuais derivados dos dados do exoma. Essas amostras foram selecionadas dos arquivos do Departamento de Patologia do Texas Children's Hospital (Laboratório de Oncologia Molecular), após aprovação do IRB (*Baylor College of Medicine Institutional Review Board*).

**Tabela 7 - Características clínicas dos 10 pacientes com hepatoblastoma investigados por sequenciamento de exoma.**

ID/sexo/idade ao diagnóstico	Histologia	AFP ng/ml	Estratificação de risco*	PRETEXT	Protocolo quimioterápico	Transplante	Metástase	Recidiva	Prematuro	Sobrevida global	Outras características
HB15, F 18m	Epitelial Embrionário	5668000	Intermediário	4	ND	Sim	Não	Não	Não	1 ano	.
HB16, M, 9m	Epitelial Fetal	824	Intermediário	4	SIOPEL3	Não	Não	Não	Não	>5 anos	.
HB17, F, 36m	Epitelial Fetal	>400000	Baixo	1	SIOPEL3	Não	Não	Não	Não	>5 anos	.
HB18, M, 9m	Epitelial e Mesenquimal misto	>200000	Baixo	3	SIOPEL3	Sim	Não	Não	Não	>5 anos	.
HB28, M 17a	Epitelial e Mesenquimal misto	NA	Alto	4	SIOPEL4	Não	Não	Sim	Não	4 anos	Hepatomegalia ao nascimento
HB30, M, 54m	HB/HCC features	>1000000	Alto	2	SIOPEL4	Sim	Pulmão	Sim	Não	5 anos	.
HB31, M, 30m	Epitelial Fetal	742000	Baixo	3	ND	Não	Não	Não	Não	>5 anos	Rim não funcional
HB32, F, 36m	Epitelial e Mesenquimal misto	9328000	Alto	4	SIOPEL4	Sim	Pulmão	Não	Não	>5 anos	.
HB33, F 1m	Epitelial Embrionário e Fetal	28312000	Intermediário	2	SIOPEL3	Não	Não	Não	Não	>5 anos	HB congênito e agenesia renal
HB46, M 28m	Epitelial e Mesenquimal misto	>200000	Alto	4	SIOPEL6	Não	Pulmão	Não	Sim	>2 anos	Paciente sindrômico #

**Legenda:** F: feminino; M: masculino; ND: Dados não disponíveis; AFP: alfafetoproteína.

\*De acordo com os critérios do CHIC.

#Dismorfismos faciais, craniossinostose e atraso de desenvolvimento.

**Tabela 8 - Características clínicas dos pacientes com hepatoblastoma de duas coortes adicionais (GRAAC e Texas Children`s Hospital).**

ID/sexo/ Idade diag.	Histologia	AFP ng/ml	Estratificação de risco*	PRETEXT	Protocolo quimioterápico	Transplante	Metástase	Recidiva	Prematuro	Sobrevida global	Outras características
HB34, F 19m	Epitelial Fetal	416430	Intermediário	3	SIOPEL3	Não	Não	Não	Não	>5 anos	Mãe com Hepatite C durante a gestação
HB35, M 26m	Epitelial Fetal	54800	Intermediário	3	SIOPEL3	Não	Não	Não	Não	>5 anos	.
HB36, M, 31m	Epitelial Embrionário e Fetal	76348	Baixo	3	AHEP 0731	Não	Não	Não	Sim	>3 anos	.
HB38, F 147m	Epitelial Fetal	643.4	Alto	4	SIOPEL3	Não	Não	Sim	Sim	>2 anos	Neuropatia isquêmica por prematuridade
HB39, M, 84m	Epitelial com focos macrotabecular	300000	Alto	2	SIOPEL2	Não	Não	Não	Não	6 meses	Astrocitoma (tu posterior)
HB40, M 22m	Epitelial Embrionário e Fetal	1842	Baixo	1	SIOPEL3	Não	Não	Não	Não	>5 anos	.
HB41, M 21m	Epitelial Embrionário e Fetal	201733	Alto	3	AHEP 0731	Não	Pulmão	Não	Não	>5 anos	.
HB42, M, 45m	Epitelial Fetal	1267	Baixo	1	SIOPEL2	Não	Não	Não	Não	>5 anos	.
HB43, M 20m	Epitelial Embrionário	183476	Intermediário	4	SIOPEL3	Sim	Não	Não	Não	>5 anos	.
HB44, M, 5m	Epitelial e Mesenquimal misto	300000	Intermediário	2	SIOPEL2	Não	Não	Não	Não	>5 anos	.
HB45, F, 5m	Epitelial Fetal	445611	Baixo	2	SIOPEL3	Não	Não	Não	Sim	1 ano	.
HB66, M 10m	Epitelial Embrionário e Fetal	409596	Alto	2	SIOPEL6	Não	Pulmão	Sim	Sim	1 ano	Paciente síndrômico#
TCH306, M 132m	Epitelial Embrionário e Fetal	ND	Baixo	1	ND	Não	Não	Não	ND	>5 anos	ND
TCH307, M, 84m	HB/HCC features	441500	Alto	4	ND	Não	Pulmão	Não	ND	Óbito**	ND
TCH310, M 24m	HB/HCC features	ND	Intermediário	3	ND	Não	Não	Não	ND	Óbito**	ND
TCH311, F 132m	Epitelial Fetal	2000	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCH321, M 12m	Epitelial Fetal	ND	Baixo	2	ND	Não	Não	Não	ND	>5 anos	ND
TCH323, F, 84m	Epitelial Embrionário	ND	Intermediário	3	ND	Sim	Não	Sim	ND	>5 anos	ND
TCH324, M, 60m	Epitelial Embrionário	ND	Alto	3	ND	Não	Não	Não	ND	Óbito**	ND
TCH325, F, 72m	HB/HCC features	124000	ND	ND	ND	ND	Não	ND	ND	ND	ND
TCH327, M 12m	Epitelial e Mesenquimal misto	ND	Intermediário	3	ND	Sim	Não	Não	ND	>5 anos	ND
TCH433, M 120m	Epitelial Embrionário e Fetal	>100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCH442, M 24m	HB/HCC features	>100	Alto	3	ND	Não	Não	Não	ND	Óbito**	ND
TCH444, F 12m	Epitelial Embrionário e Fetal	ND	Intermediário	3	ND	Não	Não	Não	ND	>5 anos	ND
TCH352, M 12m	Epitelial Fetal	1529	ND	ND	ND	Não	Não	Não	ND	ND	ND

**Cont. /Tabela 8**

ID/sexo/idade ao diagnóstico	Histologia	AFP ng/ml	Estratificação de risco*	PRETEXT	Protocolo quimioterápico	Transplante	Metástase	Recidiva	Prematuro	Sobrevida global	Outras características
TCH353, M, 7m	Epitelial com colangioblastos	ND	Intermediário	3	ND	Não	Não	Não	ND	>5 anos	ND
TCH360, M 24m	Epitelial e Mesenquimal misto	ND	Alto	4	ND	Não	Pulmão	Não	ND	Óbito**	ND
TCH361, M 12m	Epitelial e Mesenquimal misto	ND	Intermediário	1	ND	Sim	Não	Sim	ND	Óbito**	ND

**Legenda:** F: feminino; M: masculino; TCH: Texas Children`s Hospital; ND: Dados não disponíveis; AFP: alfafetoproteína.

\*De acordo com os critérios do CHIC. \*\*Óbito pela doença sem data determinada. #Atraso de desenvolvimento; perda de audição neurossensorial e rins em ferradura.

**Tabela 9** - Características clínicas dos pacientes com hepatoblastoma contidos em tissue microarray (HB\_TMA) (CAJAIBA et al. 2006).

ID/sexo/idade ao diagnóstico	Histologia	AFP ng/ml	Estratificação de risco*	PRETEXT	Protocolo quimioterápico	Transplante	Metástase	Recidiva	Prematuro	Sobrevida global
HB_TMA01, F 11m	Epitelial Embrionário e Fetal	ND	ND	ND	SIOPEL1	Não	ND	Não	Não	>5 anos
HB_TMA02, M 16m	Epitelial Embrionário e Fetal	ND	ND	ND	SIOPEL1	Não	ND	ND	Não	>5 anos
HB_TMA03, M, 52m	Epitelial Fetal	ND	ND	ND	SIOPEL2	Não	ND	ND	Não	>5 anos
HB_TMA04, M, 30m	Epitelial Fetal	ND	Baixo	1	SIOPEL2	Não	Não	ND	Não	6 anos
HB_TMA05, M 18m	Epitelial e Mesenquimal misto	ND	Intermediário	2	SIOPEL2	Não	Não	Não	Não	2 meses
HB_TMA06, F, 39m	Epitelial Embrionário	ND	ND	ND	ND	Não	ND	ND	Não	ND
HB_TMA07, M, 7m	Epitelial e Mesenquimal misto	ND	ND	ND	SIOPEL2	Não	Não	Não	Não	>5 anos
HB_TMA08, F, 81m	Epitelial Embrionário e Fetal	ND	ND	ND	SIOPEL2	Não	Não	Sim	Não	1 ano
HB_TMA09, M 24m	Epitelial Embrionário e Fetal	ND	ND	ND	ND	Não	Não	Não	Não	>5 anos
HB_TMA10, M, 9m	Epitelial e Mesenquimal misto	ND	ND	ND	SIOPEL2	NA	ND	ND	Não	>5 anos
HB_TMA11, F 12m	Epitelial Embrionário e Fetal	ND	ND	ND	SIOPEL2	Não	Não	Não	Não	>5 anos
HB_TMA12, M, 42m	Epitelial e Mesenquimal misto	ND	Alto	4	SIOPEL3	Não	Pulmão	Não	Não	>5 anos
HB_TMA13, F, 85m	Epitelial Embrionário e Fetal	24220	Alto	2	SIOPEL3	Não	Não	Não	Não	>5 anos
HB_TMA14, M 24m	Epitelial e Mesenquimal misto	ND	Baixo	2	COG	Não	Não	Não	Não	>5 anos
HB_TMA15, M 23m	Epitelial Embrionário e Fetal	ND	Intermediário	2	SIOPEL3	Não	Não	Não	Não	>5 anos
HB_TMA16, F, 32m	Epitelial Fetal	ND	Baixo	2	ND	Não	Não	Não	Não	>2 anos
HB_TMA18, F, 32m	Epitelial Embrionário e Fetal	ND	Alto	4	SIOPEL3	Sim	Não	Não	Não	>5 anos

**Legenda:**F: feminino; M: masculino; TCND: Dados não disponíveis; AFP: alfafetoproteína.

\*De acordo com os critérios do CHIC.

#### 4.2.2 Identificação de mutações somáticas não-sinônimas em regiões codificadoras do genoma por sequenciamento de exoma

A abordagem de análise dos exomas foi baseada na identificação de variantes somáticas utilizando os arquivos VCF, comparando o exoma tumoral com o exoma germinativo de cada paciente. Portanto, foram selecionadas variantes ausentes dos exomas germinativos (bordas pareadas ou sangue periférico) considerando apenas regiões que estivessem igualmente sequenciadas nas duas amostras comparadas, aplicando também os critérios a seguir: cobertura vertical mínima da posição de 10x, mínimo de 10% da base variante no total de *reads* e Phred score >17. Considerando que mutações reconhecidamente somáticas e patogênicas podem também estar depositadas em bancos de dados de frequência populacional, como por exemplo duas mutações patogênicas já descritas de *CTNNB1* (rs28931589 e rs121913412), o critério exclusão de variantes presentes em bancos de dados germinativos não foi utilizado; mantivemos na filtragem inicial todas as variantes com frequência em bancos de dados populacionais inferior a 0,001%.

Após anotação das variantes utilizando bancos de dados públicos (para lista completa, vide seção Metodologia), foram filtradas apenas variantes classificadas como de perda de função (*loss of function* – LoF: mudança de quadro de leitura, *frameshift*; introdução de códon de parada prematuro, *nonsense* ou *stop codon*; processamento de RNA primário, *splicing*) e de substituição de nucleotídeo único (*single-nucleotide variant* – SNV) com troca de aminoácido (variantes *missense*), estas últimas que tenham sido avaliadas como provavelmente patogênicas ou danosas à função proteica por no mínimo um dos algoritmos utilizados. As mutações somáticas selecionadas de acordo com os critérios acima foram inspecionadas visualmente utilizando os arquivos BAM, pelo software VarSeq ou no IGV versão 2.3 (Integrative Genomics Viewer, Broad Institute <http://www.broadinstitute.org/igv/>), visando exclusão de possíveis artefatos de sequenciamento e variantes germinativas inadequadamente retidas na análise.

Os genes do conjunto final de mutações somáticas identificadas neste grupo de 10 hepatoblastomas foram selecionados para elaboração de um painel para validação dos achados. Abaixo estão os dados dessa análise, descrevendo as

mutações detectadas que foram validadas por sequenciamento de painel de genes e/ou sequenciamento Sanger.

Um total de 94 mutações somáticas não-sinônimas foram identificadas (92 variantes diferentes), mapeadas em 87 genes diferentes, descritas na **Tabela 10; todas em heterozigose**. Essa tabela descreve as coordenadas genômicas (de acordo com a GRCh37/hg19 *Human Assembly*) e dados das variantes como tipo de mutação, efeito sobre a proteína, predição de patogenicidade e frequência populacional. Dois hepatoblastomas não apresentaram mutações somáticas não-sinônimas detectáveis (HB17 e HB28); o caso congênito (HB33) apresentou o maior número de alterações, correspondendo a 40% de todas as mutações identificadas no grupo. Assim, o número médio de mutações somáticas não-sinônimas por amostra foi de 9,4; no entanto, excluindo o hepatoblastoma congênito com dados atípicos (HB33), o número médio de variantes somáticas não-sinônimas por tumor foi de 6,2.

Quatro das mutações detectadas estavam depositadas no COSMIC, três delas mapeadas no gene *CTNNB1* (c.101G>A: COSM5671; c.101G>T: COSM5670; c.121A>G: COSM5664) e uma em *GMPS* (c.1367G>T: COSM1040323). A mesma mutação missense no gene *CX3CLI* (c.704C>G; A235G) foi identificada em dois tumores (HB32 e HB33). Para o gene *CEP164*, foram encontradas mutações diferentes em dois tumores.

As variantes em vermelho na **Tabela 10** foram aquelas consideradas com maior evidência de estarem efetivamente contribuindo para direcionar a tumorigênese, com base nos dados disponíveis: seis variantes LoF (cinco *nonsense* e uma alteração *frameshift*; entretanto, cinco delas foram identificadas no mesmo tumor congênito) e seis variantes missense (variantes recorrentes ou genes recorrentes em diferentes tumores). Uma coorte de validação de 12 hepatoblastomas foi investigada para o conjunto completo de variantes somáticas utilizando *target sequencing* (painel de genes); apenas mutações em *CTNNB1* foram detectadas.

**Tabela 10** - Descrição de mutações somáticas não-sinônimas em heterozigose identificadas em hepatoblastomas em exoma, ordenadas por amostra tumoral.

ID	Gene	Chr: posição genômica	VF (%)	RefSeq	Tipo de variante	AA Change	Protein change	Patogenicidade*	1K	EXAC	gnomAD
HB15	<i>ACTR1A</i>	10:104240661	21	NM_005736	missense	c.1090G>A	p.Glu364Lys	5/5	.	.	.
HB15	<i>CACNA1A</i>	19:13428054	31	NM_023035	missense	c.1430C>T	p.Arg476His	4/5	2.00E-04	2.48E-05	3.23E-05
HB15	<i>CDH5</i>	16:66434875	19	NM_001795	missense	c.1793T>C	p.Ile598Thr	3/5	.	.	.
<b>HB15</b>	<b><i>CEP164</i></b>	<b>11:117258055</b>	<b>14</b>	<b>NM_014956</b>	<b>missense</b>	<b>c.1861C&gt;A</b>	<b>p.Leu621Met</b>	<b>2/5</b>	<b>4.00E-04</b>	<b>8.24E-06</b>	.
HB15	<i>CEP290</i>	12:88486540	17	NM_025114	missense	c.3379A>T	p.Ser1127Cys	4/5	.	.	.
HB15	<i>CTTNBP2</i>	7:117368247	25	NM_033427	missense	c.3951G>T	p.Gln1317His	4/5	.	.	.
HB15	<i>DARS2</i>	1:173802634	25	NM_018122	missense	c.613C>A	p.His205Asn	3/5	.	.	.
HB15	<i>FAM120A</i>	9:96214549	10	NM_014612	missense	c.352A>G	p.Thr118Ala	4/5	.	.	.
HB15	<i>GIGYF2</i>	2:233671359	16	NM_001103147	missense	c.1861C>A	p.Pro621Thr	3/5	.	.	.
HB15	<i>KRT14</i>	17:39738769	12	NM_000526	missense	c.1337G>A	p.Arg446His	3/5	4.00E-04	1.70E-05	3.23E-05
HB15	<i>LMBRD1</i>	6:70459238	20	NM_018368	missense	c.468A>T	p.Leu156Phe	2/5	.	.	.
HB15	<i>NAV2</i>	11:19970454	13	NM_001244963	missense	c.2542G>T	p.Ala848Ser	3/5	.	.	.
HB15	<i>NID1</i>	1:236156989	29	NM_002508	missense	c.2711G>C	p.Arg904Pro	1/5	.	.	.
HB15	<i>PRMT7</i>	16:68373761	22	NM_019023	missense	c.817G>T	p.Gly273Cys	3/5	.	.	.
HB15	<i>SPTB</i>	14:65263390	17	NM_001024858	missense	c.1226C>G	p.Ala409Gly	3/5	.	.	.
HB15	<i>TGFBR2</i>	3:30713264	16	NM_001024847	missense	c.664C>A	p.Leu222Met	2/5	.	.	.
HB15	<i>THSD7A</i>	7:11676182	24	NM_015204	missense	c.597A>C	p.Glu199Asp	2/5	.	.	.
<b>HB16</b>	<b><i>CTNNB1</i></b>	<b>3:41266104</b>	<b>21</b>	<b>NM_001098210</b>	<b>missense</b>	<b>c.101G&gt;A</b>	<b>p.Gly34Glu</b>	<b>3/5</b>	<b>2.00E-04</b>	<b>8.27E-06</b>	<b>3.97E-06</b>
<b>HB18</b>	<b><i>CTNNB1</i></b>	<b>3:41266124 (rs121913412)</b>	<b>43</b>	<b>NM_001904</b>	<b>missense</b>	<b>c.121A&gt;G</b>	<b>p.Thr41Ala</b>	<b>3/5</b>	.	.	.
HB18	<i>SCN5A</i>	3:38648234	46	NM_021095	missense	c.1561C>T	p.Asp356Tyr	5/5	.	.	7.93E-06
HB30	<i>AGPS</i>	2:178370276	11	NM_003659	missense	c.1518G>T	p.Leu506Phe	3/5	.	.	.
HB30	<i>BCL3</i>	19:45252063	21	NM_005178	missense	c.16G>T	p.Ala6Ser	2/5	.	.	.
HB30	<i>CELSR1</i>	22:46807563	15	NM_014246	missense	c.4705C>A	p.Arg1569Ser	3/5	.	.	.
HB30	<i>GAS6</i>	13:114537637	23	NM_000820	missense	c.721G>A	p.Glu241Lys,	5/5	1.40E-03	1.66E-05	3.23E-05
HB30	<i>HMCN1</i>	1:186136000	16	NM_031935	missense	c.15500C>A	p.Thr5167Lys,	5/5	.	.	.
HB30	<i>JPH2</i>	20:42788258	14	NM_020433	missense	c.1169G>T	p.Arg390Met	4/5	.	.	.
HB30	<i>LNX2</i>	13:28124543	13	NM_153371	missense	c.1864A>G	p.Asn622Asp	2/5	.	.	.
HB30	<i>MAP2</i>	2:210558129	13	NM_002374	missense	c.1235A>G	p.Lys412Arg	2/5	.	.	.
HB30	<i>MFSD2A</i>	1:40433486	15	NM_001136493	missense	c.1145C>A	p.Pro382Gln	4/5	.	.	.
HB30	<i>PIK3C3</i>	18:39584483	23	NM_002647	missense	c.1148G>A	p.Arg383Gln	3/5	.	.	.
HB30	<i>PIK3R1</i>	5:67590383	13	NM_181523	missense	c.1445C>A	p.Thr482Lys	5/5	.	.	.
HB30	<i>PTPRO</i>	12:15702079	11	NM_030667	missense	c.2356G>T	p.Ala786Ser	2/5	.	.	.

Cont. /Tabela 10

ID	Gene	Chr: posição genômica	VF (%)	RefSeq	Tipo de variante	AA Change	Protein change	Patogenicidade*	1K	EXAC	gnomAD
HB30	<i>TSC2</i>	16:2108795	17	NM_000548	missense	c.896T>G	p.Val299Gly	5/5	.	.	.
HB30	<i>UNC80</i>	2:210835589	19	NM_032504	missense	c.7966G>T	p.Asp2656Tyr	4/5	.	.	.
HB30	<i>VPS13B</i>	8:100568733	13	NM_017890	missense	c.4876C>A	p.Gln1626Lys	5/5	.	.	.
<b>HB31</b>	<b><i>ACACA</i></b>	<b>17:35581924</b>	<b>24</b>	<b>NM_198834</b>	<b>stop codon</b>	<b>c.3463G&gt;T</b>	<b>p.Glu1155*</b>	.	.	.	.
HB31	<i>ATP2A2</i>	12:110760804	30	NM_170665	missense	c.471C>A	p.Asp157Glu	4/5	.	.	.
HB31	<i>CBL</i>	11:119146723	12	NM_005188	missense	c.886A>G	p.Ser296Gly	5/5	.	.	.
<b>HB31</b>	<b><i>CEP164</i></b>	<b>11:117267312</b>	<b>17</b>	<b>NM_014956</b>	<b>missense</b>	<b>c.3263A&gt;G</b>	<b>p.Asp1088Gly</b>	<b>2/5</b>	.	.	.
HB31	<i>DNAH11</i>	7:21824078	17	NM_001277115	missense	c.9517C>G	p.Gln3173Glu	3/5	.	.	.
HB31	<i>EP300</i>	22:41537206	16	NM_001429	missense	c.2033C>A	p.Pro678Gln	3/5	.	.	.
HB31	<i>EYAA</i>	6:133767866	20	NM_004100	missense	c.182C>G	p.Thr61Arg	5/5	.	.	.
HB31	<i>GMPS</i>	3:155640024	18	NM_003875	missense	c.1367G>T	p.Cys456Phe	2/5	.	.	.
HB31	<i>IRX2</i>	5:2749564	24	NM_033267	missense	c.587C>A	p.Ala196Asp	2/5	.	.	.
HB31	<i>ITSN2</i>	2:24521596	17	NM_006277	missense	c.1432C>A	p.Gln478Lys	4/5	.	.	.
HB31	<i>MFI2</i>	3:196754779	27	NM_005929	missense	c.52C>G	p.Leu18Val	1/5	.	.	.
HB31	<i>PKHD1</i>	6:51798911	17	NM_138694	missense	c.6118C>A	p.His2040Asn	5/5	2.00E-04	.	4.06E-06
HB31	<i>TALDO1</i>	11:747563	14	NM_006755	missense	c.82A>C	p.Thr28Pro	5/5	.	.	.
<b>HB32</b>	<b><i>CX3CLI</i></b>	<b>16:57416454</b>	<b>11</b>	<b>NM_002996</b>	<b>missense</b>	<b>c.704C&gt;G</b>	<b>p.Ala235Gly</b>	<b>2/5</b>	.	.	.
HB33	<i>A2ML1</i>	12:9013753	23	NM_144670	missense	c.3362T>A	p.Leu1121Gln	3/5	.	.	.
HB33	<i>AHRR</i>	5:428016	43	NM_001242412	missense	c.869G>C	p.Cys290Ser	3/5	.	.	.
HB33	<i>AMBN</i>	4:71471945	50	NM_016519	missense	c.842G>T	p.Gly281Val	3/5	.	.	3.98E-06
HB33	<i>AP3B2</i>	15:83358196	42	NM_004644	missense	c.123G>T	p.Asp41Glu	3/5	.	.	1.19E-05
<b>HB33</b>	<b><i>ARVCF</i></b>	<b>22:19960467</b>	<b>35</b>	<b>NM_001670</b>	<b>stop codon</b>	<b>c.2531C&gt;T</b>	<b>p.Trp844*</b>	<b>1/5</b>	.	.	.
HB33	<i>CDC42BPB</i>	14:103410303	28	NM_006035	missense	c.4333G>A	p.Gly1445Arg	4/5	.	.	.
HB33	<i>CDC42BPB</i>	14:103410304	29	NM_006035	missense	c.4332G>T	p.Met1444Ile	2/5	.	.	.
HB33	<i>CELA1</i>	12:51737568	25	NM_001971	missense	c.169A>T	p.Trp57Arg	4/5	.	.	.
HB33	<i>CFTR</i>	7:117304907	37	NM_000492	missense	c.4129G>T	p.Asp1377Tyr	5/5	.	.	.
<b>HB33</b>	<b><i>CTNNB1</i></b>	<b>3:41266104 (rs28931589)</b>	<b>58</b>	<b>NM_001098210</b>	<b>missense</b>	<b>c.101G&gt;T</b>	<b>p.Gly34Val</b>	<b>3/5</b>	.	.	.
HB33	<i>CTRB1</i>	16:75256702	24	NM_001906	missense	c.89G>C	p.Gly30Ala	2/5	.	.	.
<b>HB33</b>	<b><i>CX3CLI</i></b>	<b>16:57416454</b>	<b>40</b>	<b>NM_002996</b>	<b>missense</b>	<b>c.704C&gt;G</b>	<b>p.Ala235Gly</b>	<b>2/5</b>	.	.	.
HB33	<i>DBF4B</i>	17:42807304	58	NM_145663	missense	c.257G>T	p.Ser86Ile	3/5	.	.	.
<b>HB33</b>	<b><i>DEPDC5</i></b>	<b>22:32215040</b>	<b>40</b>	<b>NM_001242896</b>	<b>stop codon</b>	<b>c.1699C&gt;T</b>	<b>p.Arg567*</b>	<b>1/5</b>	.	.	.
HB33	<i>EGFR</i>	7:55270270	15	NM_005228	missense	c.3223G>T	p.Gly1022Cys	3/5	.	.	.
HB33	<i>ERBB4</i>	2:212566704	21	NM_001042599	missense	c.1477C>T	p.Ala493Thr	2/5	.	.	.
HB33	<i>ERBB4</i>	2:212652854	21	NM_005235	missense	c.452A>T	p.Gln151Leu	3/5	.	.	.

Cont. /Tabela 10

ID	Gene	Chr: posição genômica	VF (%)	RefSeq	Tipo de variante	AA Change	Protein change	Patogenicidade*	1K	EXAC	gnomAD
HB33	<i>FABP1</i>	2:88427520	26	NM_001443	missense	c.177T>A	p.Lys6Met	4/5	.	.	.
HB33	<i>FANCB</i>	X:14882895	14	NM_152633	missense	c.738G>T	p.Glu246Asp	3/5	.	.	.
HB33	<i>FCER1G</i>	1:161187850	16	NM_004106	missense	c.602C>T	p.Leu42Phe	3/5	.	.	.
HB33	<i>FRMPD4</i>	X:12734213	22	NM_014728	missense	c.1635C>A	p.Asn545Lys	1/5	8.00E-04	1.24E-05	1.08E-05
HB33	<i>GNAO1</i>	16:56388805	46	NM_020988	missense	c.905C>A	p.Ala302Asp	4/5	.	.	.
<b>HB33</b>	<b><i>KIAA0319L</i></b>	<b>1:35900602</b>	<b>29</b>	<b>NM_024874</b>	<b>frameshift</b>	<b>c.3042*-&gt;T</b>	<b>p.Phe1014X</b>	<b>5/5</b>	.	.	.
HB33	<i>MRVII</i>	11:10648030	48	NM_001100163	missense	c.578A>G	p.Glu193Gly	4/5	.	.	.
HB33	<i>MXRA5</i>	X:3238150	29	NM_015419	missense	c.5576G>T	p.Ser1859Tyr	2/5	.	.	.
HB33	<i>MYF5</i>	12:81110919	32	NM_005593	missense	c.77G>T	p.Gly26Val	3/5	.	.	.
<b>HB33</b>	<b><i>MYH7</i></b>	<b>14:23893250</b>	<b>17</b>	<b>NM_000257</b>	<b>stop codon</b>	<b>c.2788G&gt;T</b>	<b>p.Glu930*</b>	<b>3/5</b>	.	.	.
HB33	<i>NAA30</i>	14:57857836	16	NM_001011713	missense	c.161G>A	p.Arg54Lys	2/5	.	.	.
<b>HB33</b>	<b><i>NOL6</i></b>	<b>9:33466636</b>	<b>17</b>	<b>NM_022917</b>	<b>stop codon</b>	<b>c.2022C&gt;T</b>	<b>p.Trp674*</b>	<b>1/5</b>	.	.	.
HB33	<i>OR11H6</i>	14:20692245	10	NM_001004480	missense	c.377G>T	p.Gly126Val	3/5	.	.	.
HB33	<i>PDE10A</i>	6:165957009	31	NM_001130690	missense	c.115G>C	p.Val39Leu	2/5	.	.	.
HB33	<i>PLXNC1</i>	12:94649010	34	NM_005761	missense	c.3025A>T	p.Ser56Cys	4/5	.	.	.
HB33	<i>RGAG1</i>	X:109694753	45	NM_020769	missense	c.908A>T	p.Asp303Val	3/5	.	.	.
HB33	<i>SDK1</i>	7:4185507	26	NM_152744	missense	c.-158G>A	p.Gly1461Glu	4/5	.	.	.
HB33	<i>SLC44A1</i>	9:108145590	43	NM_080546	missense	c.1819T>A	p.Tyr607Asn	3/5	.	.	.
HB33	<i>TANC2</i>	17:61176571	35	NM_025185	missense	c.175C>T	p.Pro59Ser	2/5	.	.	.
HB33	<i>TECTA</i>	11:121058633	37	NM_005422	missense	c.6092G>A	p.Gly2031Glu	4/5	.	.	.
HB33	<i>XDH</i>	2:31637522	11	NM_000379	missense	c.11A>G	p.Asp4Gly	3/5	.	.	.
HB46	<i>CD34</i>	1:208073342	14	NM_001025109	missense	c.86G>T	p.Gly29Val	2/5	.	.	.
HB46	<i>CD69</i>	12:9907689	18	NM_001781	missense	c.356C>A	p.Thr119Asn	4/5	.	.	.
<b>HB46</b>	<b><i>CTNNB1</i></b>	<b>3:41266104 (rs28931589)</b>	<b>52</b>	<b>NM_001904</b>	<b>missense</b>	<b>c.101G&gt;A</b>	<b>p.Gly34Glu</b>	<b>4/5</b>	.	<b>8.24E-06</b>	.
HB46	<i>FLCN</i>	17:17120418	28	NM_144997	missense	c.1141G>A	p.Val381Met	2/5	.	.	.
HB46	<i>FRMPD1</i>	9:37735649	15	NM_014907	missense	c.1319A>T	p.Glu440Val	3/5	.	.	.
HB46	<i>SLC4A8</i>	12:51847328	14	NM_001039960	missense	c.419T>G	p.Leu140Arg	4/5	.	.	.
HB46	<i>TCF25</i>	16:89967117	27	NM_014972	missense	c.1296G>C	p.Gln432His	3/5	.	.	.

**Legenda:** ID: identificação da amostra; VF: frequência do alelo; RD: *Read Depth*; AA: aminoácido; 1K: *Database 1000 Genomes*. Variantes em vermelho: consideradas como provavelmente mais deletérias à função proteica. \* O score de patogenicidade indica o número de algoritmos nos quais uma determinada variante *missense* foi avaliada como deletéria à função da proteína (*Polyphen2, SIFT, Mutation Taster, Mutation Assessor Pred, FATHMM Pred*).

Esses achados revelam baixa frequência de mutações somáticas, resultado similar ao encontrado por outros grupos (FUJITA et al. 2014; JIA et al. 2014; KOSAKI et al. 2014), corroborando a hipótese de que tumores embrionários não requerem tanto acúmulo de mutações quanto outros tipos tumorais. A explicação proposta para o menor número de mutações baseia-se tanto no fato de que tumores pediátricos teriam origem a partir de células precursoras com características ainda pluripotentes, desenvolvendo-se em curto período de tempo (TOMASETTI et al. 2013), quanto na hipótese de que tais tumores provavelmente requerem um número menor de mutações que os tumores sólidos adultos porque tais mutações seriam mais penetrantes.

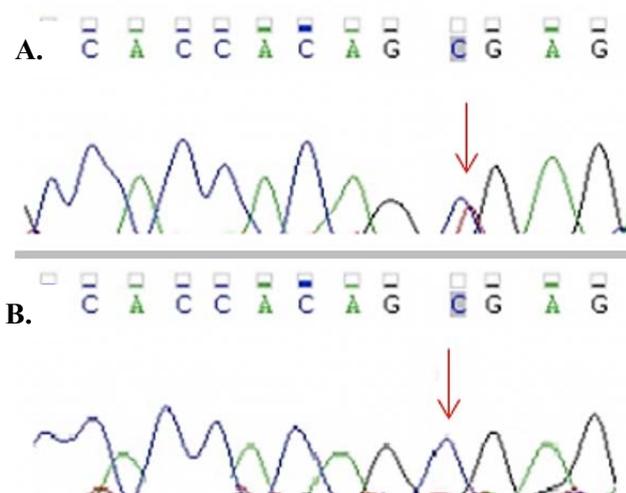
A amostra HB33 apresentou dados discrepantes desse cenário: um número relativo elevado de variantes somáticas em comparação ao grupo de hepatoblastomas. É importante mencionar que esta amostra tem apresentação clínica diferente da maioria dos tumores estudados por se tratar de um hepatoblastoma congênito. O sequenciamento de exoma do DNA extraído de leucócitos do sangue foi realizado e os resultados estão apresentados no **Capítulo 3**.

Para avaliar se existia uma relação direta ou indireta dos genes afetados com o fenótipo de hepatoblastoma, utilizamos uma ferramenta chamada *VarElect* (<http://varelect.genecards.org/about>). Este programa é utilizado para priorização dos genes identificados de acordo com a doença/fenótipo indicados. A análise é baseada em bancos de dados como *Lifemap*, *GeneCards*, *Malacards* e *PathCards*. A partir de uma lista de genes fornecida e de fenótipo(s) indicado(s), é produzida uma tabela completa com dados de cada gene, contendo um *score* associado que indica a força da relação (direta ou indireta) daquele gene com o(s) fenótipo(s). Assim, da lista de 87 genes com mutações somáticas, nove deles (*CTNNB1*; *CD34*; *DEPDC5*; *TGFBR2*; *CFTR*; *EP300*; *XDH*; *ACACA*; *FABP1*) foram associados ao fenótipo (hepatoblastoma). Além desta análise, foi feita uma comparação com os trabalhos de sequenciamento de exoma de hepatoblastomas e também avaliação dos genes com mutações do tipo LoF.

O gene *CTNNB1* codifica a proteína  $\beta$ -catenina e já tem seu papel reconhecido em hepatoblastomas e em outros tipos tumorais. As variantes

encontradas neste gene na nossa casuística foram validadas e os resultados serão discutidos no **item 2** deste capítulo.

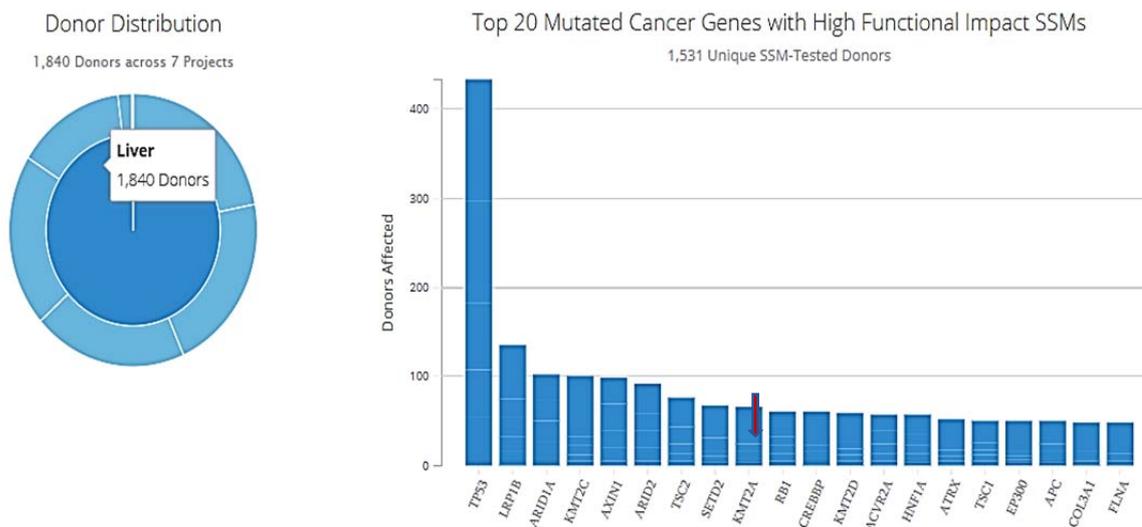
Na alteração identificada no gene *DEPDC5* (chr22:32215040) do tumor HB33, ocorre a troca de um G por T no aminoácido 1275 gerando um *stop códon* prematuro. A variante é considerada patogênica pelo *Mutation Taster* e não está descrita em nenhum dos bancos de dados de frequência populacional, assim como está ausente do COSMIC. Um estudo de 2011 (MIKI et al) realizou análise baseada em *GWAS*, identificando SNPs no gene *DEPDC5* como um fator de risco para desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em indivíduos portadores de hepatite C crônica. *DEPDC5* codifica uma proteína que faz parte do complexo *GATOR1*. Bar-Peled et al. (2013) identificaram o complexo de GATOR como um regulador da via que sinaliza a disponibilidade de aminoácidos para *mTORC1*. A *mTOR* (do inglês *mammalian target of rapamycin*) é uma via ativada por receptores serina e treonina quinase de alta importância na fisiologia celular, regulando proliferação, motilidade, sobrevivência celular, síntese protéica, autofagia e transcrição. A inibição das subunidades de GATOR1 (*DEPDC5*, *NPRL2* e *NPRL3*) torna a sinalização *mTORC1* resistente à privação de aminoácidos. Essa variante foi validada por *target sequencing* e sequenciamento Sanger (**Figura 17**).



**Figura 17** - Validação da mutação somática c.1699C>T do gene *DEPDC5* no tumor HB33 pela técnica de sequenciamento Sanger. Em **A.** está representado a mutação em heterozigose na amostra tumoral HB33 e em **B.** tecido hepático não tumoral do mesmo paciente, no qual a mutação não está presente, evidenciando que se trata de uma variante somática.

Variantes *nonsense* foram identificadas nos genes *ARVCF*, *NOL6*, *MYH7* e *KIAA0319L*, assim como no gene *DEPDC5*; entretanto, todas foram encontradas na amostra HB33, reforçando a heterogeneidade e complexidade deste tumor. Nenhum destes genes possui relação conhecida com hepatoblastoma ou com mecanismos que envolvam o fígado.

Foram analisados os dados disponíveis no *ICGC Data Portal - International Cancer Genome Consortium* (<https://dcc.icgc.org>) e no *cBioPortal for Cancer Genomics* (<http://www.cbioportal.org/>) para compararmos as variantes encontradas em nosso estudo com os dados de carcinoma hepatocelular (HCC) depositados nestes dois bancos – não existem hepatoblastomas nestes bancos. As **Figuras 18 e 19** ilustram as principais análises feitas nestes portais.



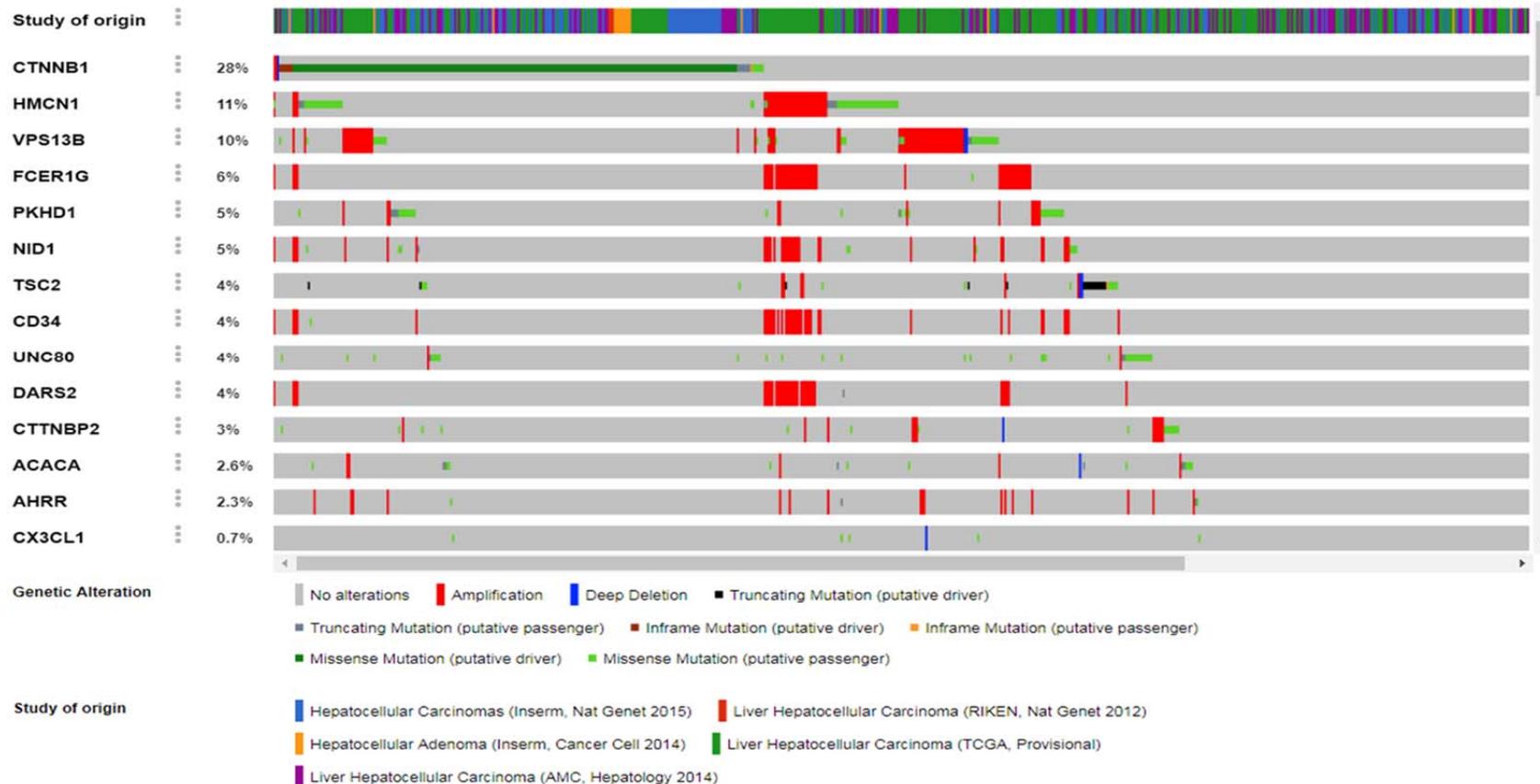
**Fonte:** Imagem extraída do ICGC, nos estudos para câncer de fígado. (<http://dcc.icgc.org/projects?filters=%7B%22project%22:%7B%22primarySite%22:%7B%22is%22:%5B%22Liver%22%7D%7D%7D>)

**Figura 18** - Análise no ICGC. Imagem ilustrando os 20 genes mais comumente mutados com mutações não-sinônimas de alto impacto funcional em carcinoma hepatocelular.

Somente o gene *TSC2* foi identificado como mutado em uma das amostras do nosso estudo (HB30). Este gene é um supressor tumoral, atuando em várias vias e capaz de estimular GTPases específicas (RefSeq, Jul 2008).

Para as análises no cBioPortal, é possível analisar todos os genes do seu interesse. Assim como no ICGC, não existem dados de hepatoblastoma, somente carcinoma hepatocelular. O gene mais comumente detectado nos cinco trabalhos de carcinoma hepatocelular analisados é o *CTNNB1* (TCGA - *The Cancer Genome Atlas - Cancer Genome 2017*; FUJIMOTO et al. 2012; PILATI et al. 2014; AHN et al. 2014; SCHULZE et al. 2015) (**Figura 19**).

Altered in 653 (73%) of 895 sequenced cases/patients (895 total)



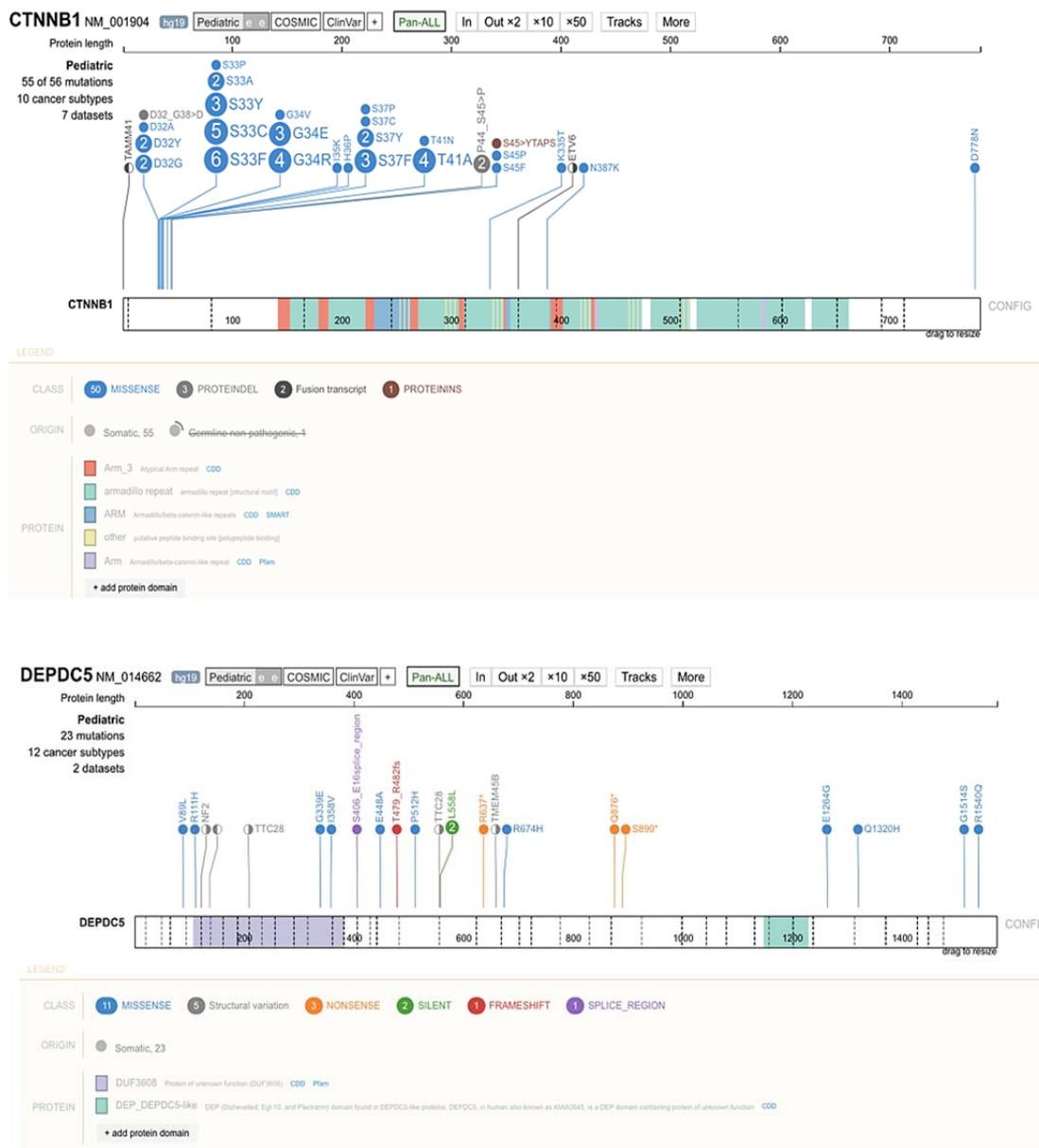
**Figura 19** - Análise no cBioPortal. Frequência de alterações nos genes mutados de nosso estudo em amostras de carcinoma hepatocelular. Os genes estão listados por ordem de frequência de alterações e para cada tipo de variante foi atribuída uma cor (indicado na legenda “Genetic Alteration”).

A análise no cBioPortal revelou que dentre os genes que identificamos, *CTNNB1* é o gene com o maior número de alterações em hepatocelular carcinoma, como já amplamente reconhecido. Além de *CTNNB1*, verificamos que 13 dentre os 87 genes com mutação somática nos hepatoblastomas de nosso estudo apresentavam mutações em parte das amostras de carcinomas hepatocelulares (653 das 895 amostras), em frequências variáveis, incluindo também os genes *TSC2* e *CX3CLI*.

Um dado que deve ser ressaltado é que em um dos tumores estudados, HB30, classificado com histologia do tipo HB/HCC *features*, foram identificadas 17 mutações em genes diferentes. Quatro destes genes também apresentam mutações no carcinoma hepatocelular (*HMCN1*, *TSC2*, *UNC80*, *VPS13B*), corroborando a avaliação da morfologia e histologia do tumor, uma vez que a carga mutacional também se assemelha aos tumores hepáticos com células mais diferenciadas. Excluindo as mutações deste tumor e de HB33, a média de mutações/tumor dos hepatoblastomas remanescentes cai para 4,6.

A mesma análise qualitativa foi realizada no banco de dados de tumores pediátricos PECAN (*St. Jude Children's Research Hospital - Pediatric Cancer Genomic Data Portal*). O portal reúne os principais trabalhos genômicos em tumores infantis (ZHOU et al. 2016) e até novembro de 2018 contava com 4469 amostras provenientes de 4314 pacientes, distribuídos em 17 tipos diferentes de tumores; no entanto, dados de hepatoblastoma ainda não estavam disponíveis. Estão depositados dados de sequenciamento de exoma, *target sequencing* e análises de expressão gênica por RNAseq. Os genes mais comumente mutados no grupo de tumores pediátricos em geral são *TP53*, *NOTCH1*, *NRAS* e *CDKN2A*. Avaliando os 87 genes mutados de nosso estudo, todos apareceram alterados como variantes germinativas ou somáticas em pelo menos um dos casos disponíveis no PECAN. Como esperado, o gene em comum que possui o maior número de mutações foi *CTNNB1*: foram identificadas 56 variantes em mais de 10 tipos de tumores, sendo os mais frequentes: meduloblastoma (38 variantes), seguido de tumor de Wilms (9 variantes). Com exceção das deleções (vide item 2 deste capítulo), com exceção da INDEL identificada no HB40, todas as variantes aqui identificadas no gene *CTNNB1* nas amostras de hepatoblastoma

estão descritas no PECAN, sendo a mais frequente T41A. O segundo gene com mais alterações foi *DEPDC5*, no qual foram identificadas 23 variantes em 12 tipos diferentes de tumor, sendo os mais frequentes neuroblastoma, sarcoma de Ewing e leucemias; a mutação LoF no HB33 (p. Arg567\*) não estava descrita nos casos mutados do portal. A **Figura 20** representa os dados para estes dois genes.



Fonte: Imagem extraída do portal PECAN ([pecan.stjude.cloud/proteinpaint/](http://pecan.stjude.cloud/proteinpaint/)).

**Figura 20** - Genes com mutações somáticas nos hepatoblastomas aqui estudados e mutados com maior frequência nos tumores pediátricos do PECAN. As imagens representam os genes *CTNNB1* e *DEPDC5*; para cada tipo de mutação foi associada uma cor, descrita no quadro em amarelo, abaixo da representação de cada gene. Do lado esquerdo, logo abaixo o nome do gene, é possível identificar o total de mutações e em quantos tipos de tumores elas foram encontradas.

Mutações estavam descritas também para os genes *ERBB4* e *EGFR* (16 e 14 mutações, respectivamente), mais comumente em leucemias e osteossarcomas. Além de *CTNNB1* e *DEPDC5*, os outros genes mutados em hepatoblastomas com variantes *nonsense* ou preditas como patogênicas em 5 algoritmos foram avaliados, assim como os genes com mutações recorrentes *CEP164* e *CX3CL1*; as mutações identificadas não eram correspondentes com aquelas encontradas nos hepatoblastomas. Os dados referentes ao *CX3CL1* serão apresentados no item 3 deste capítulo.

Para entender as vias biológicas nas quais os genes identificados estariam envolvidos e seu papel biológico foram feitas análises usando o KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* <http://www.genome.jp/kegg>), *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org/>; *PANTHER Over representation Test, Homo sapiens - REFLIST 21042*). Os resultados do KEGG revelaram um enriquecimento para vários processos de desenvolvimento; KO05200: *Pathways in cancer*; KO04520: *Adherens junction*; KO01100: *Metabolic pathways* e KO04060: *Cytokine-receptor interaction*. A **Tabela 11** apresenta a descrição das principais vias e processos biológicos enriquecidos na lista de genes mutados, obtido pelo *Gene Ontology*.

**Tabela 11** - Análise *Gene Ontology*

GO ID	Descrição de vias e processos biológicos	p-value
GO.0022008	Neurogênese	0,0020
GO.0032879	Regulação de desenvolvimento	0,0021
GO.0009653	Morfogênese anatômica	0,0072
GO.0032502	Processos de desenvolvimento	0,0072
GO.0032501	Processos multicelulares	0,0072
GO.0032006	Regulação da sinalização de mTOR	0,0108
GO.0030154	Diferenciação celular	0,0155
GO.0043066	Regulação negativa dos processos apoptóticos	0,0166
GO.0032680	Regulação do fator de necrose tumoral	0,0275
GO.0007155	Adesão celular	0,0383
GO.0001822	Desenvolvimento renal	0,0423

O objetivo desta análise é compreender em quais vias de processos biológico ou componentes celulares os genes identificados neste estudo estão envolvidos. A tabela foi filtrada do menor para o maior valor de p, que foi calculado baseado em quantos genes daquela via ou processos foram identificados mutados nas nossas amostras e qual a relação entre o funcionamento das proteínas que eles produzem.

Curiosamente, a via de desenvolvimento renal apareceu alterada. Foram relacionados cinco genes (*CEP290*, *CTNNB1*, *IRX2*, *PKHDI*, *PTPRO*) mutados com este processo. Como relatado no Capítulo 1, HB31 e HB33 são pacientes portadores de anomalias renais congênitas. Alterações no gene *CTNNB1* foram identificadas em ambas as amostras (HB31= deleção intragênica A5\_Y142del; HB33= G34V), entretanto, HB31 apresentou ainda mais duas alterações em genes relacionados com o desenvolvimento renal: *IRX2* e *PKHDI*.

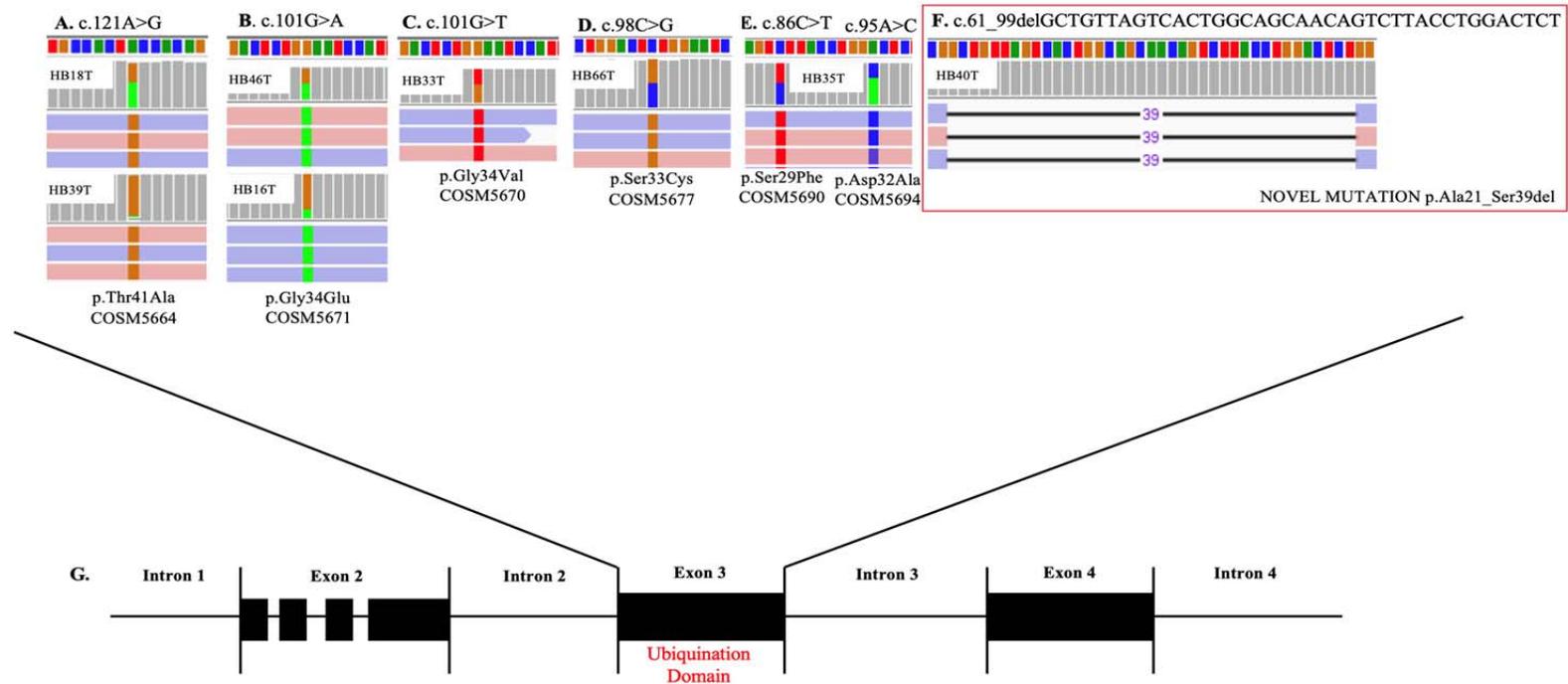
*IRX2* codifica a proteína *Iroquois homeobox protein 2*. Proteínas “homeobox” são uma subclasse de fatores de transcrição, envolvidos em diversas funções do desenvolvimento embrionário (LEWIS 1999).

O gene *PKHDI* fornece instruções para produzir uma proteína chamada fibrocistina (às vezes conhecida como poliductina). Esta proteína está presente em células renais fetais e adultas, e também está presente em níveis baixos no fígado e no pâncreas (ZHANG et al. 2004). A fibrocistina abrange a membrana celular das células renais, de modo que uma extremidade da proteína permanece dentro da célula e a outra extremidade se projeta a partir da superfície externa. Com base em sua estrutura, a fibrocistina pode atuar como um receptor, interagindo com moléculas fora da célula e recebendo sinais que ajudam a célula a responder ao seu ambiente e pode estar envolvida na adesão e repulsão celular, além de promover o crescimento e proliferação (WARD et al. 2002; WARD et al. 2003; revisão em WU et al. 2016).

#### 4.2.3 Estudo de mutações no gene *CTNNB1* e alterações da expressão proteica

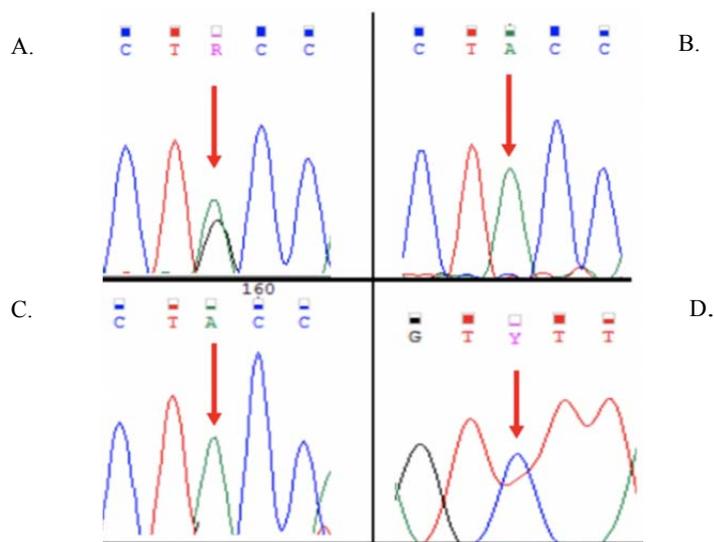
Mutações de ponto no gene *CTNNB1* (SNV e indel) foram averiguadas em um grupo total de 22 hepatoblastomas: 10 tumores que foram estudados por exoma e coorte adicional de 12 amostras, estudada por sequenciamento Sanger. Adicionalmente, deleções intragênicas maiores foram investigadas por Sanger sequencing no mesmo grupo. Nessa casuística de 22 tumores, detectamos um total de 12 mutações no gene *CTNNB1*, correspondendo a ~55% do grupo; foram identificadas seis diferentes mutações do tipo SNV/indel em oito tumores e quatro deleções intragênicas.

A **Figura 21** apresenta as mutações SNV/indel identificadas por exoma ou *target sequencing*, validadas por sequenciamento Sanger.



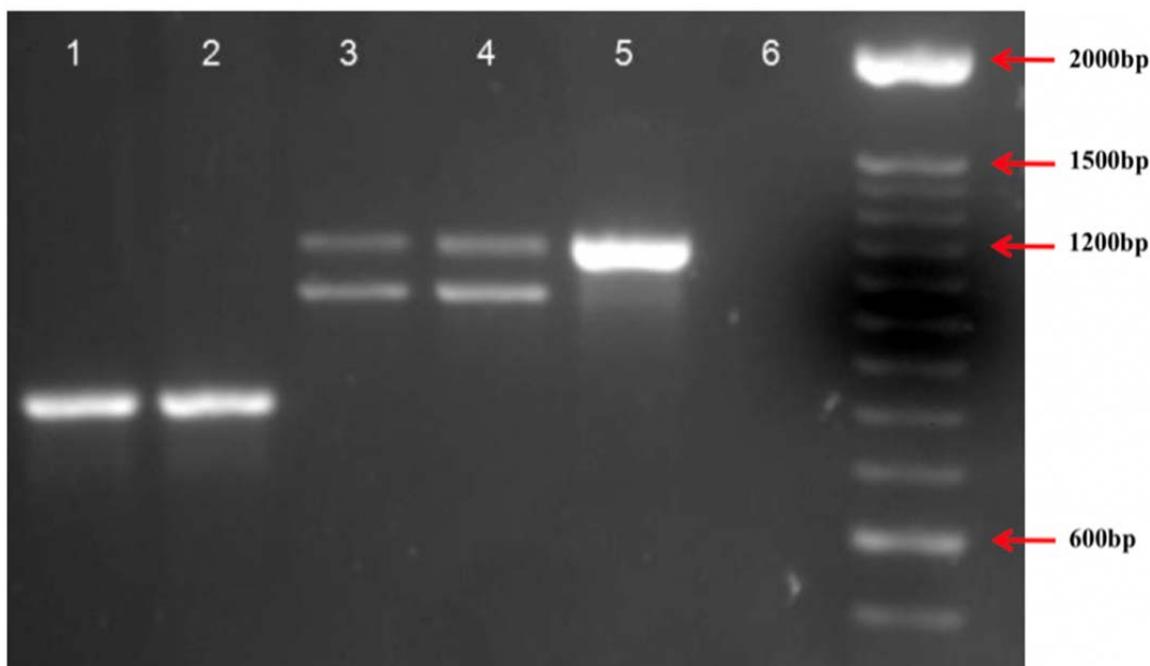
**Figura 21** - Mutações somáticas do tipo missense e indel identificadas no gene *CTNNB1*. O painel superior apresenta as seis diferentes mutações somáticas no *CTNNB1* identificadas por sequenciamento (exoma ou painel) em oito pacientes com hepatoblastoma. Imagens do arquivo BAM dos dados de sequenciamento mostram mutações que foram detectadas em ambas as direções (barras rosa e azul correspondem a reads forward e reverse, respectivamente): **A.** HB18 (frequência variante de 43%) e HB39 (frequência variante de 11%) mutação c.121A>G; **B.** HB46 (frequência variante de 52%) e HB16 (frequência variante de 21%), mutação c.101G>A. **C.** HB33 (frequência variante de 58%), mutação c.101G>T. **D.** HB46 (frequência variante de 50%), mutação c.98C>G. **E.** HB35, duas mutações c.86C>T (frequência variante de 49%) e c.95A>C (frequência variante de 44%); **F.** HB40, nova variante patogênica em *CTNNB1* relatada no presente estudo: deleção de 39pb c.61\_99delGCTGTTAGTCACTGGCAGCAACAGTCTTACCTGGACTCT (frequência variante de 21%). **G.** Mutações detectadas estão mapeadas no éxon 3 do gene, no domínio de ubiquitinação.

Duas mutações documentadas no COSMIC (T41A e S29F) relacionadas a hepatoblastoma foram validadas por sequenciamento Sanger.



**Figura 22** - Validação por sequenciamento Sanger de variantes missense detectadas no gene *CTNNB1*. **A.** Eletroferograma da amostra HB18, representando o alelo em heterozigose da variante c.121A>G; **B.** Eletroferograma da amostra não-tumoral HB18, representando o alelo *wild-type* da variante c.121A>G; em **C.** Eletroferograma da amostra HB39, representando o alelo *wild-type* da variante c.121A>G; **D.** Eletroferograma da amostra HB35, em heterozigose a variante c.86C>T.

Além das mutações do tipo SNV e indel, foi investigada a presença de deleções intragênicas dos éxons 3 e 4 do gene *CTNNB1*, evento descrito em frequência até 20% dos casos de hepatoblastoma (SUMAZIN et al. 2017). O amplicon produzido visando detectar essas deleções é de aproximadamente 1150pb. Quatro tumores (HB15; HB31; HB43 e HB45) apresentaram deleções do éxon 3 ou éxons 3-4. Nos tumores HB15 e HB45 foi detectada a deleção mais comumente encontrada nos hepatoblastomas e descrita no COSMIC (p. A5\_A80del; COSM22700), que corresponde à deleção do éxon 3. Os tumores HB31 e HB43 apresentaram deleções dos éxons 3 e 4 (p. A5\_Y142del; COSM6033). A **Figura 21** corresponde ao gel agarose 2% dessas amostras, no qual as deleções podem ser visualizadas; abaixo, o sequenciamento de uma dessas deleções intragênicas (HB15).



**Figura 23** - Deleções intragênicas detectadas em *CTNNB1*. O produto esperado da reação de PCR corresponde a um fragmento de 1151 pb (controle negativo, DNA normal, indicado pelo número 5). As amostras 1 e 2 correspondem aos tumores HB31 e HB43, respectivamente; o tamanho do fragmento evidencia a presença de um amplicon de ~800 bp, correspondendo a uma deleção dos éxons 3 e 4. As amostras indicadas como 3 e 4 correspondem aos HB15 e HB45, que apresentam fragmentos de aproximadamente 1000 pb, indicando deleção apenas do éxon 3 do gene. A amostra 6 corresponde ao branco do experimento.

Como já descrito, o gene *CTNNB1* está envolvido na via de sinalização Wnt e mutações ativadoras no éxon 3, como as aqui detectadas, em geral produzem uma proteína anormal que não é degradada e será translocada para o núcleo. Para avaliar se as mutações que identificamos produziram o mesmo efeito, foi realizada uma avaliação *in silico*. Existem várias estruturas da  $\beta$ -catenina no PDB (<http://www.rcsb.org/pdb>), um repositório de arquivos de estruturas proteicas cristalizadas, no qual a sequência existente pode ser modificada para avaliar possíveis efeitos. Todas as variantes aqui identificadas são ou contêm sítios de fosforilação por GSK3 $\beta$  e essa região é um hotspot de mutações em diversos tumores. Mutações nestes sítios (assim como deleções) resultariam em diminuição da fosforilação por GSK3 $\beta$  e conseqüente bloqueio ou redução da degradação da  $\beta$ -

catenina; o acúmulo citoplasmático da proteína acarreta sua translocação para o núcleo.

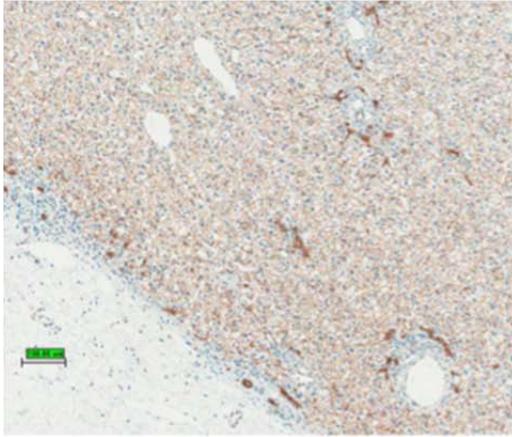
Para confirmar se ocorreu nos tumores mutados a translocação da proteína para o núcleo, evidência indireta de ativação da via WNT, foi realizado um ensaio de avaliação de expressão proteica de *CTNNB1* por imunohistoquímica. Com exceção da amostra HB28 e das amostras obtidas do GRAACC, cujos blocos de parafina não estavam disponíveis, os outros tumores foram utilizados nessa avaliação imunohistoquímica.

Nove hepatoblastomas com dados de sequenciamento do gene *CTNNB1* foram avaliados. O resumo da análise dos dados de imunohistoquímica está no **Quadro 4**. A **Figura 24** ilustra as amostras positivas para expressão proteica do gene *CTNNB1*, portadoras de mutações; uma amostra negativa quanto à expressão desse gene; dados da amostra HB33 (HB congênito), indicando heterogeneidade intratumoral, com detecção de marcação nuclear da proteína em nódulos tumorais e marcação da proteína na membrana citoplasmática.

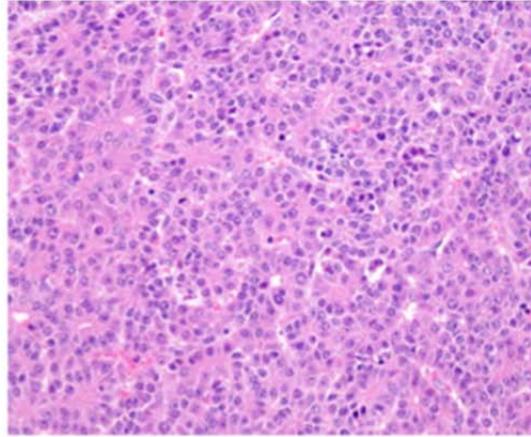
**Quadro 4** - Análise de expressão da proteína  $\beta$ -catenina por imunohistoquímica e mutações no gene *CTNNB1* nos tumores com dados de exoma.

Tumores	Mutações em <i>CTNNB1</i>	Marcação nuclear de $\beta$ -catenina	Tipo Histológico
HB15	A5_A80del	sim	Epitelial Embrionário
HB16	G34E	sim	Epitelial Fetal
HB17	--	não	Epitelial Fetal
HB18	T41A	sim	Epitelial Embrionário
HB30	--	não	HB/HCC <i>features</i>
HB31	A5_Y142del	sim	Epitelial Fetal
HB32	--	sim	Epitelial e mesenquimal misto
HB33	G34V	sim	Epitelial e Mesenquimal Misto (congênito)
HB46	G34E	sim	Epitelial e mesenquimal misto

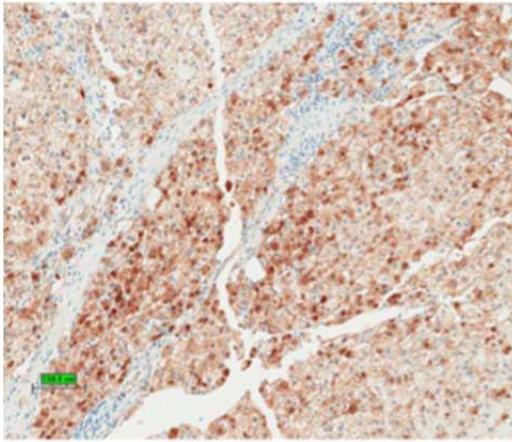
A.



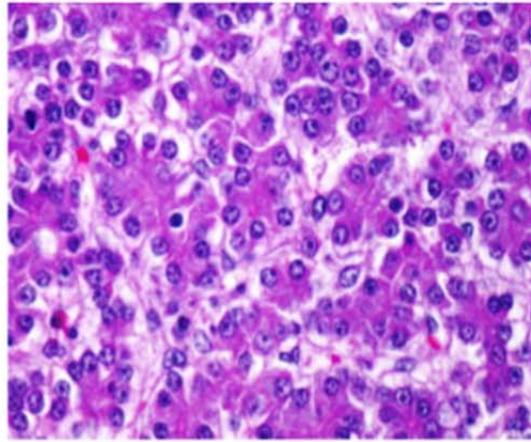
A1.



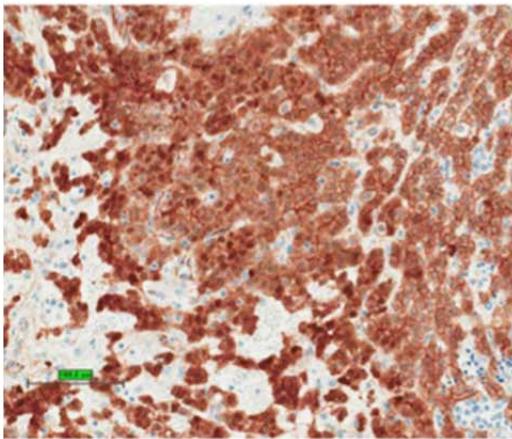
B.



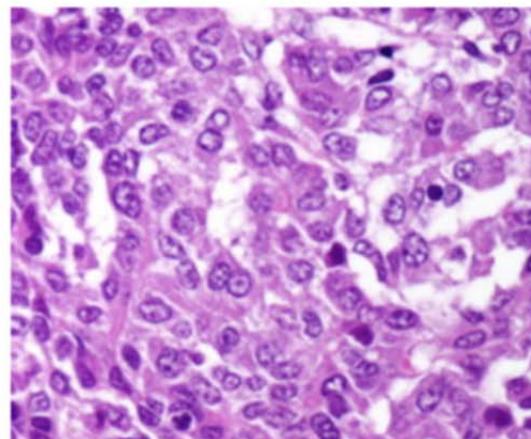
B1.



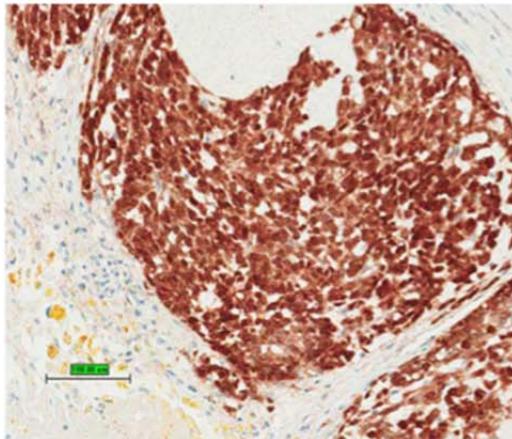
C.



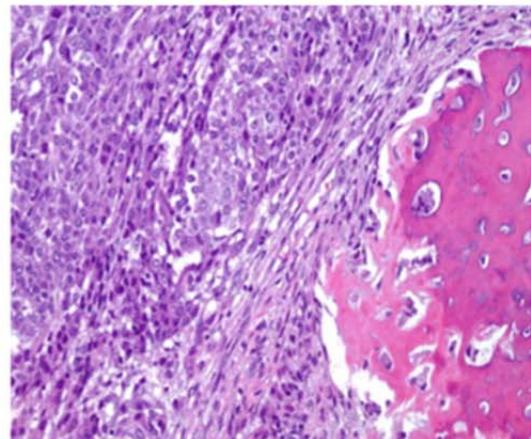
C1.

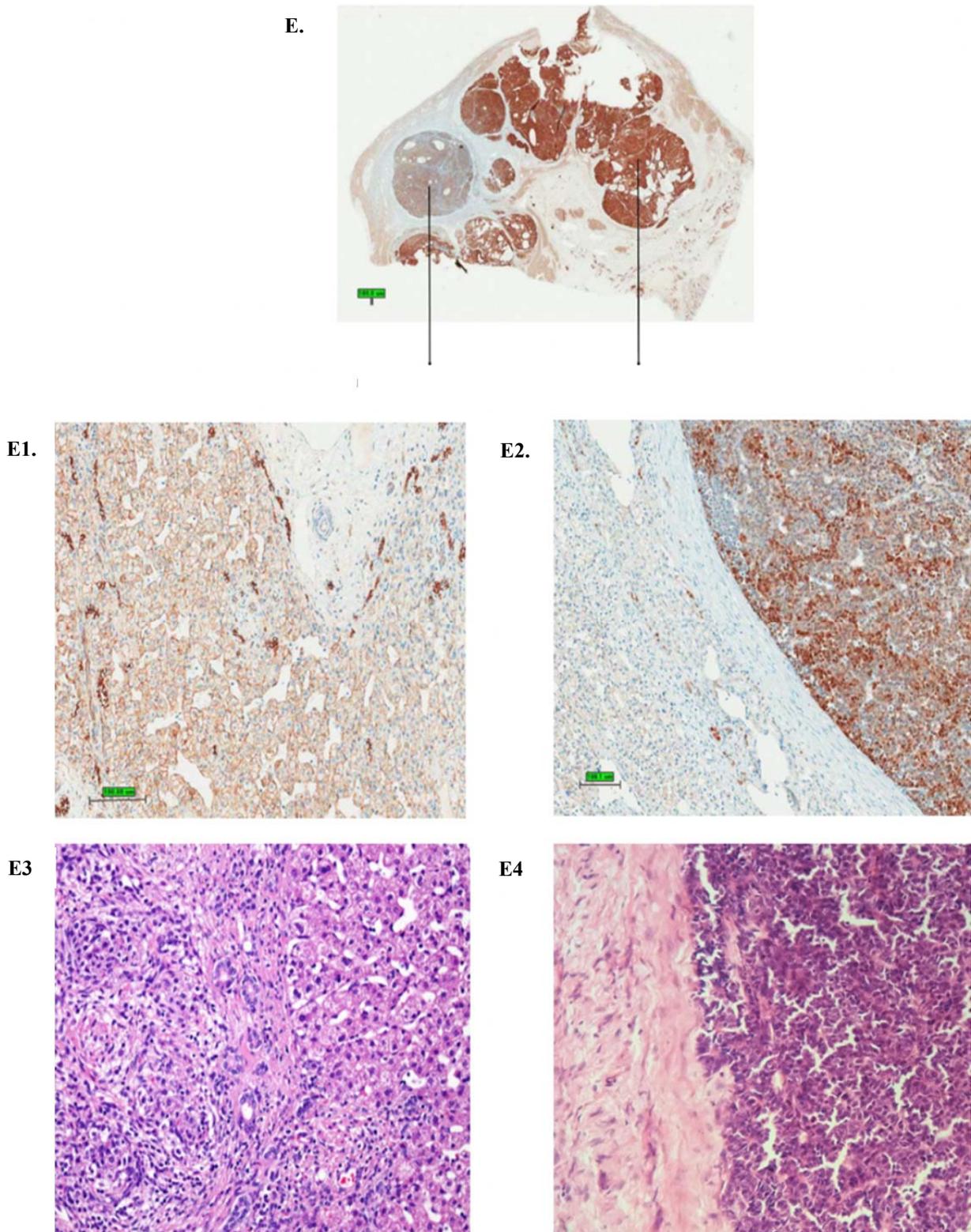


D.



D1.





**Figura 24** - Análise de expressão proteica da  $\beta$ -catenina em hepatoblastomas.

**Legenda Figura 24:** Em **A** está representada a amostra HB17, negativa para marcação nuclear da proteína e em **A1** o corte histológico correspondente, corado com HE, mostrando o tipo histológico da amostra, Epitelial Fetal, que se assemelha a hepatócitos maduros, com relativa uniformidade nuclear e um citoplasma abundante e eosinófilo. Em **B** e **C**, as amostras HB16 e HB18, respectivamente, que são portadoras de mutações no gene *CTNNB1* e apresentam marcação nuclear positiva para  $\beta$ -catenina; em **B1**, corte histológico de HB16 corado com HE, também tipo histológico Epitelial Fetal; entretanto, esse tumor com núcleos menos uniformes que em **A1**; em **C1**, corado com HE de HB18, tipo histológico Epitelial Embrionário, cujas células apresentam um citoplasma menor em relação ao tipo Fetal, núcleos maiores, bordas celulares mal definidas, alta atividade mitótica e que se assemelham mais aos hepatoblastos durante o período de desenvolvimento embrionário; esse tipo histológico confere pior prognóstico; em **D**, a amostra HB32, que não possui mutação em *CTNNB1*, mas apresenta marcação nuclear positiva; em **D1**, seu tipo histológico Epitelial e Mesenquimal misto, com predomínio do tipo embrionário e presença de componente osteóide: à esquerda a apresentação do tipo embrionário e com visibilidade da atipia celular característica desta morfologia e à direita a matriz óssea - os elementos mesenquimal e epitelial são divididos por resquílios de mesênquima primitivo. Em **E** está a amostra HB33: acima podemos visualizar todo o corte da amostra corado, indicando um padrão heterogêneo de marcação, no qual existem áreas positivas e outras não. Em **E1** temos um exemplo da ausência de marcação nuclear, com a marcação na membrana citoplasmática; em **E2**, um exemplo de positividade com marcação nuclear da  $\beta$ -catenina – nesta imagem ainda podemos ver a transição de uma margem livre de tumor para um nódulo tumoral. Em **E3** acima e à esquerda está representado o tipo embrionário e à direita o tipo fetal e em **E4** a representação corada com HE da transição entre a área não tumoral e o tumor.

As amostras que apresentaram mutações no gene *CTNNB1* exibiram marcação nuclear de  $\beta$ -catenina, como esperado no caso de mutações ativadoras deste gene e da via Wnt. No entanto, os tumores HB30 e HB32, nos quais mutações não foram detectadas, também apresentaram marcação nuclear da  $\beta$ -catenina, indicando ativação da via Wnt por outro mecanismo. Retornamos aos dados de sequenciamento com o objetivo de reavaliar alguns genes que também estão envolvidos na via Wnt. Foi analisado o gene *AXINI*, componente *downstream* da via Wnt que participa da degradação da  $\beta$ -catenina (KOCH et al. 2004; MIAO et al. 2003; TANIGUCHI et al. 2002). JIA et al. publicou em 2014 resultados do sequenciamento de exoma de seis amostras de HBs nas quais foram identificadas 24 mutações somáticas, não-sinônimas, mapeadas em 21 diferentes genes, incluindo uma mutação nova no gene *CTNNB1* (G512V) e duas no gene *CAPRN2* (R968H/S969). As variantes específicas R968H e S969 do gene *CAPRN2*, e o éxon 7 do gene *AXINI* foram investigados diretamente por sequenciamento Sanger; nenhuma das variantes foi identificada.

Com o objetivo de ampliar a análise de expressão da  $\beta$ -catenina, em colaboração com a Dra. Isabela Werneck, resgatamos uma lâmina de *tissue microarray* de hepatoblastomas para também avaliar a expressão de  $\beta$ -catenina. Este *tissue microarray* foi construído no A.C.Camargo Cancer Center (CAJAIBA et al. 2006) e contém 19 casos, dos quais dois fazem parte de nossa casuística de exomas (HB15 e HB16), que foram avaliados individualmente - as demais amostras foram nomeadas HB\_TMA\_XX. Este *tissue microarray* foi desenhado para conter, quando disponível, tecido hepático normal (**A**), tecido tumoral do tipo epitelial fetal (**B**), tecido tumoral do tipo epitelial embrionário (**C**) e regiões mistas (**D**).

A **Tabela 12** abaixo resume os achados na avaliação da expressão de  $\beta$ -catenina em amostras derivadas de 17 tumores diferentes.

**Tabela 12** - Análise de expressão da proteína  $\beta$ -catenina em hepatoblastomas em *tissue microarray* por imunohistoquímica.

<b>Amostra</b>	<b>Marcação nuclear da <math>\beta</math>-catenina</b>
HB_TMA01_A	Negativo
HB_TMA01_B	Negativo
<b>HB_TMA01_C</b>	<b>Nuclear</b>
<b>HB_TMA01_D</b>	<b>Nuclear</b>
HB_TMA02_A	Negativo
<b>HB_TMA02_B</b>	<b>Nuclear</b>
<b>HB_TMA02_C</b>	<b>Nuclear</b>
HB_TMA02_D	---
HB_TMA03_A	Negativo
HB_TMA03_B	Negativo
HB_TMA04_A	Negativo
HB_TMA04_B	Negativo
<b>HB_TMA04_C</b>	<b>Nuclear</b>
HB_TMA04_D	---
HB_TMA05_A	Negativo
<b>HB_TMA05_B</b>	<b>Nuclear</b>
<b>HB_TMA05_C</b>	<b>Nuclear</b>
HB_TMA05_D	Estroma - Negativo
HB_TMA06_A	Negativo
HB_TMA06_B	Negativo
<b>HB_TMA06_C</b>	<b>Nuclear</b>
HB_TMA06_D	Estroma - Negativo
HB_TMA07_A	Negativo
<b>HB_TMA07_C</b>	<b>Nuclear</b>

Cont. /Tabela 12

Amostra	Marcação nuclear da $\beta$ -catenina
HB_TMA07_D	Estroma - Negativo
HB_TMA08_A	Negativo
HB_TMA08_B	Negativo
HB_TMA08_C	Negativo
HB_TMA08_D	Negativo
HB_TMA09_A	Negativo
HB_TMA09_B	Negativo
<b>HB_TMA09_C</b>	<b>Nuclear</b>
HB_TMA09_D	Negativo
HB_TMA10_A	Negativo
HB_TMA10_C	Estroma - Negativo
HB_TMA10_D	Negativo
HB_TMA11_A	Negativo
<b>HB_TMA11_B</b>	<b>Nuclear</b>
<b>HB_TMA11_C</b>	<b>Nuclear</b>
HB_TMA12_B	Negativo
HB_TMA12_C	Negativo
HB_TMA12_D	Negativo
HB_TMA13_A	Negativo
<b>HB_TMA13_B</b>	<b>Nuclear</b>
<b>HB_TMA13_C</b>	<b>Nuclear</b>
HB_TMA13_D	Negativo
HB_TMA14_A	Negativo
<b>HB_TMA14_B</b>	<b>Nuclear</b>
<b>HB_TMA14_C</b>	<b>Nuclear</b>
HB_TMA14_D	Negativo
HB_TMA15_A	Negativo
<b>HB_TMA15_B</b>	<b>Nuclear</b>
HB_TMA15_D	---
HB_TMA16_B	Negativo
<b>HB_TMA16_D</b>	<b>Nuclear</b>
HB_TMA18_A	Negativo
<b>HB_TMA18_C</b>	<b>Nuclear</b>

**Legenda:** A: amostra não tumoral; B: Tecido tumoral epitelial fetal; C: Tecido tumoral epitelial embrionário; D: Tecido tumoral com regiões mistas.

Em resumo, a análise da expressão proteica do gene *CTNNB1* revelou que das 26 amostras tumorais testadas (individualmente ou *tissue microarrays*) 20 foram positivas para marcação nuclear, evidenciando a atividade anormal da via Wnt neste tipo tumoral. Adicionalmente, 53% das amostras positivadas tinham regiões mistas na análise (células epiteliais e mesenquimais), com predominância de marcação em regiões do tipo Epitelial Embrionário (32%) em relação ao tipo Epitelial Fetal (15%).

Os achados estão de acordo com a literatura e em especial com um estudo publicado em 2008 por CAIRO et al. Neste trabalho, a análise de expressão gênica permitiu identificar duas subclasses tumorais que se assemelham a fases distintas do

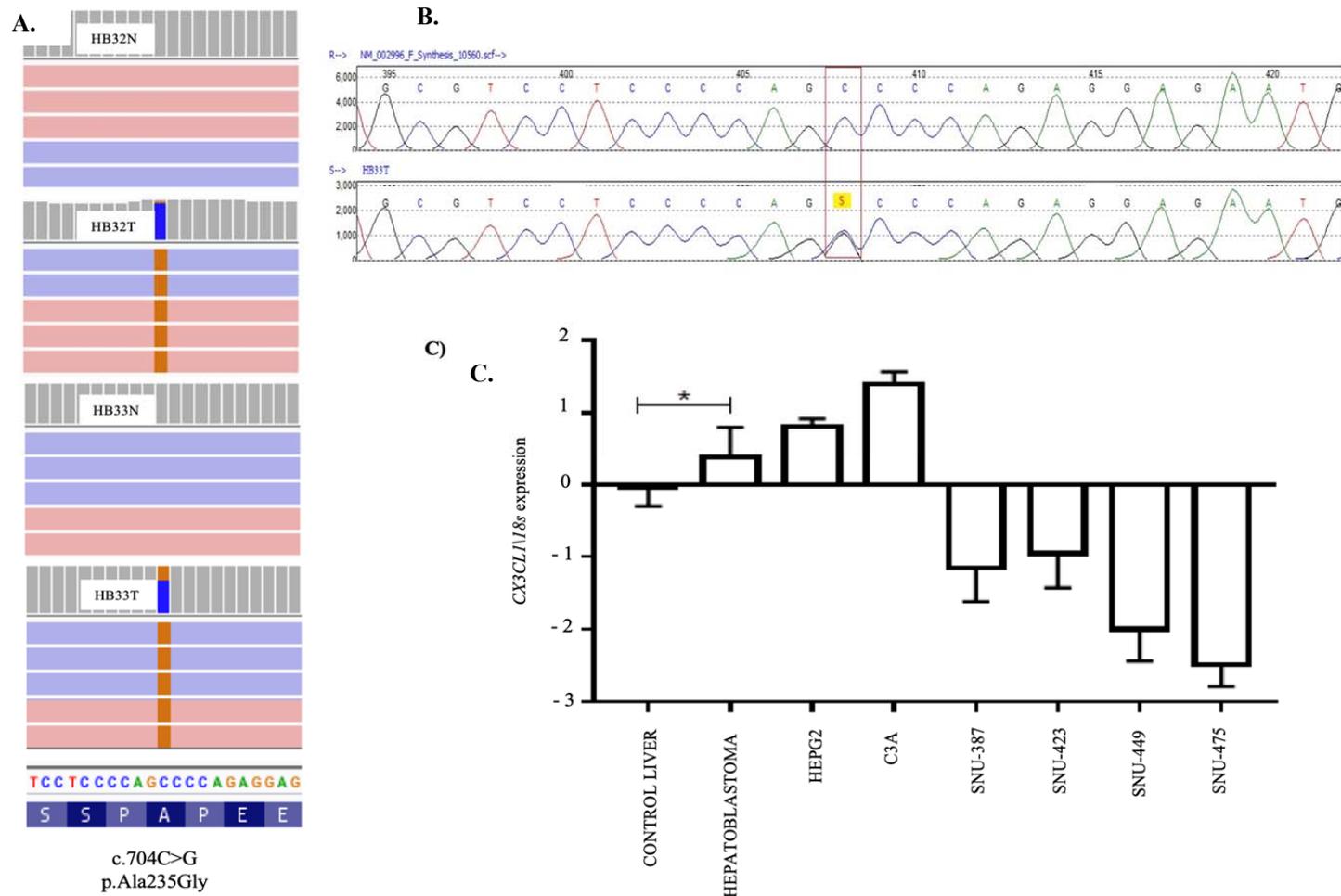
fígado em desenvolvimento, diferenciadas por uma assinatura de expressão de 16 genes. Um dos critérios utilizados para a separação dos subgrupos foi a observação da expressão da  $\beta$ -catenina em combinação com a expressão dos outros genes estudados; na análise por imunohistoquímica, os tumores do tipo histológico embrionário e positivos para marcação nuclear pertenciam a um subgrupo mais agressivo, ressaltando a importância do estudo dessa proteína nos diferentes componentes dos hepatoblastomas.

#### **4.2.4 Mutação somática recorrente A235G no gene CX3CL1: novo gene em hepatoblastoma?**

O dado mais significativo em nosso estudo foi a detecção de uma mesma variante somática em heterozigose em dois tumores do grupo (HB32 e HB33). A variante A235G está em chr16:57416454 (Hg19) e é uma mutação *missense* que leva à troca de C>G na posição 704 da sequência codificadora do éxon 3 do gene *CX3CL1* (*NM\_002996*). Esta variante ocasiona a troca do aminoácido alanina por glicina no códon 235 da proteína, sendo predita como danosa pelos algoritmos *SIFT* e *Mutation Taster* (**Figura 25A**).

A mutação somática chr16:57416454, identificada no HB33 e no HB32 no exoma, foi validada no painel de genes por *target sequencing*. Para confirmar esses achados e também testar a eventual presença da mutação em outros hepatoblastomas, foi feito sequenciamento Sanger. O sequenciamento Sanger detectou a mutação apenas no tumor HB33 (**Figura 25B**), mas não na amostra HB32; como a mutação também foi validada em HB32 por *target sequencing*, a não-detecção em Sanger poderia ser explicado pela frequência alélica muito baixa da variante nessa amostra (11%).

Outras 38 amostras de hepatoblastoma foram testadas para a variante A235G (11 amostras do GRAACC 1 amostra do A.C.Camargo Cancer Center 12 amostras do *tissue microarray* 14 amostras do Texas Children's Hospital), mas nenhuma mutação adicional foi identificada.



**Figura 25** - Mutação somática recorrente A235G detectada no exon 3 do gene *CX3CL1* e seu padrão de expressão em hepatoblastomas e linhagens celulares de tumores hepáticos.

**Legenda:** **A.** Imagem obtida do IGV; Imagens de arquivos BAM dos tumores (HB32T e HB33T) e tecidos não-tumorais (HB32N e HB33N) mostrando que a mutação A235G (c.704C> G, p.Ala235Gly) foi detectada em ambas as direções (barras rosa e azuis correspondem a *forward* e *reverse*, respectivamente); HB32T exibindo uma baixa frequência da variante (11%) e HB33T com uma frequência da variante de 40%. **B.** Sequenciamento Sanger mostrando a variante *CX3CL1* em heterozigose no tumor HB33. **C.** Padrão de expressão gênica de *CX3CL1* em 19 amostras de hepatoblastoma; as amostras de hepatoblastoma, incluindo os tumores HB32 e HB33 mutados em *CX3CL1*, e as linhagens celulares de hepatoblastoma (HEPG2 e C3A) apresentaram aumento de expressão em comparação com as amostras de fígado de controle. As linhagens celulares de carcinoma hepatocelular (SNU-387, SNU-423, SNU-449 e SNU-475) mostraram expressão inferior em relação às amostras controle e aos hepatoblastomas (teste estatístico Mann-Whitney, \* p <0,05 (correção de Bonferroni); Gene endógeno: 18S; amostras controle são tecidos hepáticos não tumorais. Para as análises, foram utilizados os valores em log do RQ.

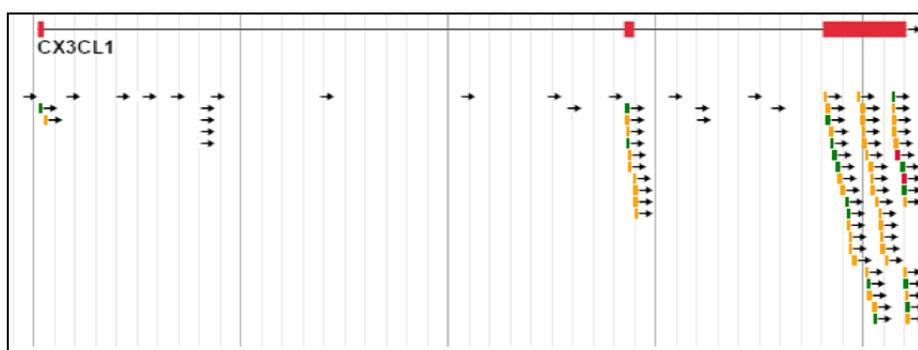
O gene *CX3CL1* (*chemokine C-X3-C motif ligand 1*) ou fractalquina, localizado no cromossomo 16, é composto por três éxons, codificando uma proteína da família das quimiocinas. A Fractalquina, também conhecida como ligante 1 de quimiocina (motivo C-X3-C), é uma proteína grande, constituída por 373 aminoácidos, contendo múltiplos domínios. Trata-se de uma proteína transmembrana, presente em células endoteliais de diversos tecidos, como cérebro, rins e fígado (HOOVER et al. 2000), constituindo uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas e responsáveis pela movimentação dos leucócitos, incluindo migração para locais de inflamação tecidual a partir do sangue (ROLLINS et al. 1997). Existem 4 subtipos de quimiocinas; o subtipo 3 só possui como representante a produzida pelo gene *CX3CL1*, fractalquina, em que a característica estrutural é a presença de uma sequência Glu-Leu-Arg (ELR) no N-terminal, que é essencial para a ligação de receptores (ROLLINS et al. 1997).

Primeiramente, o papel biológico destas proteínas quimiocinas foi relacionado de maneira superficial a processos inflamatórios (BAGGIOLINI et al. 1998); entretanto, atualmente sabe-se do papel crucial exercido por essas moléculas na estimulação do movimento das células mononucleares pelo corpo e na migração destas do sangue periférico para os tecidos, contribuindo na resposta imune adaptativa e/ou na patogênese de várias doenças (CHARO et al. 2006). Esta proteína específica *CX3CL1* promove suas funções de adesão e migração celulares pela interação com o receptor de quimiocina codificado pelo gene *CX3CR1*. O receptor

*CX3CR1* é uma proteína de membrana e um marcador bem estabelecido de monócitos anti-inflamatórios ou circulantes, mas também está presente em células NK, células T e células musculares lisas, mediando migração, adesão e proliferação (GRIFFITH JW, SOKOL CL, LUSTER AD. et al. 2014).

O significado de mutações no gene *CX3CL1* em câncer é pouco conhecido; trabalho de 2014 (CHENG et al.) investigou sua expressão em tumores gástricos, detectando aumento de expressão em tecidos tumorais comparados aos tecidos adjacentes. O grupo de pesquisadores observou que o receptor *CX3CR1* estava altamente expresso em câncer gástrico *in vivo*, relacionado com metástase linfática, em associação a estágios mais avançados. A super-expressão de *CX3CR1 in vitro* promoveu proliferação, migração e invasão da linhagem celular tumoral. Os autores concluíram então que a super-expressão desse receptor poderia estar associada também à super-expressão do ligante, ocasionando metástase. Um dos dois tumores nos quais detectamos a mutação somática em *CX3CL1* produziu metástase pulmonar (HB33).

No COSMIC, existem algumas mutações relacionadas a este gene e em diferentes tipos de tumor, mas predominando cânceres gástricos; a **Figura 26** abaixo exhibe as alterações já descritas nos éxons do gene *CX3CL1*. O éxon 3 é o que apresenta o maior número de mutações e foi também onde detectamos a variante recorrente em nosso estudo.



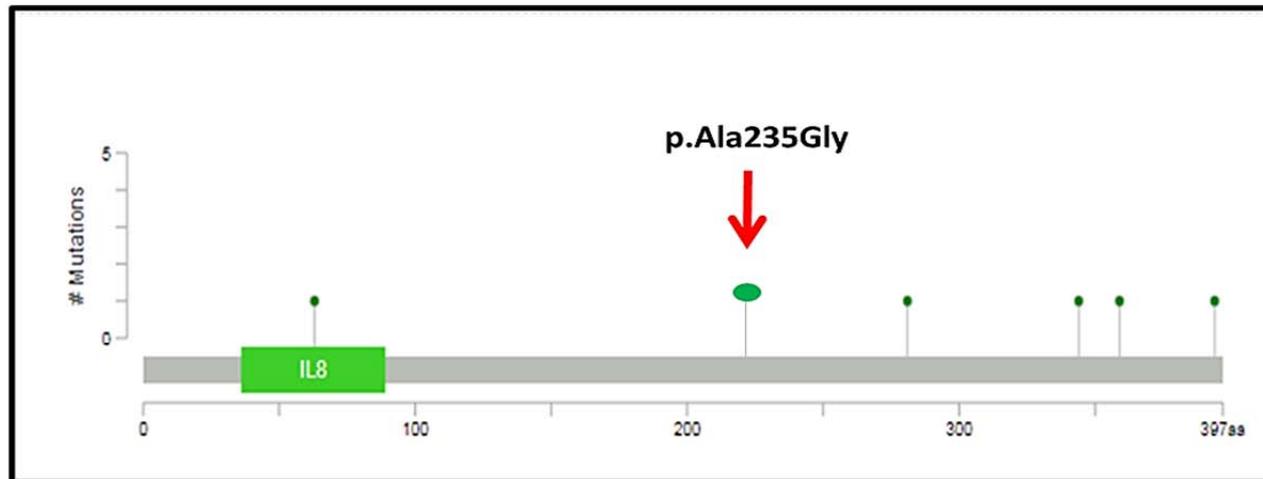
**Fonte:** Imagem extraída do COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/search?q=cx3cl1>).

**Figura 26** - Mutações somáticas já detectadas no gene *CX3CL1* em tumores, depositadas no banco de dados COSMIC. Em vermelho estão identificados os três éxons do gene; em amarelo, são representadas mutações missense, em verde, mutações do tipo indel; em vermelho, mutações nonsense.

No cBioPortal, foram identificadas cinco mutações *missense* no gene *CX3CLI* em carcinoma hepatocelular. A **Figura 27** ilustra essas alterações.

A análise também foi realizada no portal PECAN, no qual foram identificadas em *CX3CLI* três variantes somáticas em três tipos diferentes de tumores: neuroblastoma, osteossarcoma e leucemia linfóide aguda B (**Figura 28**); entretanto, duas eram mutações sinônimas.

## CANCER MUTATIONS IN *CX3CL1* - HCC



**CX3CL1**

UniProt: X3CL1\_HUMAN

Transcript: ENST00000006053

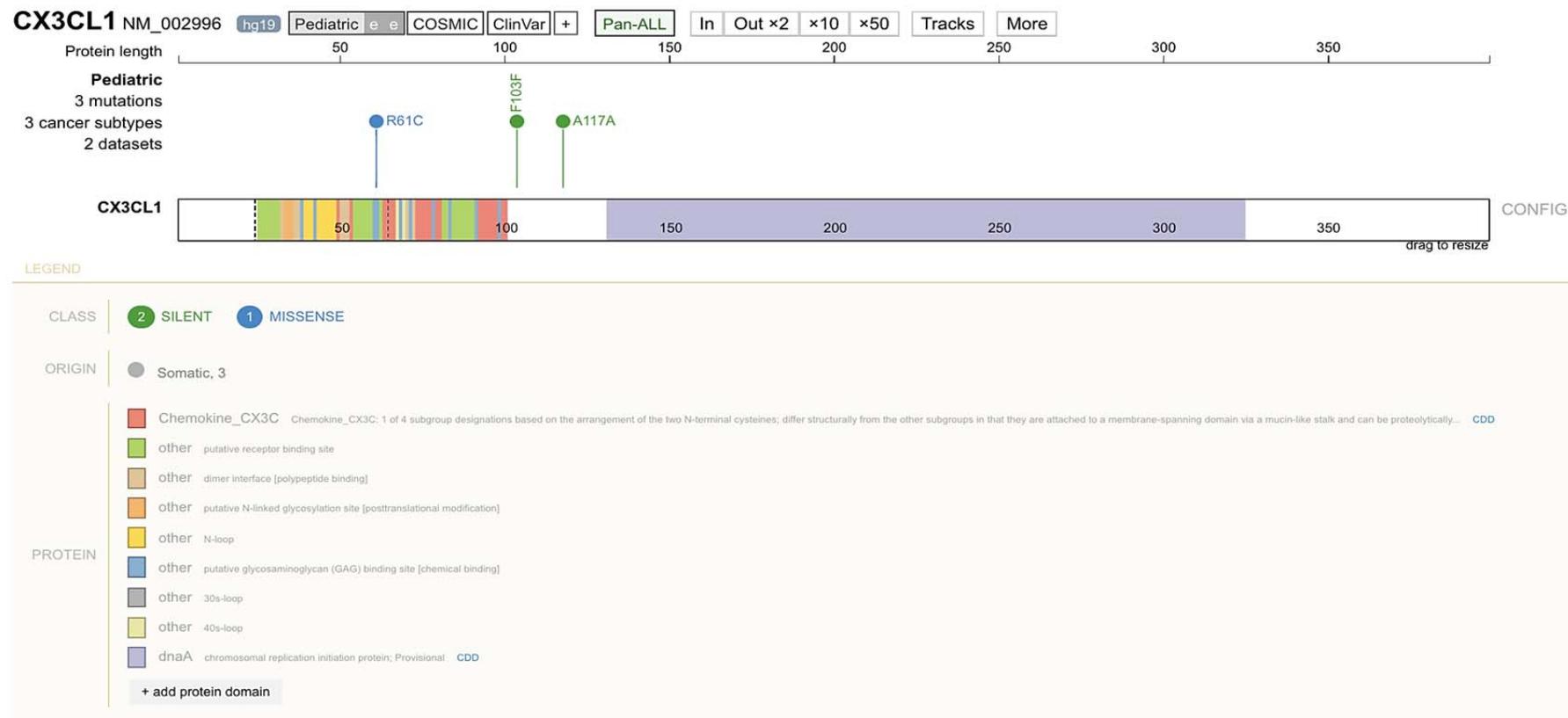
Somatic Mutation Frequency: 0.5% ⓘ

5 Missense 0 Truncating  
0 Inframe 0 Other

Study	Sample ID	Cancer Type	Protein Change	Annotation ▼	Mutation Type	Copy #	COSMIC	Allele Freq (T)	# Mut in Sample
Liver Hepatocell...	TCGA-ES-A2HS-01	Hepatocellular Carcinoma	<i>M359V</i>	○	Missense	ShallowDel		0.09	686
Liver Hepatocell...	TCGA-DD-AADN-01	Hepatocellular Carcinoma	<i>G281D</i>	○	Missense	Gain		0.34	82
Hepatocellular C...	CHC892T	Hepatocellular Carcinoma	<i>G344R</i>	○	Missense				4025
Hepatocellular C...	CHC302T	Hepatocellular Carcinoma	<i>I63V</i>	○	Missense		1		72
Liver Hepatocell...	H072849	Hepatocellular Adenoma	<i>L394M</i>	○	Missense			0.18	139

Fonte: Imagem extraída do cBioPortal dos projetos de tumores hepáticos. (<http://www.cbioportal.org/results/mutations>).

Figura 27 - Cinco mutações no gene *CX3CL1* em carcinoma hepatocelular, depositadas no cBioPortal. A seta em vermelho indica a variante encontrada no nosso estudo e que não está presente nesse banco de dados.



Fonte: Imagem extraída do portal PECAN ([www.pecan.stjude.cloud/proteinpaint/](http://www.pecan.stjude.cloud/proteinpaint/)).

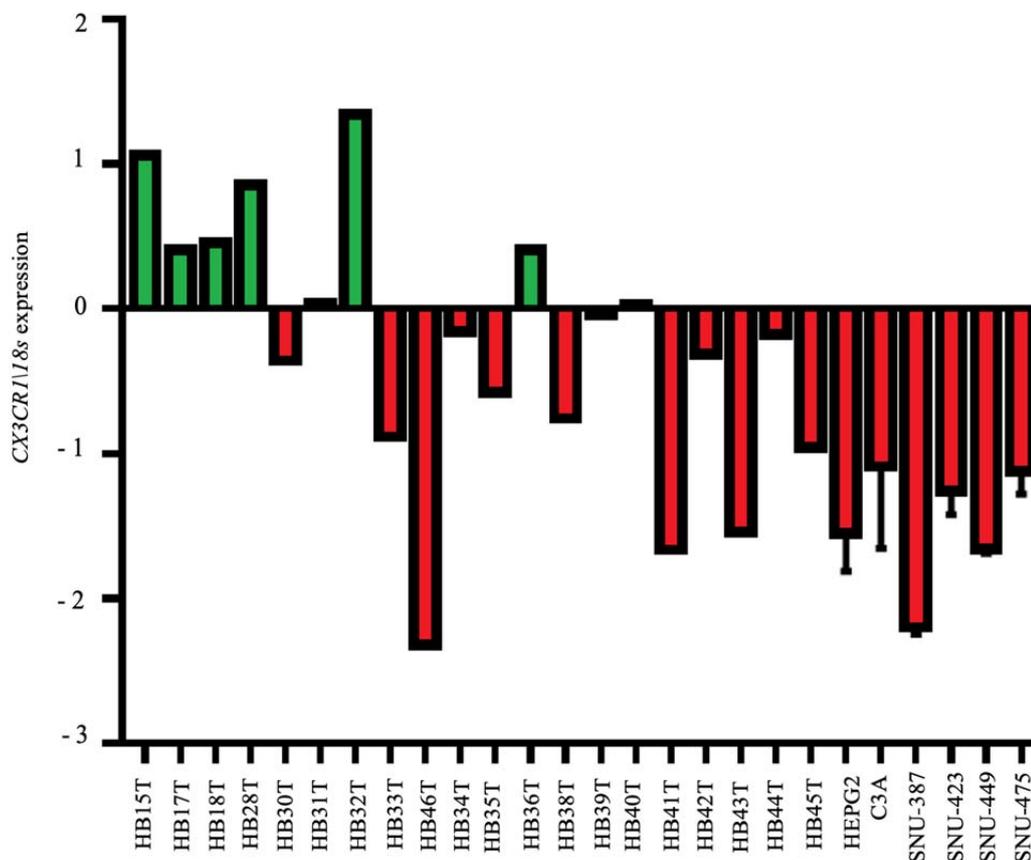
**Figura 28** - Análise de mutações do gene *CX3CLI* nos dados PECAN de tumores pediátricos. A imagem representa o gene *CX3CLI*; para cada tipo de mutação, foi associada uma cor, descrita no quadro em amarelo, abaixo da representação de cada gene. Do lado esquerdo, logo abaixo do nome do gene, é possível identificar o total de mutações e em quantos tipos de tumores elas foram encontradas.

Analisando em conjunto os dados disponíveis em literatura, formulamos a hipótese de que *CX3CL1/CX3CR1* poderia desempenhar papel importante na tumorigênese ou progressão de hepatoblastomas. Para postular o efeito, se existente, da mutação *missense* detectada, e assim estabelecer um desenho experimental que nos possibilitasse avaliar o papel biológico desta mutação na função da proteína, consultamos o banco *PFAM* (<http://pfam.xfam.org>). Para visualização da estrutura 3D da proteína utilizamos o PDB (<http://www.rcsb.org/pdb>). O principal domínio dessa proteína corresponde à IL8 (Interleucina 8) e está delimitado pelos aminoácidos 31-89. O aminoácido (235), no qual ocorre a mutação que detectamos, faz parte da região *Mucin-Like* da proteína, parte não solúvel que exerce um papel fundamental por se tratar da região que permite sua ligação à superfície de algumas células. Quando foi realizada a consulta ao PDB, verificamos que esta porção da proteína não foi cristalizada e por isso não foi possível testar *in silico* o possível efeito da variante *missense* na proteína.

Considerando a presença da mesma variante em dois tumores, os estudos recentes associando aumento de expressão de *CX3CL1/CX3CR1* e metástase em outros tipos tumorais e a atuação deste gene em resposta imune e migração celular, duas estratégias de estudo foram elaboradas: (a) avaliação da expressão do mRNA dos genes *CX3CL1* e seu receptor *CX3CR1* em hepatoblastomas por RT-PCR e (b) estudo por imunohistoquímica da fractalquina e de seu receptor *CX3CR1*.

O nível de expressão de *CX3CL1* foi avaliado em 19 amostras de HB (incluindo os dois tumores mutados), nove amostras de fígado não-tumoral, duas linhagens celulares de hepatoblastoma (HEPG2 e C3A) e quatro linhagens celulares de carcinoma hepatocelular (SNU-387, SNU-423, SNU449 E SNU-475). O aumento de expressão de *CX3CL1* foi observado no grupo de hepatoblastomas em geral, incluindo os tumores *CX3CL1*-mutados e as duas linhagens celulares de hepatoblastoma, em comparação com tecido hepático controle ( $p < 0,05$ ) (**Figura 25C**; página 116). As linhagens celulares de carcinoma hepatocelular apresentaram diminuição de expressão em relação às amostras controle e aos hepatoblastomas. Com relação à análise de expressão do receptor, apenas seis tumores apresentaram aumento de expressão de *CX3CR1* em relação ao controle, incluindo um dos tumores

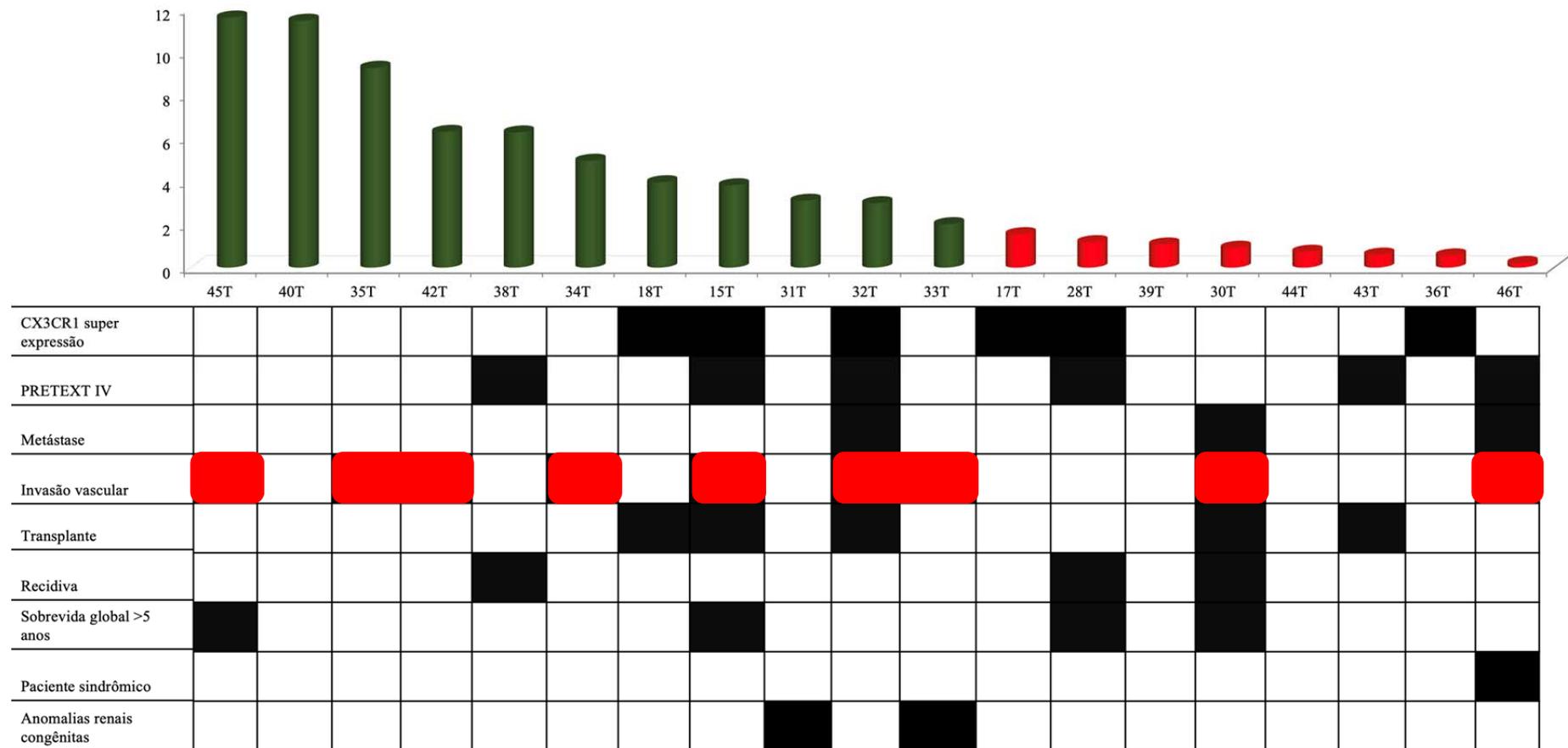
*CX3CL1*-mutados (HB32; **Figura 29**). Adicionalmente, a expressão de *CX3CR1* e *CX3CL1* não parece estar correlacionada.



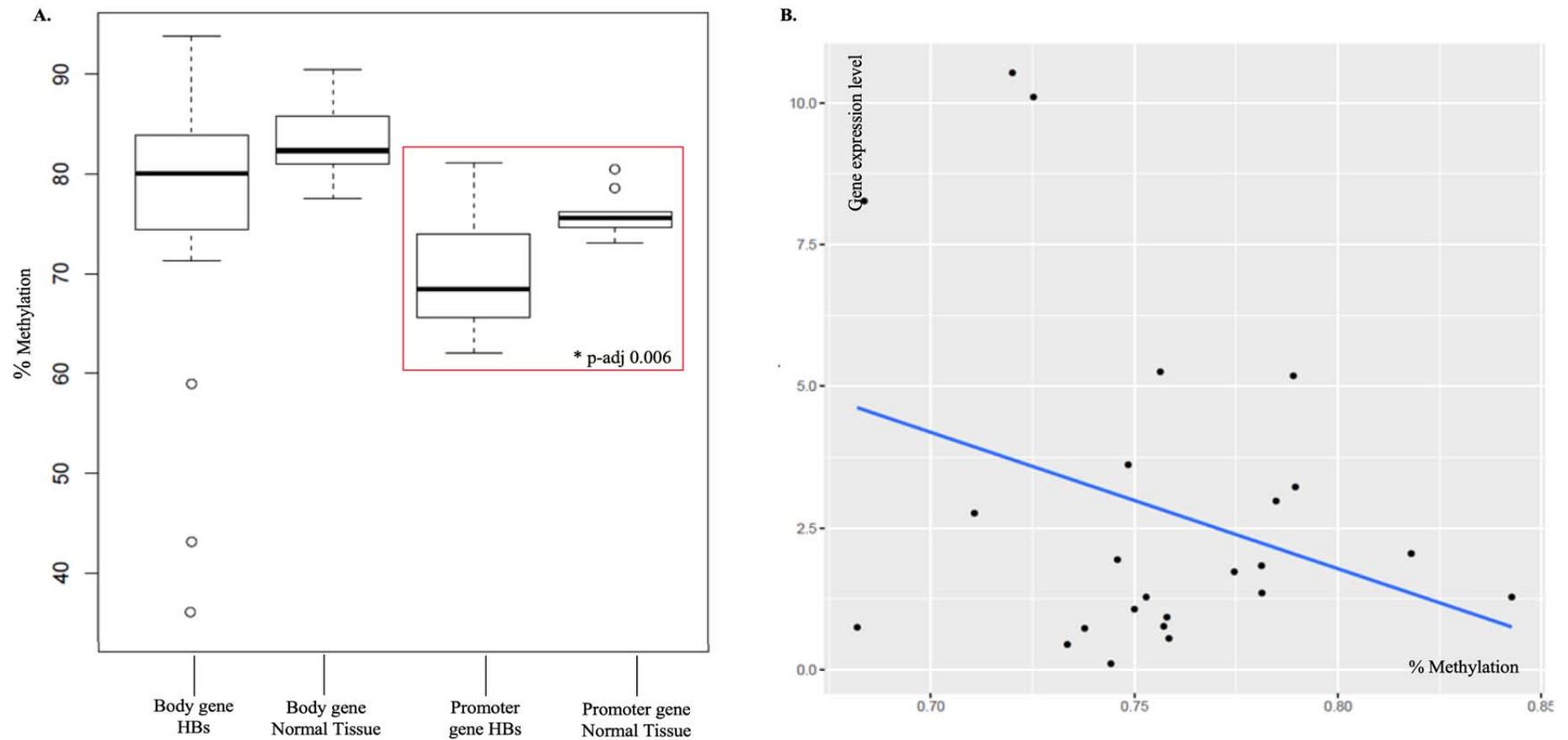
**Figura 29** - Padrão de expressão gênica do gene *CX3CR1* em hepatoblastomas e linhagens celulares de câncer hepático. Apenas seis de 19 hepatoblastomas (barras verdes) apresentaram aumento de expressão de *CX3CR1* em comparação com amostras de fígado controle; todos os demais, incluindo as linhagens celulares, tinham expressão reduzida. Gene endógeno: 18s e os controles são tecidos hepáticos não tumorais. Para as análises, foram utilizados os valores em log do RQ.

Avaliando os parâmetros clínicos em relação ao padrão de expressão de *CX3CL1*, a invasão vascular foi a única característica que mostrou tendência de aumento de expressão, considerando que dentre nove hepatoblastomas com invasão vascular, sete exibiram nível de expressão de *CX3CL1* superior ao do controle hepático (78% das amostras com invasão vascular tem aumento de expressão em relação ao controle), embora sem significância estatística ( $p < 0,06$ , teste qui-quadrado – **Figura 30**).

Dados de metilação de DNA de *CX3CLI* e *CX3CRI* foram recuperados de estudo prévio de nosso grupo (MASCHIETTO et al. 2016), visando correlacionar com o padrão de expressão desses genes (**Figura 31**). Foi observada nos tumores uma hipometilação no promotor de *CX3CLI* em comparação com amostras de fígado controle (p-adj 0,006), assim como uma tendência de correlação inversa entre expressão gênica e metilação no corpo do gene de *CX3CLI* (Spearman rho 0,46, p-value 0,02), embora exibindo heterogeneidade inter-tumoral.

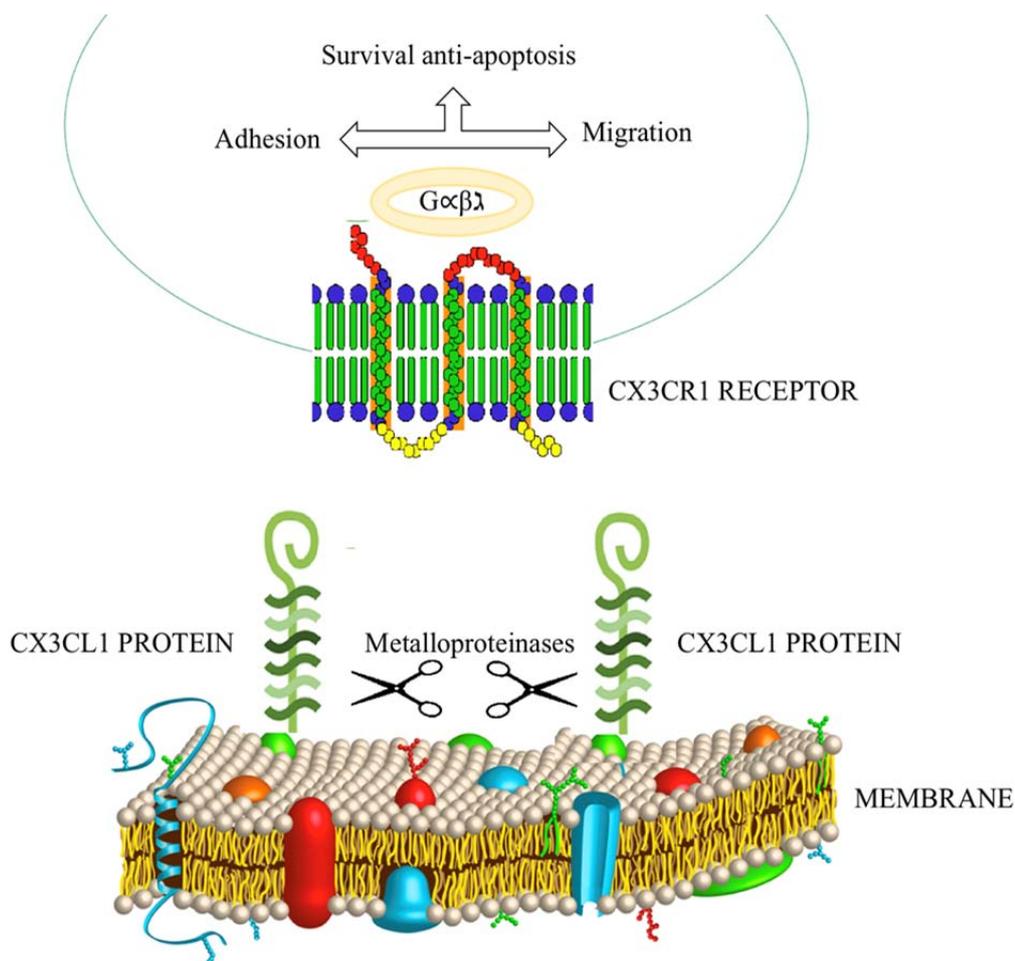


**Figura 30** - Nível de expressão do gene *CX3CL1* e características clínicas dos hepatoblastomas avaliados. O painel superior mostra o nível de expressão de *CX3CL1* de 19 amostras de hepatoblastomas, incluindo nove tumores com dados do exoma; os tumores foram classificados como alta expressão (verde) e baixa expressão (vermelho) com base na comparação com tecido hepático controle. Alta expressão foi considerada para amostras apresentando um valor RQ (valor absoluto) >2. Abaixo são indicadas as características clínicas de cada amostra de hepatoblastoma para a qual a expressão do gene *CX3CL1* foi avaliada



**Figura 31** - Dados de metilação do DNA de *CX3CLI* de hepatoblastoma (MASCHIETTO et al. 2016) e correlação com o padrão de expressão gênica. **A.** Diferença significativa de metilação foi observada no promotor do gene *CX3CLI* de hepatoblastomas em relação ao tecido hepático controle (p-adj 0,006). **B.** Correlação inversa entre a expressão gênica e o nível de DNAm foi detectada no corpo do gene *CX3CLI* (Spearman's rho 0.46, p-value 0.02)

A outra avaliação acerca da relevância funcional do gene *CX3CL1* em hepatoblastomas foi baseada em ensaio de imunohistoquímica, também para compreender relação entre essa proteína e seu receptor CX3CR1. A proteína CX3CL1 é sintetizada como uma molécula ligada à membrana, com o domínio quimiocinas se apresentado em uma haste semelhante à mucina (*Mucin Like*) (BAZAN J, BACON K, HARDIMAN G, WANG W, SOO K, ROSSI D, et al. 1997). Em condições de resposta inflamatória, a clivagem da CX3CL1 na superfície celular gera uma quimiocina solúvel, que se liga ao receptor CX3CR1 localizado na membrana de células próximas que, pela sinalização de alguns componentes da via, pode induzir adesão, sobrevivência das células e migração (**Figura 32**).



**Figura 32** - Função biológica da proteína Fractalquina (produzida pelo gene *CX3CL1*) e seu receptor *CX3CR1*. *CX3CL1* produz uma proteína considerada um fator quimiotático único existente tanto na forma solúvel, quanto na forma ligada à membrana. A parte da molécula ligada à membrana (região na qual está a mutação encontrada nesse estudo) faz a mediação da captura direta de leucócitos circulantes. Clivagem nesta região por uma metaloprotease gera uma quimiocina solúvel que funciona como um potente quimiotático das células-alvo. O receptor *CX3CR1* é um marcador bem estabelecido de monócitos anti-inflamatórios ou circulantes conhecidos por fornecerem sinal pró-sobrevivência para monócitos anti-inflamatórios, mas também está presente em células NK, células T e células musculares lisas, atuando em migração, adesão e proliferação.

Investigamos em 33 tumores a expressão das proteínas *CX3CR1* e *CX3CL1* para avaliar se a mutação detectada em *CX3CL1* também estaria associada a modificações ao nível proteico, tanto em quantidade quanto em localização proteica, além de averiguar a relação entre ligante e receptor *CX3CR1*.

O tecido controle indicado para aferir a eficiência dos dois anticorpos usados para detecção da proteína (pulmão) mostrou adequada marcação imunohistoquímica, com localização na membrana e no citoplasma; nas amostras hepáticas não-tumorais não foi observada marcação, como esperado, uma vez que esse tipo celular não expressa esses dois genes. A análise evidenciou positividade da fractalquina na maioria das amostras de hepatoblastomas investigadas (20/26), que apresentaram marcação citoplasmática ou nuclear em diferentes graus (**Quadro 5**). Os dois tumores com mutação no gene *CX3CL1* também exibiram marcação; HB32 mostrou marcação citoplasmática fraca e positividade nuclear em mais de 50% das células, enquanto que HB33 apresentou forte marcação citoplasmática e positividade nuclear em 25% das células (**Figura 33a1-c1**); em particular, HB33 exibiu grande heterogeneidade de histologia e marcação proteica. De maneira interessante, expressão da proteína do receptor CX3CR1 só foi detectada nestes dois tumores *CX3CL1*-mutados (**Figura 33a-c**); HB33 apresentou sinal citoplasmático e HB32, marcação citoplasmática e nuclear.

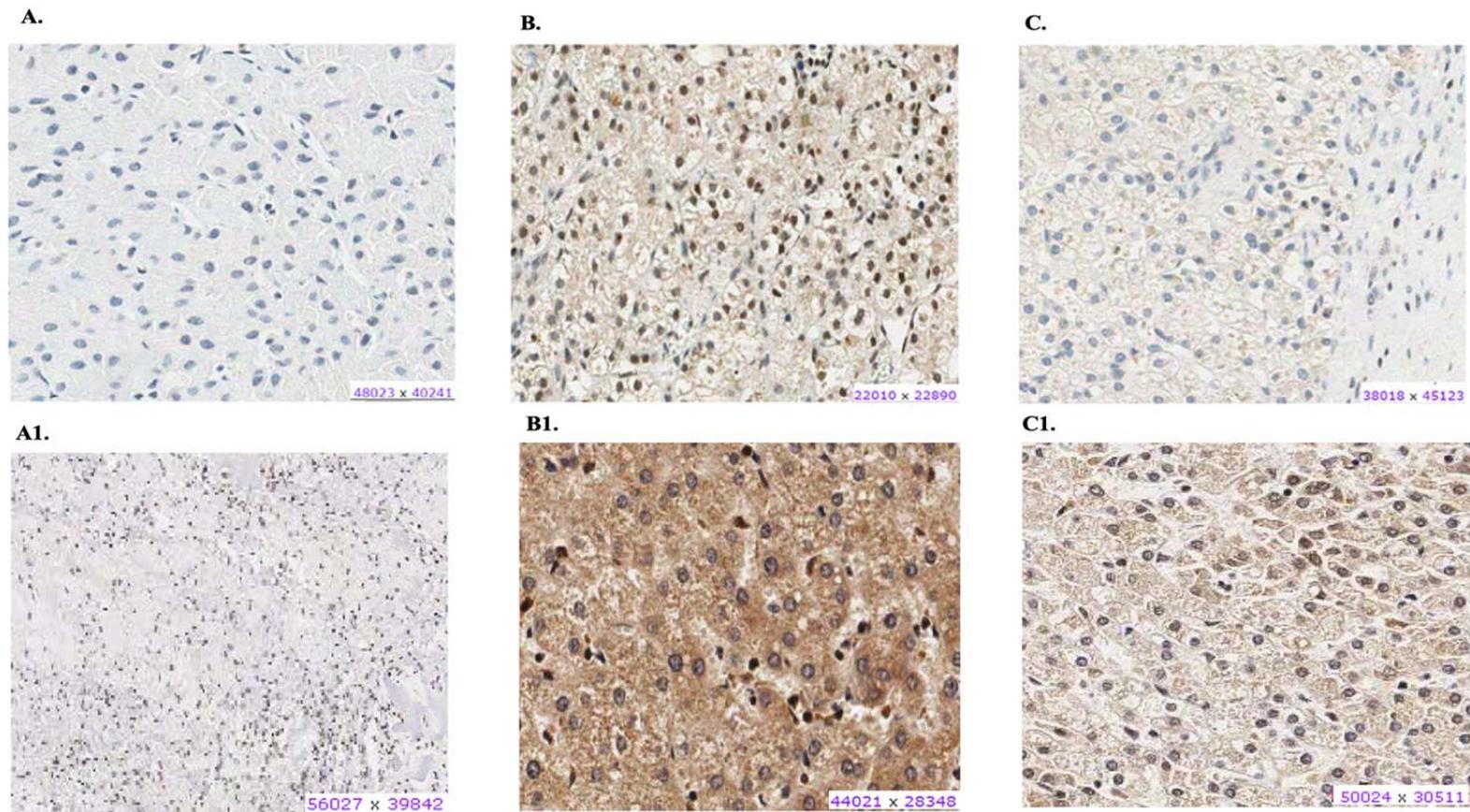
Um conjunto independente de oito hepatoblastomas e uma metástase pulmonar de hepatoblastoma também foram avaliados por imunohistoquímica no *Texas Children's Hospital* (doutorado-sanduíche) em uma análise mais detalhada e qualitativa; em concordância com nossos dados, o padrão de expressão indicou uma ativação da via *CX3CL1/CX3CR1*, com predomínio dessas proteínas no citoplasma das células tumorais (**Quadro 6**). Nas regiões inflamatórias dos hepatoblastomas, essas proteínas não foram detectadas nos linfócitos infiltrados, células nas quais deveriam estar expressas em condições normais, ao passo que houve marcação das células tumorais. Por outro lado, nas regiões de necrose tumoral, a marcação era negativa nas células tumorais, mas fortemente positiva nos linfócitos infiltrados, indicando atividade imunológica normal. A **Figura 34** ilustra esses achados.

**Quadro 5** - Avaliação por imunohistoquímica da expressão e localização celular das proteínas *CX3CL1* e *CX3CR1* em hepatoblastomas.

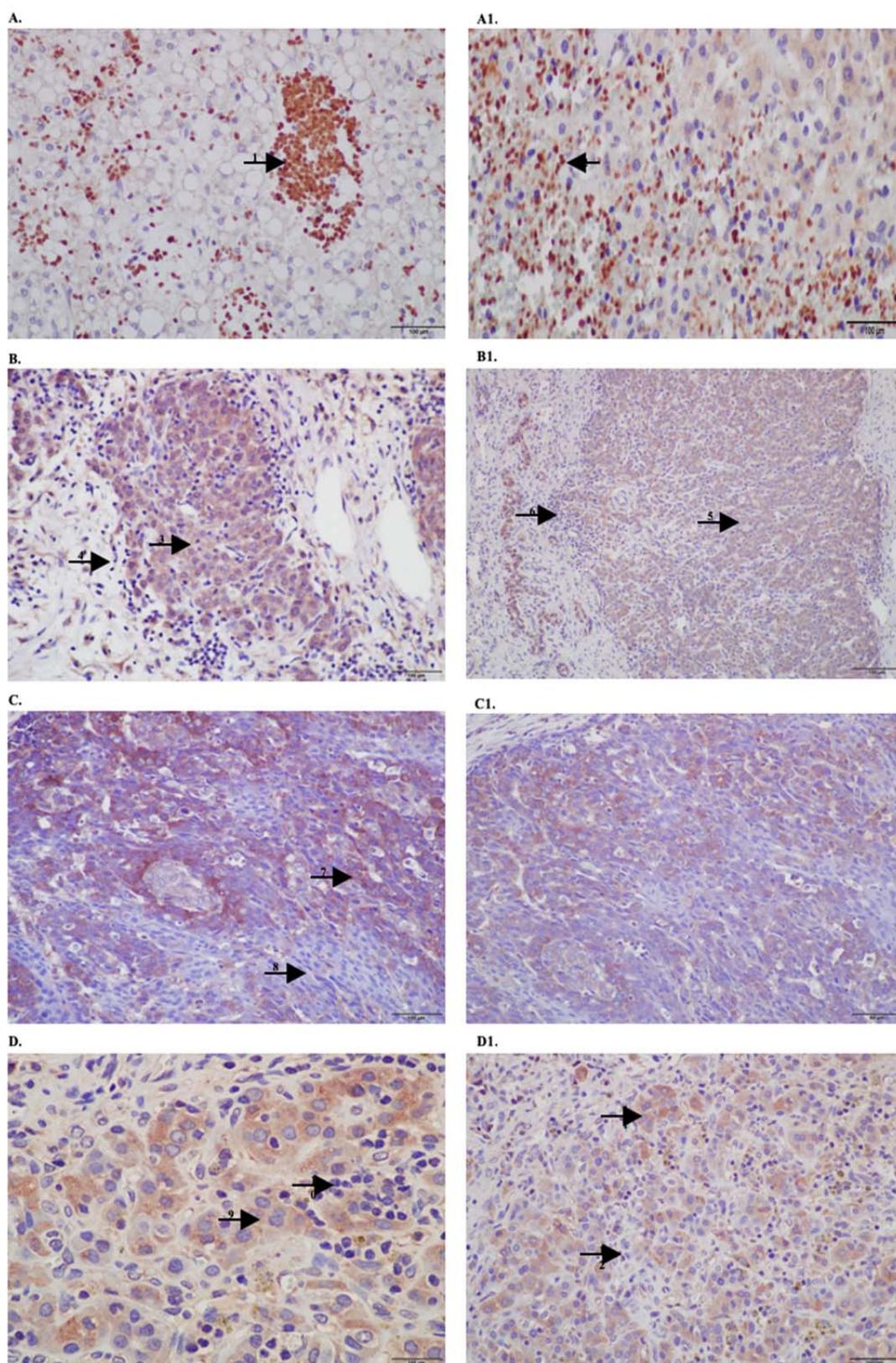
ID amostras	Nível de expressão da proteína CX3CL1		Nível de expressão da proteína CX3CR1
	<i>Citoplasma</i>	<i>Núcleo</i>	
Fígado normal -controle	Negativo	Negativo	Negativo
HB15	1	3	Negativo
HB16	1	2	Negativo
HB17	1	0	Negativo
HB18	1	2	Negativo
HB30	3	3	Negativo
HB31	2	2	Negativo
HB32	1	3	Positividade nuclear e citoplasmáticas (60% das células)
HB33	3	1	Positividade focal citoplasmática
HB46	3	4	Negativo
HB_TMA01	3	2	Negativo
HB_TMA02	3	1	Negativo
HB_TMA03	Negativo	Negativo	Negativo
HB_TMA04	Negativo	Negativo	Negativo
HB_TMA05	3	2	Negativo
HB_TMA06	Negativo	Negativo	Negativo
HB_TMA07	3	4	Negativo
HB_TMA08	2	0	Negativo
HB_TMA09	3	4	Negativo
HB_TMA10	Negativo	Negativo	Negativo
HB_TMA11	Negativo	Negativo	Negativo
HB_TMA12	Negativo	Negativo	Negativo
HB_TMA13	3	4	Negativo
HB_TMA14	2	2	Negativo
HB_TMA15	3	4	Negativo
HB_TMA16	3	4	Negativo
HB_TMA18	Negativo	Negativo	Negativo

**Quadro 6 - Avaliação por imunohistoquímica da expressão e localização celular das proteínas *CX3CL1* e *CX3CR1* em hepatoblastomas provenientes do TCH.**

ID	CX3CL1			CX3CR1		
	Tumor	Tecido normal	Área inflamação	Tumor	Tecido normal	Área inflamação
TCH360_tecido controle - pulmão		Positividade citoplasma	Linfócitos fortemente positivos, indicando condição normal de expressão no pulmão		Positivo núcleo e citoplasma	Linfócitos fortemente positivos, indicando condição normal de expressão no pulmão
TCH360_Metástase pulmonar	Positividade focal citoplasma		Linfócitos não expressando a proteína ao redor do tumor	Positividade nuclear focal		Linfócitos não expressando a proteína ao redor do tumor
TCH360_HB	Positividade focal citoplasma	Negativo	Amostra sem região inflamatória	Positividade focal citoplasma	Negativo	Amostra sem região inflamatória
TCH307	Positividade citoplasma	Positividade fraca	Amostra sem região inflamatória	Positividade fraca	Fortemente positivo	Amostra sem região inflamatória
TCH321	Positividade osteoblasto; Positividade forte em epitelial fetal	Negativo	Linfócitos não expressando a proteína	Fortemente positivo	Positividade focal	Linfócitos não expressando a proteína
TCH323	Positividade fraca citoplasma	Tecido normal não disponível	Amostra sem região inflamatória	Positividade fraca citoplasma	Tecido normal não disponível	Amostra sem região inflamatória
TCH324	Positividade focal citoplasma	Negativo	Linfócitos fortemente positivos em áreas de necrose tumoral	Positividade fraca	Strongly Positivity	Linfócitos fortemente positivos em áreas de necrose tumoral
TCH327	Positividade focal citoplasma/ Positividade focal núcleo	Negativo	Linfócitos não expressando a proteína	Positividade fraca citoplasma	Positividade focal citoplasma/ Bioductos positivos	Linfócitos não expressando a proteína
TCH353	Positividade fraca citoplasma	Negativo	Amostra sem região inflamatória	Positividade fraca	Positividade focal	Amostra sem região inflamatória
TCH361	Positividade osteoblasto	Tecido normal não disponível	Linfócitos fortemente positivos em áreas de necrose tumoral	Positividade fraca osteoblastoma	Tecido normal não disponível	Linfócitos fortemente positivos em áreas de necrose tumoral



**Figura 33** - Imunohistoquímica para avaliação proteica dos genes *CX3CL1* e *CX3CR1*: **A.** HB17N, negativo para marcação com *CX3CR1*; **A1.** HB17N negativo para *CX3CL1*. **B.** HB32T, positivo para marcação nuclear e citoplasmática de *CX3CR1*. **B1.** HB32, que mostra a positividade citoplasmática e 50 a 75% de células com positividade nuclear para *CX3CL1*. **C.** HB33T, positivo para a marcação citoplasmática de *CX3CR1*. **C1.** HB33T, que mostra grau 3 de positividade citoplasmática e 25% de células com positividade nuclear para *CX3CL1*.



**Figura 34** - Expressão protéica de *CX3CL1* e *CX3CR1* avaliada em hepatoblastomas e metástase pulmonar de hepatoblastoma por ensaio imunohistoquímico (TCH).

**Legenda Figura 34:** Os painéis A-D mostram dados de CX3CL1 e painéis A1-D1, CX3CR1. **A.** TCH361, forte positividade de CX3CL1 em linfócitos infiltrados (indicados pela seta 1) e **A1.** forte positividade de CX3CR1 em linfócitos infiltrados (indicados pela seta 2) em regiões necróticas do tumor; **B** e **B1** TCH327, positividade em células tumorais (indicada pelas setas 3 e 5) e linfócitos infiltrados negativos (indicados pelas setas 4 e 6) para ambas as proteínas. **C.** TCH321, positividade no componente osteoblástico e forte positividade no componente fetal (indicada pela seta 7); os linfócitos infiltrados são negativos (indicados pela seta 8); **C1.** Positividade em células tumorais e linfócitos negativos; **D.** e **D1.** TCH360, metástase pulmonar mostrando positividade em células tumorais (indicada pelas setas 9 e 11), sem expressão em linfócitos infiltrados (indicados pelas setas 10 e 12), para ambas as proteínas.

#### 4.2.5 Assinaturas mutacionais em hepatoblastomas

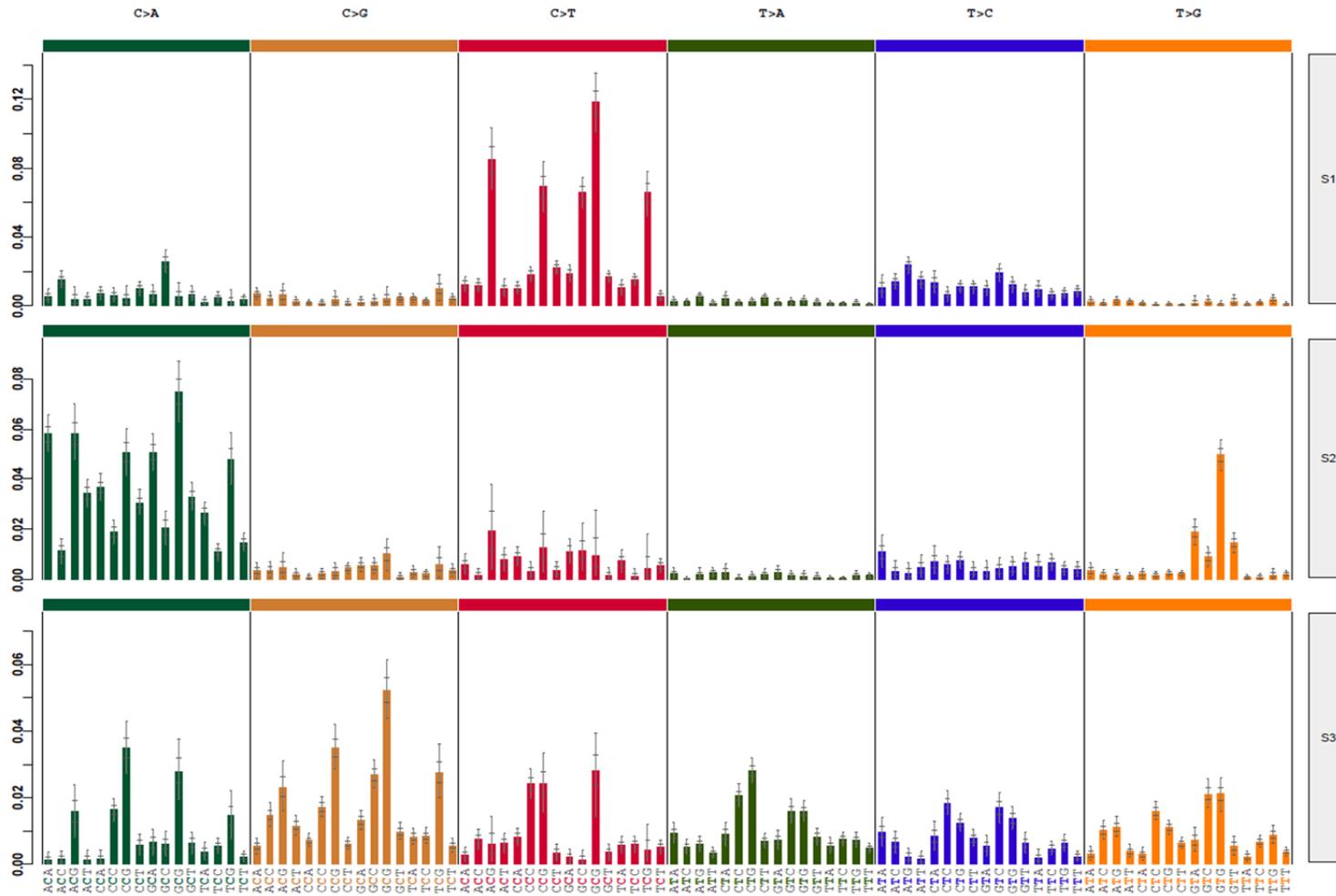
Diferentes processos mutacionais geram combinações únicas de tipos de mutações, denominadas assinaturas mutacionais. Nos últimos anos, análises em larga escala revelaram muitas assinaturas mutacionais em todo o espectro de cânceres humanos (NIK-ZAINAL 2012; ALEXANDROV et al. 2013a, b; HELLEDAY et al. 2014; ALEXANDROV e STRATTON 2014), compiladas no COSMIC. O conjunto atual de assinaturas mutacionais do COSMIC é baseado em uma análise de 10.952 exomas e 1.048 genomas completos em 40 tipos distintos de cânceres humanos. Essas análises são baseadas em dados gerados pelo Atlas do Genoma do Câncer (TCGA), pelo Consórcio Internacional do Genoma do Câncer (ICGC) e por um amplo conjunto de dados de mutações somáticas em câncer disponíveis, publicados em periódicos científicos. O perfil de cada assinatura é exibido usando os seis subtipos possíveis de substituição: C>A, C>G, C>T, T>A, T>C e T>G (todas as substituições são referidas pelas pirimidinas nos pares de bases). Cada uma das substituições é examinada incorporando informação acerca dos nucleotídeos a 5' e 3' do nucleotídeo mutado, gerando assim 96 possibilidades de tipos de mutações (Matrix 96X) (6 tipos de substituição X 4 tipos de nucleotídeo a 5' X 4 tipos de nucleotídeo a 3'). As assinaturas mutacionais são apresentadas e reportadas com base na frequência de trinucleotídeos observada no genoma humano de referência GRCh37.

Na análise aqui realizada com base em ROSALES et al. (2017), utilizando as mutações somáticas de 10 hepatoblastomas, três assinaturas foram detectadas (HB-S1, HB-S2 e HB-S3), duas delas (HB-S1 e HB-S2) apresentando grande

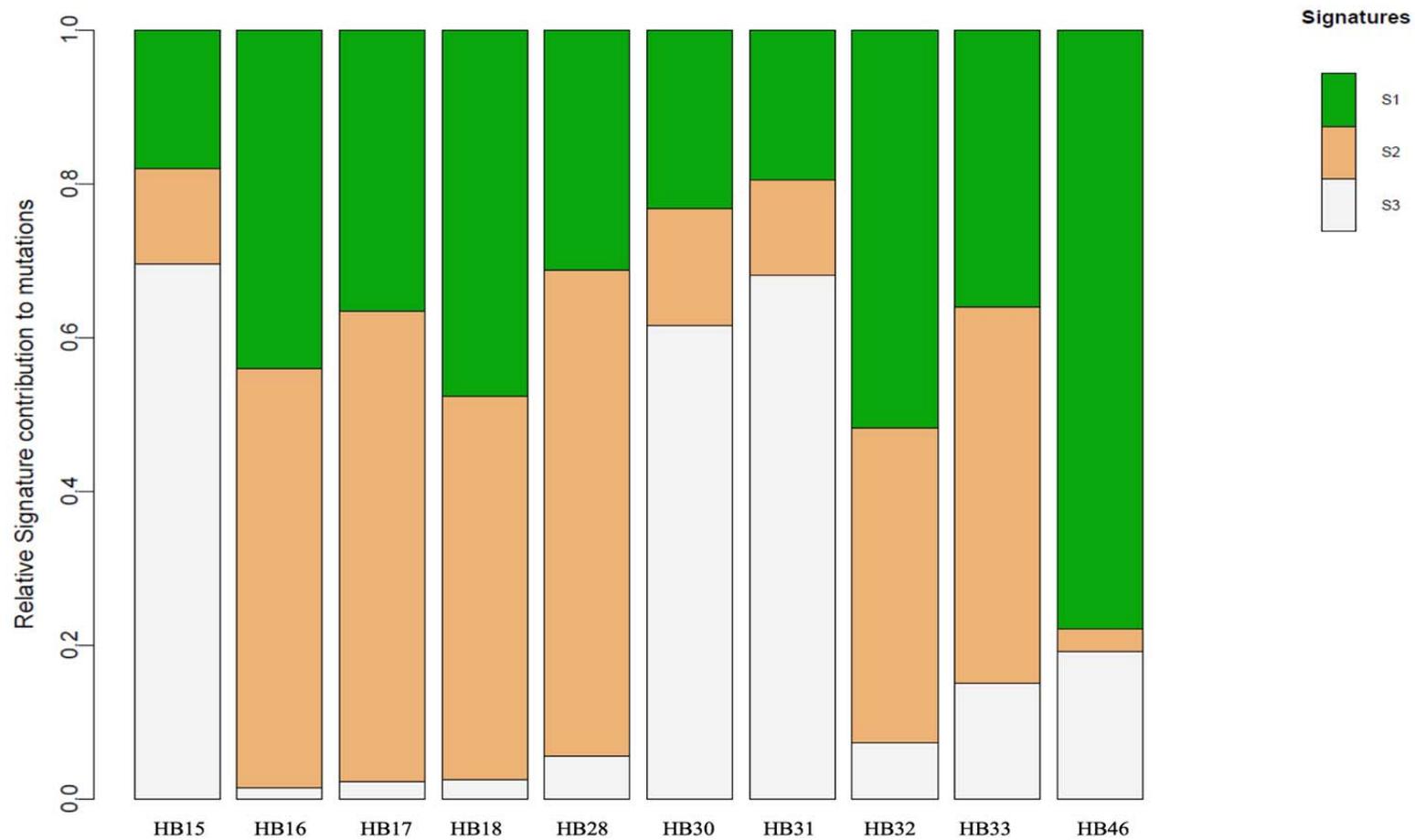
sobreposição com assinaturas mutacionais relatadas no COSMIC. O perfil de cada assinatura é exibido na **Figura 35** usando os seis subtipos de substituição acima descritos. HB-S1 apresentou maior similaridade com as assinaturas COSMIC 1 e 6, ao passo que HB-S2 apresentou características da assinatura COSMIC 29.

A assinatura HB-S3 não apresentou semelhança clara com qualquer assinatura conhecida, apresentando um padrão inespecífico com pequeno aumento de C>G. A única assinatura COSMIC na qual ocorre predomínio de C>G é a assinatura 13, embora seja num contexto diferente de trinucleotídeos. A assinatura 13 foi encontrada em 22 tipos de câncer e parece ser mais comum em câncer de colo de útero e bexiga. Na maioria destes 22 tipos, a assinatura 13 está presente em pelo menos 10% das amostras; a atividade desta assinatura 13 foi atribuída à família APOBEC. A assinatura COSMIC 2 é normalmente encontrada nas mesmas amostras que a 13. Um polimorfismo de deleção germinativa envolvendo *APOBEC3A* e *APOBEC3B* está associado à presença de um grande número de mutações nas assinaturas 2 e 13 e com predisposição ao câncer de mama.

A contribuição relativa dessas três assinaturas mutacionais em cada amostra de hepatoblastoma pode ser visualizada na **Figura 36**. Podemos salientar que a maioria do grupo (seis tumores) apresenta uma composição relativamente equivalente das assinaturas HB-S1 e HB-S2; entretanto, o tumor HB46 tem predomínio da assinatura HB-S1. Em três tumores (HB15, HB30 e HB31) a contribuição da nova assinatura HB-S3 foi majoritária.



**Figura 35** - Três diferentes assinaturas mutacionais foram identificadas nos hepatoblastomas. Dados de mutações somáticas derivadas de análise de exomas de hepatoblastomas e tecidos normais pareados foram usados para detectar assinaturas mutacionais específicas (ROSALES et al. 2017). O perfil de cada assinatura é exibido usando os seis subtipos de substituição (C>A, C>G, C>T, T>A, T>C e T>G).



**Figura 36** - Contribuição relativa de cada uma das três assinaturas HB para o perfil mutacional de cada um dos hepatoblastomas.

## **CAPÍTULO 3**

**Investigação de mutações germinativas de predisposição a câncer e/ou  
anomalias congênitas em pacientes com hepatoblastomas.**

#### 4.3.1 Associação entre predisposição genética a câncer na infância e sinais/anomalias congênitas

Os dados atuais sugerem que até 10% das crianças com câncer seriam portadoras de mutações germinativas em genes conhecidos de predisposição a câncer (BOMBARD et al. 2012; BRODEUR et al. 2017). No entanto, quando se considera uma definição de predisposição a câncer mais ampla, incluindo história familiar, comorbidades e tipos de câncer pediátrico, cerca de um terço das crianças com câncer pode ter uma predisposição genética (ZHANG et al. 2015). Muitas síndromes de predisposição a câncer pediátrico estão associadas a defeitos do desenvolvimento normal e muitos cânceres pediátricos surgem de tipos celulares imaturos (por exemplo, os "blastomas"). Assim, identificar e compreender as conexões entre o desenvolvimento fetal ou infantil anormal e o risco de desenvolver câncer na infância tem implicações para a vigilância, o prognóstico, a estratificação de risco e potenciais terapias personalizadas.

Como já mencionado na Introdução, hepatoblastomas e tumores de Wilms em especial estão associados a vários mecanismos de predisposição a câncer, em especial a síndromes de crescimento aumentado e defeitos de *imprinting*.

Com o objetivo de investigar variantes germinativas que pudessem estar associadas à predisposição a câncer e/ou às anomalias congênitas dos pacientes aqui estudados, o projeto se tornou prospectivo e as famílias foram convidadas a participar de estudo de mutações germinativas. Essa parte do estudo está incluída em um projeto maior de nosso grupo, que visa explorar o espectro de mutações germinativas de pacientes brasileiros com tumores pediátricos, associados ou não a anomalias congênitas e/ou deficiência intelectual ou atraso cognitivo. O primeiro trabalho deste estudo, iniciado recentemente, foi aceito para publicação este ano (AGUIAR et al. 2018 – **Anexo 2**), não relacionado a hepatoblastoma.

Do grupo de pacientes com hepatoblastomas, foram realizados até o momento os experimentos de microarranjo genômico e sequenciamento de exoma de cinco pacientes e de seus genitores (HB33 e mãe; HB46 e genitores; HB64 e mãe; HB65 e pai; HB72 e genitores), todos apresentando alguma condição clínica congênita além do desenvolvimento de hepatoblastoma. Nem todos os dados estão com a análise concluída.

### 4.3.2 Hepatoblastoma congênito

Em nossa casuística, tivemos três casos de hepatoblastomas congênitos, dos quais foram obtidas informações para prosseguimento do estudo de dois deles, HB66 e HB33, ambos com sinais clínicos adicionais.

A apresentação de tumores no período neonatal é muito rara; em hepatoblastomas, há pouquíssimos relatos de diagnóstico neonatal ou pré-natal de hepatoblastoma (LAI et al. 2013). Pode ser considerada uma entidade clínica distinta, com apresentação clínica antes de 3 meses de idade e descrita como biologicamente mais agressivo, com maior risco de metástase e pior prognóstico (AMMANN et al. 1999; ERGIN et al. 2008; HUANG et al. 2011).

Entretanto, trabalhos mais recentes de revisão indicam que com o refinamento no diagnóstico e tratamento ao longo dos anos, atualmente o hepatoblastoma congênito não parece conferir pior prognóstico (TROBAUGH-LOTRARIO et al. 2013), reforçando o desfecho clínico positivo de pelo menos um dos casos aqui descritos (HB33). Cerca de 2/3 dos casos de hepatoblastoma congênito já descritos se originam no lobo direito do fígado, incluindo o da paciente aqui relatada, e acredita-se que a concentração baixa de oxigênio da veia porta poderia afetar especialmente a diferenciação embrionária do lobo direito, uma vez que o lobo esquerdo recebe sangue da veia umbilical, rico em oxigênio. O trabalho de TROBAUGH-LOTRARIO et al. (2013) revisou 52 casos de hepatoblastomas congênitos: 11 apresentavam sinais clínicos adicionais, sendo cinco pacientes com síndrome de Beckwith-Wiedeman, três com sialoblastoma, um com craniofaringioma, um diagnosticado com polipose adenomatosa familiar e um último com esquizencefalia; a maioria desses tumores apresentava histologia fetal.

A paciente HB33 apresentava o tumor mais heterogêneo da casuística, com alta taxa de carga mutacional somática. Como apresentação clínica, houve o diagnóstico do hepatoblastoma considerado congênito (diagnóstico com um mês) e de agenesia renal unilateral. Foram coletadas amostras de sangue periférico para obtenção de DNA da paciente e de sua mãe (pai indisponível, sem contato com a família). Não foram detectadas alterações cromossômicas de número de cópias no exame de microarranjo genômico (plataforma 180K, Agilent).

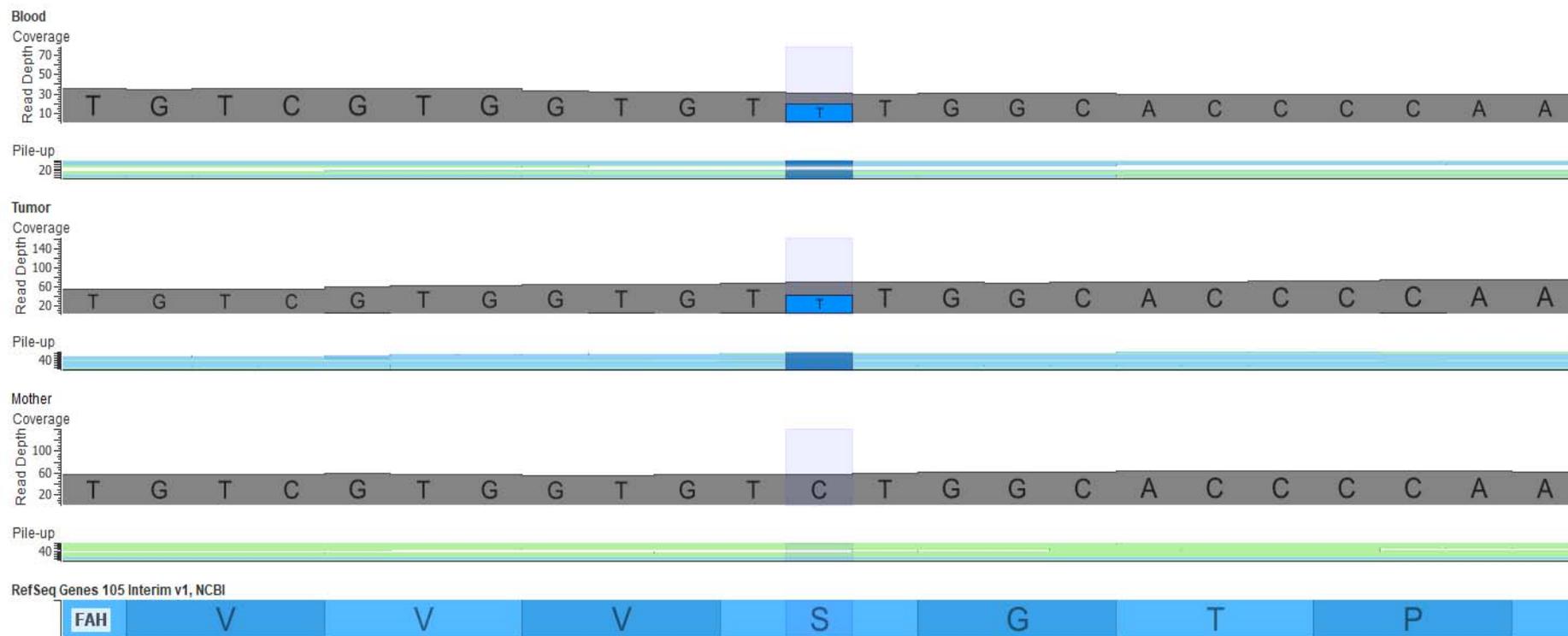
Na análise de exoma, foram identificadas na paciente 144 variantes germinativas raras (frequência populacional máxima  $< 0,003$ ) não-sinônimas que estavam ausentes de sua mãe. Esse alto número de variantes dificulta a identificação de uma mutação principal que possa ser considerada patogênica para o fenótipo, especialmente se não houver a detecção de uma mutação já descrita. Por este motivo, no contexto de diagnóstico e em especial para pesquisa de doenças de desenvolvimento (pediátricas), há indicação de realização de análise de exomas de trios (paciente e genitores) para aumento da taxa de diagnóstico molecular; entretanto, essa abordagem de análise de trios nem sempre é possível, não apenas pelo custo alto do exoma, mas também porque não é incomum a falta de contato da família com o pai do paciente. Dentre as variantes 16 estavam descritas nos databases ICGC ou COSMIC em algum tipo de tumor como mutação somática, sendo que em *HOXC4*, *OR51V1* e *ZBTB44* as variantes foram identificadas em tumores hepáticos (ICGC). Doze variantes germinativas eram LoF (*AARSD1*, *ACSM3*, *ERI2*, *CECR2*, *CRYGA*, *DNAH7*, *ETV4*, *HOXC4*, *MAMDC4*, *NEBL*, *PRSS56* e *TBXAS1*), destacando-se a perda de um stop códon em *HOXC4*, não relatado em nenhum banco de dados, incluindo de população brasileira (ABRaOM), além de uma indel no gene *PRSS56* (ClinVar 31077), ambas as variantes já relatadas em amostras de câncer de fígado (ICGC). Além disso, a paciente carrega seis variantes do tipo *missense* que avaliadas como deletérias para a função da proteína usando seis algoritmos diferentes; dentre estas variantes, uma afeta o gene *BRCA1* e duas outras, que não estão documentadas em nenhum banco de dados, nos genes *GOLGA5* e *FAH* (esta última variante na **Figura 37**). A **Tabela 13** apresenta detalhes dessas 18 variantes (12 LoF e 6 *missense*). *HOXC4* está envolvido com a função hepática, bem como *PRSS56* e *CYP11A1*. Como mencionado no Capítulo 2, o gene *CYP11A1* está diretamente relacionado com *AHRR*, que no tumor apresentou perda de metilação e a mutação somática c.869G> C; não existe na literatura embasamento que comprove a interação da variante germinativa no gene *CYP11A1* com as mutações somáticas de *AHRR*, sendo assim uma hipótese a ser explorada em estudos futuros. Em resumo, a paciente apresentou duas variantes que classificamos como provavelmente patogênicas, afetando os genes *BRCA1* e *FAH*, ambos associados à predisposição a câncer (RAHMAN et al. 2014), embora o significado

clínico em crianças da detecção de mutações germinativas em heterozigose no gene *BRCA1* ainda seja debatido. Em particular, o gene *FAH* codifica a enzima *fumarylacetoacetate hydrolase* que é principalmente abundante no fígado e em rins (VILLANUEVA et al. 2010); mutações germinativas neste gene aumentam o risco de carcinoma hepatocelular (ARRANZ et al. 2002), embora apenas em um modo recessivo de herança. Dessa forma, essas duas variantes em genes de predisposição câncer permanecem como candidatas para o fenótipo da paciente, embora não possamos descartar a contribuição das outras acima descritas.

**Tabela 13** - Variantes germinativas raras de HB33 de perda de função (LoF) ou troca de aminoácido (missense; classificadas como provavelmente patogênicas por seis diferentes algoritmos), não detectadas na mãe

Gene	Chr:Pos	Identificador	FV	RD	Tipo	Análise <i>in silico</i>	HGVS c.	HGVS p.	IK	gnomAD
<i>BRCA2</i>	13:32912346	rs80359407	54	11	disruptive_inframe_deletion		NM_000059:c.3854_3856delAAA	p.Lys1286del	0.00159744	0.000736856
<i>PRRC2B</i>	9:134350213		47	66	disruptive_inframe_deletion		NM_013318:c.2697_2699delCTC	p.Ser901del	0.00139776	3.73649e-05
<i>ACSM3,ERI2</i>	16:20801994		77	108	frameshift_variant		NM_005622:c.1310delT	p.Phe438Leufs		2.43805e-05
<i>MAMDC4</i>	9:139751364		40	33	frameshift_variant		NM_206920:c.1842_1843insT	p.Val616Cysfs		0.000123172
<i>PRSS56</i>	2:233388528		46	58	frameshift_variant		NM_001195129:c.1058_1059insC	p.Gln356Profs		0.00039972
<i>TBXAS1</i>	7:139655264		53	45	frameshift_variant		NM_001130966:c.549delC	p.Cys184Alafs		
<i>VSX2</i>	14:74727595		42	85	frameshift_variant		NM_182894:c.1059delT	p.Pro354Hisfs		1.2279e-05
<i>AARSD1</i>	17:41116170	rs151255124	44	29	stop_gained		NM_001261434:c.124C>T	p.Gln42*	0.00139776	0.000393896
<i>CECR2</i>	22:18029251	rs142851999	48	27	stop_gained		NM_031413:c.4210C>T	p.?	0.000998403	0.00123203
<i>CRYGA</i>	2:209025758	rs116344874	48	25	stop_gained		NM_014617:c.295C>T	p.Arg99*	0.00359425	0.00331867
<i>DNAH7</i>	2:196602786	rs80112322	39	23	stop_gained		NM_018897:c.11934T>A	p.Tyr3978*	0.00159744	0.00228923
<i>ETV4</i>	17:41622970	rs75202146	52	42	stop_gained		NM_001261438:c.-57-235A>T	p.Lys6*	0.00119808	0.00025227
<i>HOXC4</i>	12:54448840		38	34	stop_gained		NM_014620:c.646C>T	p.Arg216*		
<i>NEBL</i>	10:21177128	rs147622517	45	22	stop_gained		NM_006393:c.267C>G	p.Tyr89*	0.000599042	0.00125265
<i>ABCC10</i>	6:43400685	rs140348023	39	28	missense_variant	6 em 6	NM_001198934:c.967G>A	p.Gly323Ser	0.00139776	0.000296596
<b><i>BRCA1</i></b>	<b>17:41249297</b>	<b>rs55688530</b>	<b>46</b>	<b>96</b>	<b>missense_variant</b>	<b>6 em 6</b>	<b>NM_007298:c.557C&gt;A</b>	<b>p.Ser186Tyr</b>	<b>0.00299521</b>	<b>0.000650153</b>
<b><i>FAH</i></b>	<b>15:80460444</b>		<b>63</b>	<b>30</b>	<b>missense_variant</b>	<b>6 em 6</b>	<b>NM_000137:c.506C&gt;T</b>	<b>p.Ser169Phe</b>		
<i>GOLGA5</i>	14:93303771		37	62	missense_variant	6 em 6	NM_005113:c.2092C>G	p.Arg698Gly		
<i>SNTA1</i>	20:31996347		45	124	missense_variant	6 em 6	NM_003098:c.1484C>T	p.Ser495Leu		4.06134e-06
<i>WDSUB1</i>	2:160112772	rs138625384	52	27	missense_variant	6 em 6	NM_152528:c.1067A>G	p.Asn356Ser		2.46633e-05

**Legenda:** FV: Frequência da variante; RD: *read depth*; análise *in silico* analysis corresponde ao número de algoritmos de predição nos quais a variante foi dada como patogênica.



**Figura 37** - Variante germinativa em heterozigose no gene *FAH*, classificada como provavelmente patogênica. Imagens de arquivo BAM mostrando a variante germinativa C>T (azul) detectada no éxon 6 do gene *FAH*, presente em heterozigose no sangue e no tumor da paciente, não presente na mãe clinicamente normal. Esta variante missense (p. Ser169Phe) é predita como patogênica por ferramentas in silico e não foi relatada anteriormente em nenhum banco de dados populacional consultado.

No segundo caso de hepatoblastoma considerado congênito (HB72), o paciente, do sexo masculino, foi diagnosticado aos cinco meses com um tumor de risco intermediário, mas a mãe relatou que desde o nascimento foi observado um aumento abdominal. Este paciente encontra-se em acompanhamento pós-tratamento. Identificamos por análise de microarranjo cromossômico em amostra de sangue periférico que este paciente é portador de microdeleção 15q11.2 (ISCN 2016 arr[GRCh37] 15q11.2(22,765,628\_23,146,132)x1), de herança paterna. Essa deleção está mapeada em segmento de aproximadamente 380 kb do braço longo do cromossomo 15 (15q11.2) que contém quatro genes contíguos, entre eles *NIPAI*; está sobreposto à síndrome de deleção cromossômica 15q11.2 (OMIM #615656), que confere susceptibilidade a atraso de desenvolvimento, distúrbios do neurodesenvolvimento e psiquiátricos (COOPER et al. 2011), com penetrância incompleta e expressividade variável. Ocasionalmente são descritos pacientes com essa microdeleção 15q11.2 que também apresentam anomalias congênitas, mas nenhum padrão consistente foi ainda identificado. Adicionalmente, não há referência a aumento de predisposição a câncer na síndrome de deleção cromossômica 15q11.2; entretanto, é importante mencionar que se trata do segundo caso de nosso grupo de pacientes com tumores pediátricos que é portador dessa microdeleção germinativa 15q11.2 (Aguiar et al. 2018, **Anexo 2**). O exoma desse paciente e seus genitores será ainda analisado.

#### 4.3.3 Paciente sindrômico HB46

Como descrito no **Capítulo 1**, o paciente HB46 nasceu prematuro (27 semanas), com 945g com grande histórico de complicações no pós-natal. No contato com a família, foi observado que o paciente apresentava atraso de desenvolvimento e anomalias craniofaciais e por estes motivos foi encaminhado para avaliação pela geneticista clínica Dra. Débora R. Bertola, no Centro de Estudos sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo). Segue relatório da avaliação.

A mãe referiu fechamento da fontanela com ~8 meses. Não há história de malformações associadas. Por conta do hepatoblastoma, o paciente havia realizado ecocardiograma, USG de abdome e avaliação oftalmológica, todos normais. Ele

apresentava atraso do desenvolvimento neuropsicomotor: andou com dois anos e iniciou fala desarticulada com um ano; faz acompanhamento com fonoaudiologista. O exame físico realizado aos 3 anos e 8 meses evidenciou: peso 13.800g (percentil 5), altura 94cm (percentil 5), perímetro cefálico 46cm (percentil <2); crânio de aspecto turricefálico, com cristas supraorbitárias hipoplásicas, exoftalmia, palato alto, com mordida aberta e fosseta pré-auricular à direita; pescoço curto; testículos tópicos; membros proporcionais, sem restrições articulares; pregas plantares profundas e presença de uma mancha cutânea café com leite em região glútea. Pela anomalia craniofacial presente, foi solicitada uma tomografia computadorizada de crânio com reconstrução 3D, que evidenciou fechamento precoce de diversas suturas cranianas (craniossinostose complexa).

Na literatura (BAYNAM et al. 2010), há uma única descrição de um paciente com craniossinostose decorrente de uma variante em *FGFR3* associada a defeito de lateralidade e hepatoblastoma.

A craniossinostose está associada a mais de 180 síndromes, muitas das quais apresentam anormalidades nos membros, além do crescimento cranial restrito (revisão em DURHAM et al. 2017). As síndromes mais comumente identificadas incluem aquelas resultantes de mutações nos genes *FGFR* e *TWIST*. A craniossinostose sindrômica pode ser associada ao fechamento de múltiplas suturas (por exemplo, síndrome de Apert, síndrome de Pfeiffer, síndrome de Crouzon, síndrome de Antley-Bixler) ou fusão de sutura única (por exemplo, síndrome de Saethre-Chotzen, síndrome de Muenke) (JOHNSON et al. 2011; LEVI et al. 2012). Do ponto de vista clínico, embora os casos não sindrômicos sejam frequentemente menos graves, os protocolos clínicos são semelhantes. A intervenção neurocirúrgica ainda é indicada em casos de craniossinostose não sindrômica, apenas as estratégias para aconselhamento genético diferem.

Além dos fatores genéticos associados à craniossinostose, alguns fatores ambientais foram estudados e que se assemelham àqueles relacionados com hepatoblastoma. Essas exposições incluem distúrbios maternos da tireoide (RASMUSSEN et al. 2007; CARMICHAEL et al. 2015), tabagismo (CARMICHAEL et al. 2008; HACKSHAW et al. 2011; HOYT et al. 2016), uso de álcool (ZEIGER et al. 2002; RICHARDSON et al. 2011) e uso materno de drogas

anti-depressão (ALWAN et al. 2007; REEFHUIS et al. 2015), embora tais exposições não estejam conclusivamente definidas como causa. É possível que esses teratógenos e outros sejam suficientes para causar craniossinostose. No entanto, também existem polimorfismos genéticos contribuindo para uma etiologia mais complexa da craniossinostose. Fatores genéticos (por exemplo, mutações *FGFR*), fatores ambientais (exposições a teratógenos) e interações gene/ambiente foram todos identificados como causadores de craniossinostose.

Foram coletadas amostras de sangue periférico para obtenção de DNA do paciente e de seus genitores. O estudo de alterações cromossômicas de número de cópias foi realizado por microarranjo genômico (plataforma 180K, Agilent); não foram detectadas alterações que não fossem benignas. Na análise do exoma não foram detectadas mutações reconhecidamente patogênicas nos genes associados a fenótipos mendelianos de craniossinostose. Entretanto, a análise de exoma não foi concluída.

#### **4.3.4 Doença de Hirschprung e Hepatoblastoma**

Há um único relato de caso de paciente com doença de Hirschprung e hepatoblastoma (PINTO et al. 2016), feito no Brasil. A doença de Hirschprung envolve a ausência de células nervosas nos músculos de uma parte ou da totalidade do intestino grosso (cólon) (revisão em HARICHARAN 2008). O principal sintoma é a incapacidade do recém-nascido de evacuar dentro de 48 horas após o nascimento. A doença de Hirschprung é uma condição clínica rara congênita que afeta em média cerca de 1 a cada 5000 recém-nascidos (HSCR; OMIM #142623). A maioria dos casos são esporádicos e ocorrem como uma característica clínica isolada (cerca de 70%), enquanto uma parcela menor apresenta outras anomalias congênitas associadas. Esta condição clínica é poligênica, apresentando extensa heterogeneidade genética. Até o momento, no mínimo 16 genes são reconhecidamente associados à doença quando mutados constitutivamente: *RET*, *GDNF*, *NTN*, *GFRA1*, *NRTN*, *EDNRB*, *EDN3*, *ZEB2 (ZFHX1B)*, *PHOX2B*, *SOX10*, *SHH*, *ECE1*, *DHCR7*, *SIP1*, *LICAM*, *KIF1BP* (revisão em SERGI et al. 2017 e HEUCKEROTH et al. 2018).

Os testes genéticos comumente realizados nos pacientes afetados pela doença de Hirschprung identificam uma causa genética inequívoca em até 50% dos casos;

portanto, grande parte dos pacientes permanece sem diagnóstico molecular definido. Crianças que não possuem variantes genéticas em genes conhecidos de predisposição provavelmente tem uma combinação de alelos de risco de baixa penetrância e influência de fatores ambientais durante o desenvolvimento embrionário.

Na nossa casuística, dois pacientes apresentaram essa condição associada ao hepatoblastoma, HB64 e HB65, sendo que o paciente HB65 refere-se ao relato de caso publicado descrito acima.

A mãe da paciente 64 não relatou intercorrência durante o pré-natal e a gestação foi descoberta após a vigésima semana. A criança nasceu por cesárea, a termo, de pais não consanguíneos, com dois irmãos com fenótipo normal. Foi detectado abdômen volumoso e não evacuação nas primeiras 24h, evoluindo com infecções de vias aéreas. O hepatoblastoma foi diagnosticado aos quatro anos, do subtipo Epitelial com predomínio de células embrionárias, PRETEXT IV. A paciente foi submetida ao protocolo quimioterápico SIOPEL6, mas não evoluiu bem e veio à óbito antes do procedimento cirúrgico. À avaliação clínica aos 5 anos de idade, a paciente apresentava atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, dismorfismos faciais (sobrancelhas esparsas, hipertelorismo, orelhas em abano, filtro nasal longo, lábio inferior grosso, palato ogival), displasia de unhas (hipoplásicas) e clinodactilia de 5º dígito à direita.

O outro paciente identificado com doença de Hirschprung e hepatoblastoma foi HB65, irmão mais novo de uma irmandade com três. Sua irmã é portadora de catarata congênita, ao passo que o irmão apresentou atresia intestinal – íleo terminal. O paciente HB65 apresenta um quadro sindrômico, composto por atresia ileal congênita, catarata congênita bilateral e surdez neurosensorial. Além disso, o paciente nasceu prematuro (28 semanas), pois a mãe estava em uma gestação de risco e foi à óbito durante o parto por insuficiência cardíaca congestiva. Ao nascimento, o paciente foi submetido à ventilação mecânica e ficou internado na UTI por encefalomalácia periventricular, hemorragia intracraniana grau II à direita, crises convulsivas e sepse. O tumor hepatoblastoma foi diagnosticado com um ano, PRETEXT II, subtipo Epitelial Fetal; o paciente foi submetido ao protocolo quimioterápico com cisplatina, doxorubicina e ifosfamida, seguido de hepatectomia

parcial. O paciente está em acompanhamento pós-tratamento. Provavelmente, há uma condição monogênica segregando nessa família, com expressividade variável e possivelmente recessiva; infelizmente, cada um dos irmãos dessa família é criado por uma pessoa diferente da família e não obtivemos contato com outros familiares para participação no projeto e coleta de material dos irmãos do probando para estudo de mutações germinativas.

Foram coletadas amostras de sangue periférico dos pacientes e mãe (HB64) e pai (HB65). Foram realizados os testes de microarranjo genômico e exoma. Alterações genômicas de número de cópias consideradas patogênicas ou provavelmente patogênicas não foram detectadas nestes pacientes. Os exomas de ambas as famílias estão em análise; mutações comprovadamente patogênicas nos genes previamente citados como causa da doença de Hirschprung não foram detectadas. Também serão futuramente analisados os exomas das amostras de DNA dos hepatoblastomas destes pacientes, extraídas de bloco parafinado.

---

*CONSIDERAÇÕES  
GERAIS*

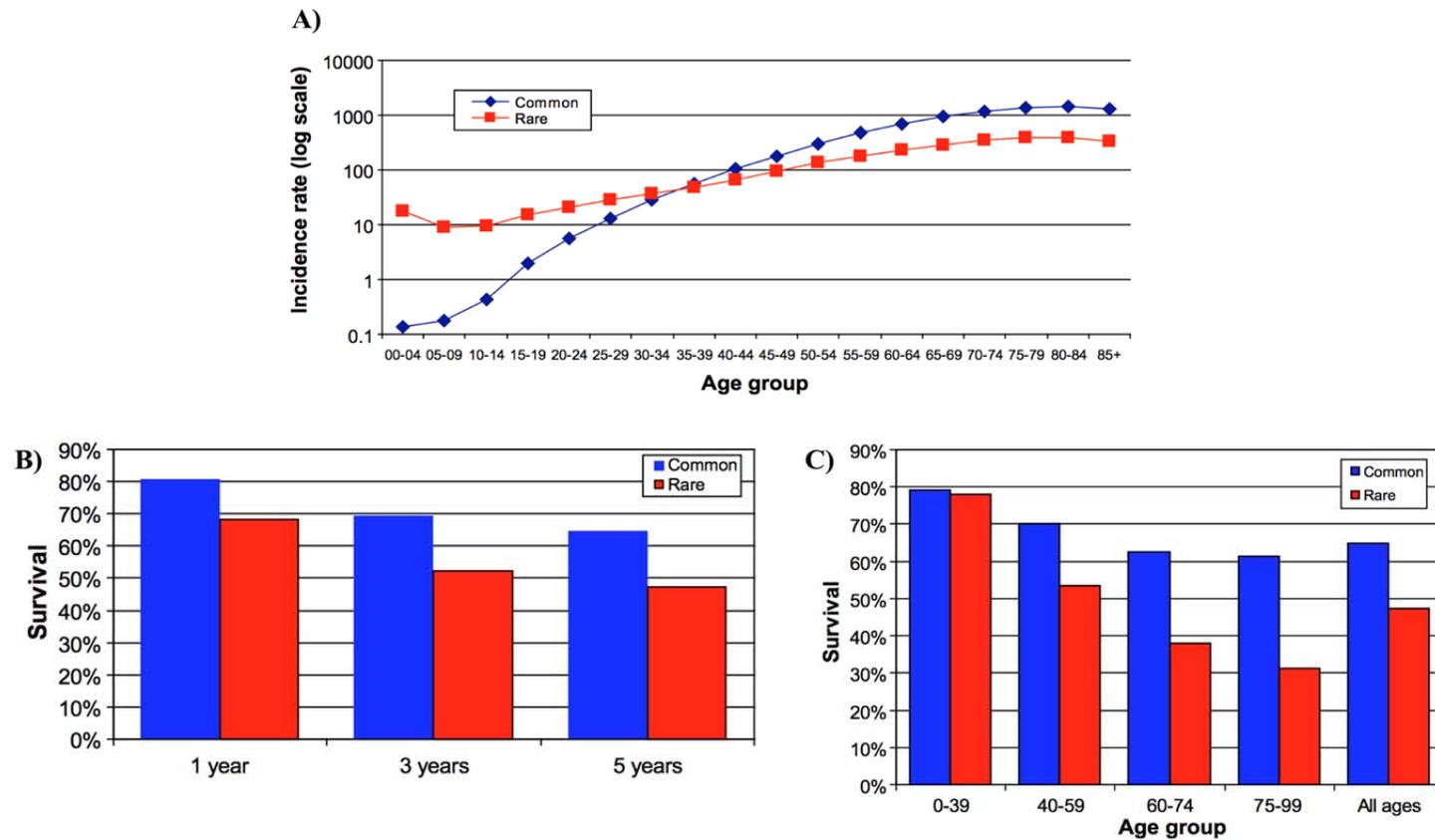
---

## 5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os estudos moleculares em hepatoblastoma buscam a identificação de subtipos histológicos e/ou biológicos clinicamente relevantes para incorporação em sistemas de estratificação de risco, em geral desenvolvidos com a integração de diversos centros. Essa integração é necessária para desenvolver classificações de patologias de consenso, assim como para incorporar progressivamente novos biomarcadores genéticos e moleculares em protocolos terapêuticos de tumores hepáticos pediátricos.

Nosso projeto visou adicionar novos dados genômicos a este cenário de estudo de hepatoblastomas, mediante a identificação de novas variantes genéticas e/ou genes ainda não descritos neste subtipo tumoral, provavelmente envolvidos na tumorigênese. Outro aspecto relevante a ser considerado no estudo genético de tumores embrionários é que, adicionalmente à importância de se identificar genes centrais para ampliar a compreensão da biologia tumoral, tais dados carregam o potencial de contribuir para o entendimento das vias atuantes no próprio processo de diferenciação do tipo celular afetado.

Diversos projetos internacionais vêm reforçando a importância de pesquisas relacionadas ao câncer infantil, não só visando aumentar a sobrevida dos pacientes como, também, amenizar nos sobreviventes os efeitos colaterais tardios dos tratamentos. Consórcios como RARECARE - *Surveillance of Rare Cancers in Europe* - tem como principal objetivo atrair a atenção dos órgãos responsáveis para a importância de se estudar tumores raros. Seus dados apontam que tumores raros podem não ser tão raros assim, incluindo os pediátricos (GATTA et al. 2011). O primeiro trabalho publicado pelo grupo chamava atenção para a incidência de tumores raros de acordo com as faixas etárias, evidenciando que tumores raros são mais prevalentes em uma faixa etária mais jovem, até os 20 anos (**Figura 36**). Além disso, os dados mostram que tumores raros apresentam uma sobrevida menor em até 5 anos e também após a idade de 40 anos, o que poderia, segundo o próprio consórcio RARECARE, ser explicado pelo desconhecimento da biologia tumoral e de tratamentos mais específicos.



Fonte: GATTA et al. (2011)

**Figura 38** - Comparação entre incidência e sobrevida dos grupos de pacientes afetados por tumores raros e tumores comuns. Em azul, grupo de tumores comuns, em vermelho, grupo de tumores raros, distribuídos por idade no eixo X. No gráfico A, estão representadas as faixas etárias e respectivas incidências; neste gráfico é possível visualizar que os tumores raros são mais prevalentes em uma faixa etária mais jovem. Os gráficos B e C apresentam taxas de sobrevida dos grupos, mostrando que tumores raros possuem uma sobrevida menor em até 5 anos e após a idade de 40 anos.

Essa intensificação recente da pesquisa em cânceres raros tem sido reforçada por outros grupos voltados para a pesquisa em tumores da infância, que destacam investimentos em saúde pública também voltados para programas de continuidade, que acompanhem esses pacientes ao longo da vida. Dentre esses, dois editoriais se destacam: *An early start on tackling childhood cancers: The most vulnerable cancer patients are drawing the attention they deserve* (Editorial Nature 543, 590 - 30 March 2017) e um editorial publicado pelo *Childhood Cancer International* em 2018 ([www.childhoodcancerinternational.org](http://www.childhoodcancerinternational.org)-acesso em outubro 2018). Estes editoriais reforçam algumas questões que o próprio RARECARE havia apontado, que estão listadas abaixo:

- *As estatísticas contam toda a história? Segundo o SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, dos Estados Unidos), a estimativa global de 175.000 a 250.000 novos casos anuais de câncer infantil representa uma subestimativa substancial reconhecida. Isso pode ser atribuído à falta de registros de câncer na grande maioria dos países de baixa renda, registros incompletos e erros de diagnóstico.*

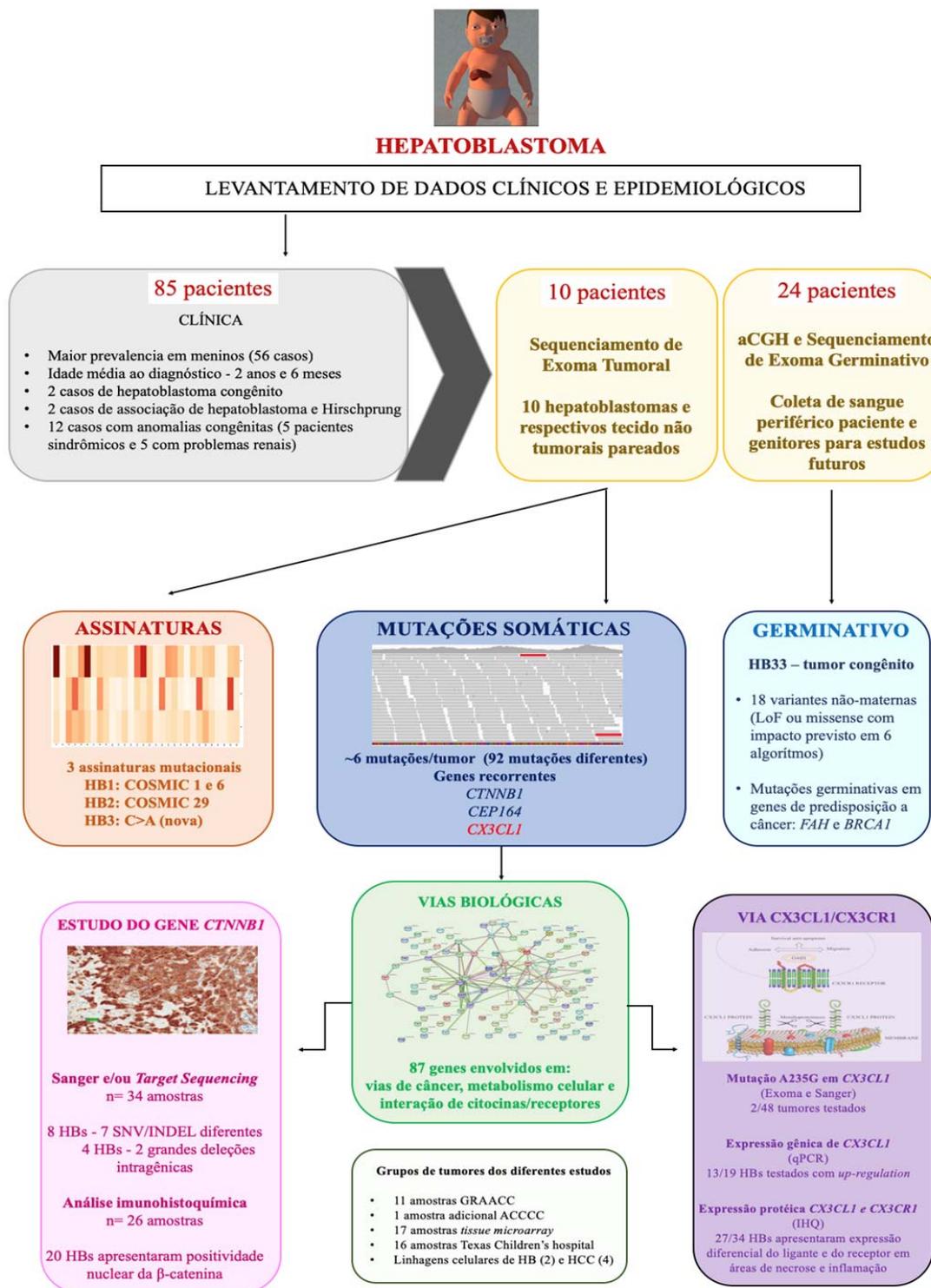
- *O câncer infantil tem fronteiras? Em países desenvolvidos e em alguns países em desenvolvimento, como o Brasil, o câncer representa a principal causa de morte não acidental entre crianças e adolescentes. Embora a mortalidade infantil devido a doenças infecciosas tenha sido significativamente reduzida em todo o mundo, as mortes por câncer infantil estão aumentando. A maioria dos especialistas em saúde pública acredita que essa taxa de aumento é motivo de preocupação.*

- *O câncer infantil é curável, mas há desigualdade e disparidade significativas nas taxas de sobrevivência entre os países. De fato, mais de 70% do câncer infantil é curável com os esquemas modernos de terapia. No geral, este aumento tem sido observado desde meados da década de 1970, quando a taxa de sobrevivência de cinco anos foi de aproximadamente 60%. Ainda assim, as taxas de sobrevivência variam dependendo do tipo de câncer e de fatores como a infraestrutura do sistema de saúde de um país, a cultura médica e as condições socioeconômicas. Segundo o SEER, em países menos desenvolvidos, as taxas de sobrevivência são tão baixas quanto 10-20%, o que significa que sobreviverão apenas 1-2 crianças de 10 que são*

*diagnosticadas com câncer e recebem tratamento. Por outro lado, em países desenvolvidos, as taxas de sobrevivência podem ser de 80-90%. As razões para essa desigualdade significativa são: falta de informação sobre sinais precoces e sintomas de câncer infantil, diagnóstico tardio, diagnóstico incorreto, acesso difícil e/ou custos proibitivos de tratamento e medicamentos.*

*- As crianças vão viver mais, mas viverão com qualidade? No Brasil, revisões de centros especializados em pediatria oncológica apontam desde 2000 alguns impactos de toxicidade tardia. De acordo com LOPES et al. (2000), até a década de 70 a grande maioria das crianças portadoras de tumores faleciam. O objetivo do tratamento era alcançar a cura a qualquer preço e a maioria dos efeitos tardios não eram conhecidos, pois a sobrevivência era baixa. Com o aumento destas taxas de cura, tem sido observado o impacto dos efeitos tardios relacionados ao tratamento na qualidade de vida destes adultos jovens. Os efeitos tardios do tratamento podem se manifestar mais precocemente ou a longo prazo, dependendo do tratamento utilizado e da idade da criança ao ser exposta ao tratamento. A Sociedade Americana de Câncer publicou em 2017 uma cartilha com os principais efeitos tóxicos decorrentes do tratamento (American Cancer Society – Late Effects of Childhood Cancer Treatment - <https://www.cancer.org/treatment/children-and-cancer/when-your-child-has-cancer/late-effects-of-cancer-treatment.html> - acesso em outubro de 2018). Em 2018, outras duas revisões abordaram o tema (GEBAUER et al. e HUANG et al. 2018). Os estudos mostram a ocorrência de atraso de desenvolvimento e déficits cognitivos em alguns pacientes. Além desses efeitos ligados à radioterapia, alguns como os endocrinológicos (crescimento e hipotireoidismo) podem não ser manifestados nos primeiros anos após o término do tratamento. Alguns efeitos provocados pela quimioterapia podem também se manifestar mais tardiamente, como por exemplo insuficiência renal, cardiomiopatia e perda de audição. Adicionalmente, os estudos ainda alertam para problemas de fertilidade e também de tumores subsequentes. Uma das grandes consequências, além da toxicidade, é o aparecimento de tumores secundários. SWIESZEWSKA et al. (2018) e WANG et al. (2018) relatam que as neoplasias secundárias mais frequentes têm sido diagnosticadas principalmente em sistema nervoso central e osteossarcoma.*

Esta tese de doutorado teve como objetivo principal compreender a biologia tumoral de hepatoblastomas, utilizamos o sequenciamento de exoma como primeira linha de análise, além de outros estudos. A caracterização dos dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes permitiu que os dados moleculares pudessem ser comparados do ponto de vista fenotípico também. Então, o estudo passou a ser prospectivo, com um segundo objetivo incorporado, referente à análise de variantes germinativas, uma vez que alguns casos apresentavam condições clínicas específicas. O **fluxograma esquemático** apresentado abaixo, ilustra os principais achados do trabalho.



**Figura 39** - Fluxograma esquemático: resumo resultado

A associação de fatores que expliquem a tumorigênese do hepatoblastoma parte de uma caracterização minuciosa das informações clínicas, anamnese familiar, e outras condições do paciente para futuras correlações com dados moleculares. O levantamento destes dados em nossa casuística aponta diversas características interessantes e que sugerem a relevância de estudos futuros para levantamento de dados completo, visando uma caracterização epidemiológica, clínica e genética mais ampla de pacientes brasileiros com hepatoblastoma. Algumas variáveis específicas chamam atenção, especialmente a frequência de prematuros no grupo, a ocorrência aumentada de sinais clínicos adicionais e o dimorfismo sexual relacionado não apenas à frequência aumentada de meninos, aspecto já reconhecido, como também a detecção mais frequente do subtipo Epitelial Embrionário em meninas, em associação a um possível pior prognóstico.

De acordo com a literatura, associações de fatores ambientais relacionados à exposição materna durante a gestação e/ou pós-natal foram principalmente relacionados à hipertensão gestacional e prematuridade, entretanto, são necessárias outras informações, principalmente dos genitores, como por exemplo, tabagismo, alcoolismo, exposição a agentes tóxicos e etc. Variáveis como uso de medicações em prematuros e condições clínicas específicas foram discutidas no **Capítulo 2**, juntamente com os resultados provenientes do estudo de exoma das amostras tumorais. Um estudo de 2008 (SPECTOR et al.) resalta a importância de levantamento clínico detalhado, incluindo etnia, dada a incidência aumentada em asiáticos (HIYAMA et al. 2014), hipertensão materna (ROBERTS et al. 2003), tabagismo materno (HORTA et al. 1997) e concepção por tecnologia de reprodução assistida (SCHIEVE et al. 2002) que podem causar baixo peso ao nascer, um dos fatores ambientais mais associados.

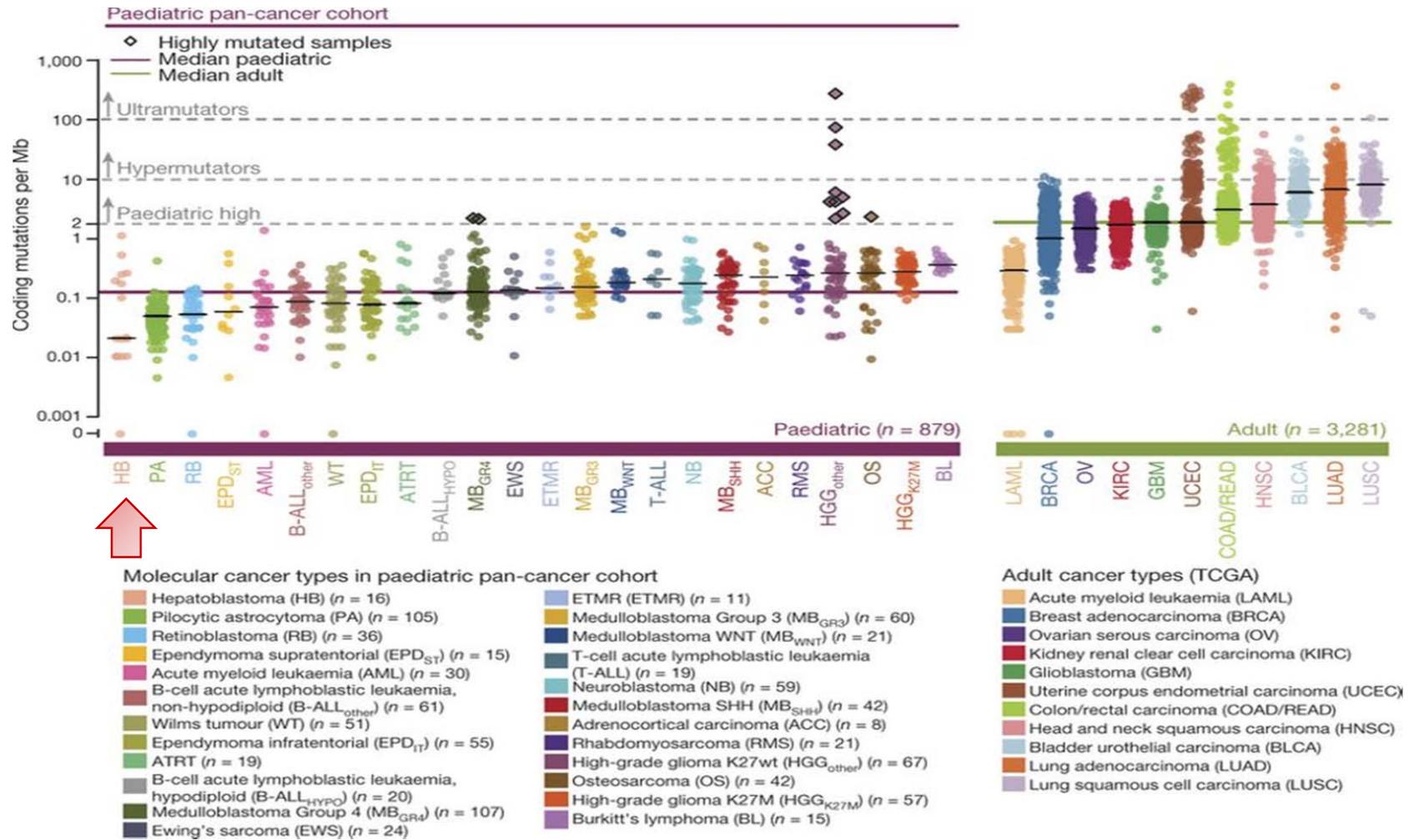
Existem alguns estudos que tentam elucidar a incidência diferencial de determinadas doenças em homens e mulheres, incluindo câncer. De acordo com SKOL et al. (2018), o sexo biológico é o fator que mais fortemente prediz o desenvolvimento de uma ampla gama de características humanas, mas os mecanismos subjacentes a tais diferenças ainda não são completamente compreendidos. Altura, composição corporal e estado metabólico variam entre os sexos, assim como a incidência de diversas doenças,

como por exemplo 90% de pacientes do sexo feminino em lúpus eritematoso sistêmico e anorexia e cerca de 75% de homens na espondilite anquilosante e nos transtornos do espectro autista. Embora tais traços apresentando dimorfismo sexual sejam altamente hereditários, a maioria da hereditariedade reside nos autossomos, com poucas evidências de maior relevância dos cromossomos sexuais. Assim, evidências emergentes sugerem que as variantes de risco autossômicas teriam efeitos diferentes em homens e mulheres, indicando uma fonte mais sutil de dimorfismo do que a variação cromossômica sexual isolada. No caso do câncer, existem diversos exemplos de dimorfismo sexual (CLOCCHIATTI et al. 2016) e, de maneira geral, a incidência de muitos tipos de câncer (em órgãos não-reprodutivos) é elevada de maneira significativa em homens em comparação a mulheres, também com diferenças no desenvolvimento clínico, resposta imunológica (CAPONE et al. 2018) e desfecho. O câncer de tireoide, por outro lado, é 2,5 vezes mais comum em mulheres do que em homens, enquanto carcinoma de fígado (KIDO et al. 2012), incluindo hepatoblastomas, são neoplasias mais comuns em homens. Estudos anteriores mostraram assinaturas de expressão gênica específicas de acordo com o gênero em alguns tipos de câncer, revelando grupos influenciados pelo sexo que são caracterizados por perfis diferentes de incidência e mortalidade (YUAN et al. 2016).

Como discutido anteriormente, o número médio de mutações não-sinônimas varia amplamente entre os diferentes tipos tumorais. Tamanha variação pode refletir, principalmente, a ação de agentes mutagênicos, como luz ultravioleta em melanomas e tabaco em câncer de pulmão, ou então processos mutacionais específicos, como tumorigênese mediada por mutações em genes de reparo, como em subtipos de câncer de cólon. Por outro lado, tumores pediátricos carregam um número médio de mutações não-sinônimas que é, em geral, inferior ao de tumores sólidos adultos, com cerca de ~9 mutações por tumor (VOGELSTEIN et al. 2013; GRÖBNER et al. 2018; MA et al. 2018). O hepatoblastoma, nesse cenário, é o tumor sólido já descrito com o menor número de mutações somáticas e nossos dados também corroboram este aspecto, comum aos poucos estudos anteriores já realizados de exoma de hepatoblastomas.

Um dos maiores trabalhos em câncer pediátrico foi publicado este ano (GRÖBNER et al. 2018), sendo um estudo Pan-Cancer que avaliou o perfil mutacional

(547 amostras por sequenciamento de genoma completo e 414 amostras por sequenciamento de exoma) de 24 diferentes tipos de tumores pediátricos em uma coorte de 961 tumores de crianças, adolescentes e jovens adultos. Diferenças marcantes em termos de frequência de mutação e genes significativamente mutados foram identificadas em comparação com cânceres adultos previamente analisados. As frequências de mutação variaram entre os tipos de câncer (0,02 a 0,49 mutações por Mb) e foram em média 14 vezes menores do que em cânceres adultos. Adicionalmente, tumores recidivantes carregavam número significativamente maior de mutações do que os tumores primários. Tumores com mais de 10 mutações por Mb têm sido referidos como "hipermutados" e estão frequentemente relacionados a deficiências em genes de reparo (YUAN et al. 2014; CAMPBELL et al. 2017); na coorte estudada por Gröbner, a hipermutação ocorreu exclusivamente em gliomas de alto grau, com mutações germinativas bialélicas em *MSH6* ou *PMS2*, apresentando carga mutacional extremamente alta, semelhante à mais alta entre os tumores adultos. Um dos achados mais importantes foi a detecção de alguma alteração com potencial para terapia-alvo em quase 50% das neoplasias pediátricas, o que é altamente relevante para o planejamento de futuros ensaios clínicos. Os dados também indicam que ~8% das crianças tem uma mutação germinativa predisponente inequívoca. A **Figura 40**, apresenta o gráfico do total de mutações por tipo de tumor. Os hepatoblastomas contidos neste estudo (16 tumores) mostram o menor número de mutações dentre os tumores pediátricos (média de 0,02/Mb).



**Fonte:** GRÖBNER et al. (2018).

**Figura 40** - Coorte pan-câncer pediátrico. Frequências de mutações somáticas em regiões codificadoras em 24 tipos de câncer pediátrico (n=879 tumores primários) e 11 de adultos (n=3.281) (TCGA – KANDOTH et al. 2013). Cada coluna corresponde a um tipo tumoral específico, identificado por cores na legenda abaixo; à esquerda estão apresentados dados de tumores pediátricos (barra horizontal roxa), à direita tumores de adultos (barra horizontal verde). Tumores pediátricos classificados como ultramutadas (*ultramutators*), hipermutadas (*hypermutators*) e altamente mutadas (*paediatric high*) são separados por linhas cinza tracejadas e destacados com losangos escuros. As médias do número de mutações codificadoras por Mb para tipo tumoral são mostradas como barras horizontais. Os hepatoblastomas (n=16) estão indicados pela seta vermelha.

Nos dois estudos de exoma de grupos de hepatoblastomas nos quais foi observada essa relativa escassez de mutações somáticas neste tipo tumoral, houve também relevância evidente das mutações no gene *CTNNB1* e da via WNT. Sendo assim, fica estabelecido cada vez mais que alterações genéticas recorrentes são raras no no genoma de hepatoblastomas, com exceção de *CTNNB1* e de mutações no promotor do gene *TERT*, ao passo que possivelmente ocorram algumas poucas mutações privadas, exclusivas de cada tumor, em outros genes. Estes dois principais trabalhos de exoma de hepatoblastomas (SUMAZIN et al. 2017 e EICHENMÜLLER et al. 2014) estudaram respectivamente 34 e 15 tumores; além de *CTNNB1*, somente o gene *A2ML1* apareceu em comum com as nossas análises (EICHENMÜLLER et al. 2014), embora a variante descrita não seja a mesma. *A2ML1* codifica um membro da superfamília alfa-macroglobulina que interage com proteases (RefSeq, agosto de 2015). Mutações germinativas em *A2ML1* foram associadas à síndrome de Noonan (VISSERS et al. 2014), condição clínica reconhecidamente associada a um aumento de predisposição ao desenvolvimento de tumores. Uma metanálise de 2015 (KRATZ et al.) analisou casos relatados desta síndrome e câncer pediátrico, mas nenhum dos tumores era hepatoblastoma.

Adicionalmente, uma análise integrativa baseada em nossos dados anteriores de metilação do mesmo grupo de hepatoblastomas (MASCHIETTO et al. 2016) mostrou uma sobreposição parcial entre o conjunto de genes que apresentam mutações somáticas

e o conjunto com alterações de metilação: os genes *EGFR* e *LMBRD1* haviam sido identificados como hipermetilados e o gene *AHRR* como hipometilado, reforçando a possível relevância destes genes neste tipo tumoral. O gene *LMBRD1* (variante c.468A>T em HB15) codifica uma proteína de membrana de lisossomo que pode estar envolvida no transporte e metabolismo da vitamina B12, também chamada de cobalamina. Mutações nesse gene estão associadas em padrão de herança recessiva à doença *methylmalonic aciduria and homocystinuria of the cblF type* ou doença de armazenamento de vitamina B12 (OMIM #277380). A vitamina B12 é uma vitamina hidrossolúvel que desempenha um papel fundamental no funcionamento normal do sistema nervoso na síntese da mielina (MILLER et al. 2015) e na formação de glóbulos vermelhos, além de estar envolvida no metabolismo de todas as células do corpo humano, afetando especialmente a síntese de DNA, o ácido graxo e o metabolismo de aminoácidos.

As mutações em *EGFR* (c.3223G>T e c.3224G>T) foram identificadas no HB33. Este gene codifica uma proteína que atua como receptor de *EFG* (Fator de crescimento epidérmico). O receptor do fator de crescimento epidérmico é um membro da família de receptores ErbB, uma subfamília de quatro receptores tirosina quinase muito próximos: *EGFR* (*ErbB-1*), *HER2/c-neu* (*ErbB-2*), *Her 3* (*ErbB-3*) e *Her 4* (*ErbB-4*). Mutações que afetam a expressão ou a atividade de receptores dessa família podem resultar em câncer (HERBST et al. 2004; ZHANG et al. 2007). Este tumor também possui 2 alterações somáticas em outro receptor da mesma família, o *ERBB4* (c.1477C>T e c.452A>T).

A mutação no gene *AHRR* (c.869G>C) também foi identificada em HB33, único caso congênito dentre os tumores cujo exoma foi analisado. A proteína codificada por este gene participa da cascata de sinalização do receptor de hidrocarboneto de arila (AhR), que está envolvida na regulação do crescimento e diferenciação celular. Atua reprimindo a expressão gênica dependente de AhR, como o citocromo P-4501A1 (*CYP1A1*) [RefSeq, jun 2011]. É interessante que essa paciente tem uma variante germinativa no gene *CYP1A* (c.1180A>G), que codifica uma enzima metabolizadora de xenobióticos da placenta, assim como vários fármacos e compostos amplamente utilizados na farmacoterapia ou presentes nas dietas. A expressão de *CYP1A1* é

transcricionalmente regulada através do receptor AhR, que então desempenha papel importante como mediador de uma resposta adaptativa a xenobióticos, bem como na fisiologia normal e no desenvolvimento embrionário. Vários ligantes de AhR exógenos, como PAHs, bifenilas policloradas e dioxinas halogenadas, podem ser encontrados nos constituintes de inúmeros produtos comerciais, incluindo produtos de processos de combustão, como fuligem de chaminés, alimentos grelhados e fumaça de cigarro, ou como o produto da incineração de resíduos. A exposição a estes compostos pode afetar crescimento e diferenciação celular, homeostase, nível de fatores de crescimento, função reprodutora e regulação hormonal. É importante ressaltar que a atividade elevada do *CYP1A1* através da ativação de AhR em placentas de mulheres fumantes tem sido associada a complicações na gravidez, como parto prematuro, anormalidades estruturais, morte fetal ou descolamento de placenta e risco de baixo peso ao nascer. Descobertas recentes relacionadas às consequências toxicológicas da ativação do AhR e da indução do *CYP1A1* foram relatadas na placenta humana durante a gravidez (STEJSKALOVA et al. 2011). Não foi possível coletar informações sobre tabagismo da mãe da paciente, no entanto, a assinatura mutacional de HB33 é predominantemente do tipo HB-S2, grupo que se assemelha à assinatura mutacional COSMIC 29, encontrada apenas em carcinoma oral de células escamosas (gengivo-bucal) de indivíduos com o hábito de mascar tabaco. Esses achados sugerem que a hipometilação e as mutações somática em *AHRR* e germinativa *CYP1A1* podem ter interagido para resultar em desregulação da via em que estão envolvidos, contribuindo para a tumorigênese.

As amostras analisadas por sequenciamento de exoma haviam sido previamente estudadas por microarranjo genômico (RODRIGUES et al. 2014) ou por SNP-array (projeto de mestrado em andamento de Juliana Sobral). Os dados referentes a alterações somáticas de número de cópias destes tumores mostram sobreposição com três dos genes mutados (*EGFR*, *BCL3* e *CBL*). As alterações no *EGFR* foram encontradas no tumor HB33 por todas as técnicas (hipermetilação, ganho/perda e mutação *missense*); o ganho/perda deste tumor foi detectado em 7p22.3q21.2, em segmento que contém o gene *EGFR*. Quanto ao gene *CBL*, a mutação somática *missense* foi identificada em HB31 (c.886A> G) e perda de 50 Mb foi detectada na região 11q14.1q25 na amostra HB46.

*CBL* é um proto-oncogene que codifica ubiquitina ligase E3 *RING finger*, proteína necessária para direcionar substratos para degradação pelo proteassoma, atuando como regulador negativo de muitas vias de transdução de sinal. Este gene apresenta mutação ou translocação em muitos tipos de câncer incluindo leucemia mielóide aguda, além de ser causa da síndrome Noonan-like com ou sem leucemia mielomonocítica juvenil (OMIM #613563) quando apresenta mutações germinativas (MARTINELLI et al. 2010).

O gene *BCL3*, no qual foi detectada uma mutação (c.16G> T) em HB30, está contido em região do cromossomo 19 na qual foram detectadas alterações no número de cópias em dois outros tumores (HB17, ganho de 59 Mb - 19p13.3q13.43; HB33, ganho de 31 Mb - 19q11q13.43). Este gene também se enquadra como um proto-oncogene e codifica uma proteína que regula a ativação transcricional de *NF-kappa-B*, que contribui para a regulação da proliferação celular (OHNO et al. 1990). É identificado pela sua translocação para o locus alfa da imunoglobulina em alguns casos de leucemia linfóides B (SOMA et al. 2006).

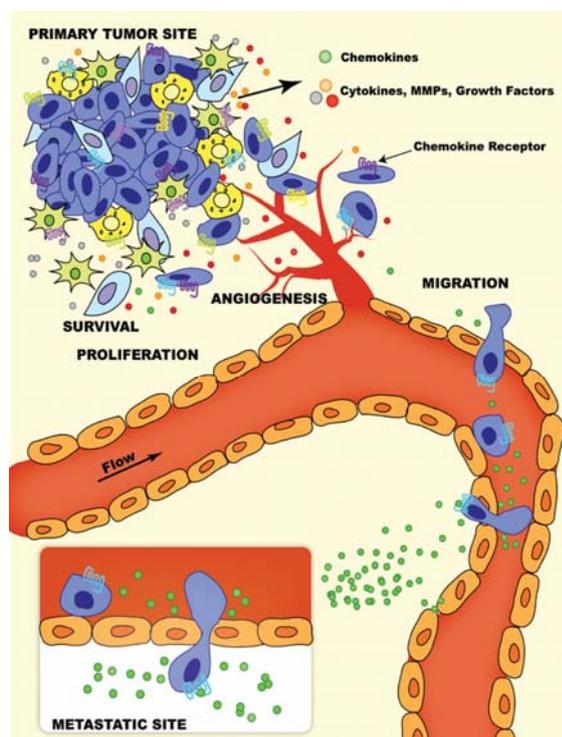
Nossos dados de exoma apontaram para um novo conjunto de genes candidatos para a tumorigênese do hepatoblastoma, especialmente *CX3CL1* e *CEP164*. O gene *CEP164*, que codifica uma proteína responsável pela sinalização de reparo quando ocorre um dano ao DNA (SIVASUBRAMANIAM et al. 2008), está envolvido na estabilidade do genoma e foi encontrado mutado em dois hepatoblastomas diferentes (HB15 e HB31). Este gene apresenta aumento de expressão em vários tipos de câncer, frequentemente associado a pior prognóstico (PAN et al. 2009). Estudo recente em células de rabdomyosarcoma sugere um papel central desse gene na proliferação em resposta ao estresse celular (LIU et al. 2017). Notavelmente, em um dos hepatoblastomas com mutação em *CEP164* observamos um genoma mais complexo, com várias alterações de número de cópias.

O achado mais significativo de nosso estudo foi a detecção de uma mutação somática recorrente do gene *CX3CL1*. A proteína codificada por este gene está presente nas células endoteliais de diversos tecidos, como cérebro, rins e fígado (HOOVER et al. 2000) e está relacionada ao movimento de leucócitos, incluindo migração para locais de inflamação (ROLLINS et al. 1997; Baggiolini et al. 1998). As funções de adesão e

migração celular são promovidas através da interação da fractalquina com o receptor *CX3CR1*, uma proteína transmembrana conhecida por fornecer sinalização pró-sobrevivência para monócitos anti-inflamatórios, mas também presente nas células NK e T (GRIFFITH et al. 2014). A mutação está localizada em uma região que exerce um papel fundamental relacionado à ligação ao *CX3CR1*. Sob condições de resposta inflamatória, a clivagem de *CX3CL1* por metaloproteinases gera uma quimiocina solúvel, que se liga a *CX3CR1* em células próximas e pode induzir adesão, sobrevivência celular e migração. A significância das mutações *CX3CL1* no câncer ainda é pouco conhecida, mas mutações em diferentes tipos de tumor são relatadas, predominantemente em câncer gástrico (COSMIC) e carcinoma hepatocelular (TCGA).

Como já mencionado, a expressão ou regulação inadequada de quimiocinas e seus receptores está associada a muitas doenças, especialmente aquelas caracterizadas por um infiltrado celular excessivo, como artrite reumatóide e outros distúrbios inflamatórios. Nos últimos anos, o envolvimento de quimiocinas e seus receptores em câncer, particularmente metástases, foi bem estabelecido (BALKWILL et al. 2004 e ZLOTNIK et al. 2006). A associação com metástase não é surpreendente, em vista do seu papel como quimioatratores na migração celular. Receptores de quimiocinas como o *CX3CR1* são receptores acoplados à proteína G (*G protein coupled receptor, GPCR*), (IMAI et al. 1997) com o terminal amino no meio extracelular e o terminal carboxila no meio intracelular, sendo as primeiras estruturas envolvidas na transdução celular. O processo tumoral de migração de células de um sítio primário às metástases é complexo (GUPTA et al. 2006), com muitas etapas necessárias para o desenvolvimento do tumor primário e estabelecimento de tumores secundários clinicamente significativos. Essas etapas incluem sobrevivência e crescimento do tumor primário; desprendimento de células tumorais da lesão primária; invasão em vasos vasculares ou linfáticos; localização e adesão aos órgãos de destino; sobrevivência, crescimento e "organogênese" das células em seu novo ambiente (MURAKAMI et al. 2004). Identificar qual via está alterada em qual tipo de tumor tem sido um dos campos mais estudados em oncologia molecular, assim como ampliar a compreensão sobre o processo

de metástase, já que esse processo tem muitas características em comum com migração celular normal (Figura 41).



Fonte: O'HAYRE et al. (2008)

**Figura 41** - Ilustração de etapas na metástase e papel de quimiocinas e receptores. As células tumorais (azul escuro) tem apoio de uma rede de células no microambiente incluindo fibroblastos (azul claro), células dendríticas (verde) e macrófagos associados ao tumor (amarelo). As quimiocinas produzidas pelas células tumorais recrutam células dendríticas, promovendo angiogênese; também recrutam leucócitos, que produzem outras citocinas, fatores de crescimento e metaloproteinases (MMPs) que aumentam proliferação e angiogênese. Os fibroblastos também induzem angiogênese e quimiocinas promotoras de sobrevivência e crescimento. A metástase das células é facilitada pela regulação de receptores de quimiocinas nas células tumorais, que lhes permite migrar para tecidos secundários onde ligantes são expressos. Semelhante ao sítio primário, sinalização quimiocina/citocina ocorre no sítio metastático.

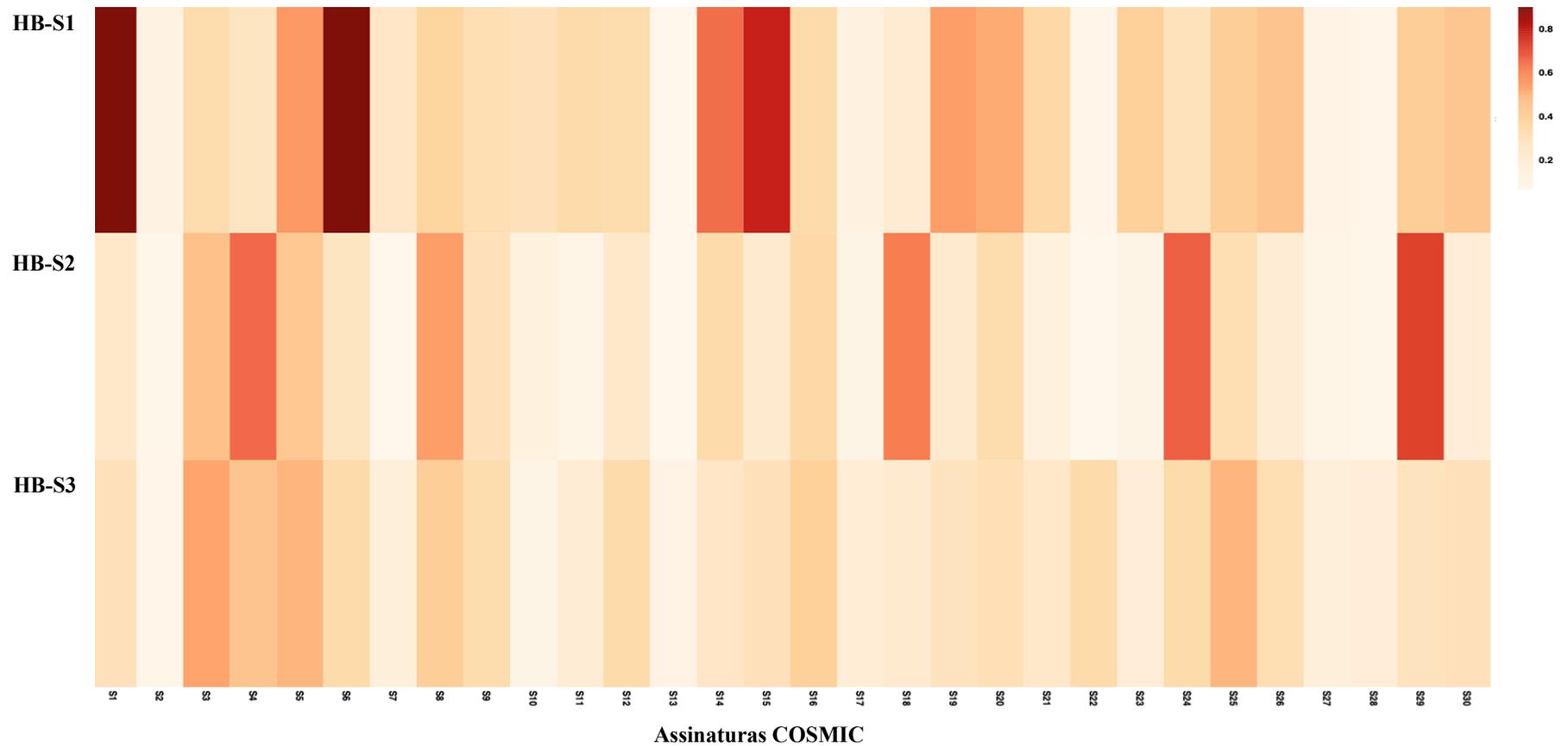
Todas essas evidências reforçam a importância do estudo de quimiocinas. XU et al. (2014) e YANG et al. (2017) publicaram resultados de outra quimiocina (*CXCL5*) em câncer de fígado. O trabalho de 2017 evidenciou que *CXCL5* pode ser um oncogene em

carcinoma hepatocelular, pois estudou por ensaios moleculares as atividades de proliferação através da expressão de CXCL5 e seu receptor CXCR2, mostrando que nas células nas quais o ligante e o receptor eram expressos ocorria maior atividade proliferativa.

Sendo assim, os resultados apresentados por nós são os primeiros envolvendo *CX3CL1* e *CX3CR1* em hepatoblastomas e ensaios funcionais futuros são essenciais para entendimento do envolvimento desta via neste tipo de tumor embrionário e em sua progressão.

No estudo de Gröbner et al. (2018) também foram avaliadas assinaturas mutacionais em mais de 500 amostras de tumores pediátrico. A maioria dos tipos de câncer abrigava predominantemente mutações C>T, ligados à assinatura mutacional 1 do COSMIC, cuja associação de idade descrita anteriormente ocorreu em alguns tumores cerebrais pediátricos (ALEXANDROV et al. 2013; ALEXANDROV et al. 2015). Os autores também encontraram sobreposição com as assinaturas 16 e 30 do COSMIC, além de uma assinatura nova, denominada “assinatura P1”, distinta de quaisquer assinaturas documentadas anteriormente e que apresenta alta taxas de mutações C>T em um contexto CCC/CCT, em vários tumores rabdóides teratóides atípicos e em um ependimoma. Essa assinatura P1 correlacionou-se com "variantes de múltiplos nucleotídeos", mas nenhum loci ou gene particular foi mutuamente alterado nos tumores afetados.

Além de revelar mutações somáticas em hepatoblastomas, os dados de sequenciamento de exoma dos 10 hepatoblastomas deste estudo, foram usados para procurar processos mutacionais, sendo detectadas no grupo três diferentes assinaturas. De maneira notável, as assinaturas mutacionais já relatadas especificamente para câncer de fígado não foram observadas nesses hepatoblastomas, sugerindo mecanismos mutacionais distintos para carcinomas hepatocelulares e tumores embrionários hepáticos. Duas das três assinaturas mutacionais aqui identificadas compõem juntas o panorama mutacional da maioria do grupo dos hepatoblastomas estudados e têm sobreposição importante com as assinaturas COSMIC 1, 6 e 29 (**Figura 42**).



**Figura 42** - Heatmap indicando a sobreposição entre as assinaturas do COSMIC e as três assinaturas identificadas nos hepatoblastomas. No eixo X estão representadas as trintas assinaturas disponíveis no COSMIC; no eixo Y, as três (HB-S1; HB-S2; HB-S3) assinaturas identificadas no estudo dos hepatoblastomas. As cores indicam o nível de semelhança entre elas, de acordo com os dados obtidos pelo signeR (ROSALES et al. 2017), quanto mais escuro (vermelho), maior é a sobreposição entre os dados mutacionais

A assinatura COSMIC 1 é encontrada em todos os tipos de câncer (ALEXANDROV et al. 2015) e o processo mutacional subjacente é a desaminação de 5-metilcitosina em dinucleotídeos CpG, levando a alterações C>T, que não são reparadas; pode-se especular que esse processo mutacional esteja relacionado ao nosso achado anterior de hipometilação relativa em hepatoblastomas (MASCHIETTO et al. 2016). A etiologia proposta para a assinatura COSMIC 6 estaria relacionada à incapacidade de detectar erros de pareamento (*mismatches*) no DNA, um resultado aparentemente contraditório em relação à baixa carga de mutação detectada em hepatoblastomas neste trabalho e todos os outros da literatura. A assinatura 29, detectada também nestes tumores, foi observada apenas no carcinoma oral de células escamosas gengivo-bucal, que se desenvolve em indivíduos com hábito de mascar tabaco; esta assinatura indicaria dano de guanina. Diversos produtos químicos presentes no tabaco causam câncer (*IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Smokeless tobacco and some tobacco-specific N-nitrosamines 2007*) e os carcinogênicos mais prejudiciais são as nitrosaminas, cujo nível está diretamente relacionado ao risco de câncer e que também pode ser encontrado em alimentos como carne defumada, peixe defumado e cerveja. Curiosamente, a O(6)metilguanina detectada no sangue do cordão umbilical de crianças com mães altamente expostas a esses produtos implica a exposição do feto à toxina e a toxicidade das fontes alimentares desses compostos (HEIKKINE et al. 2002). A exposição materna aos compostos N-nitrosos ou aos seus precursores durante a gravidez também tem sido associada ao nascimento prematuro (VUONG et al. 2016) e ao risco de câncer infantil (KLEINJANS et al. 2015). O câncer infantil é provavelmente o resultado combinatório de fatores genéticos e ambientais e essas interações entre exposição fetal a carcinógenos ambientais, como nitrosaminas do tabaco e/ou fontes alimentares, nascimento prematuro e aumento do risco de câncer infantil poderiam ser uma causa subjacente a um subconjunto de hepatoblastomas. Finalmente, identificamos também uma assinatura mutacional que não apresenta semelhança clara com qualquer outra já descrita, detectada em três tumores com pior sobrevida global.

A **Figura 43** abaixo, apresenta o grupo dos 10 tumores, divididos de acordo com a estratificação de risco, e as principais características clínicas e moleculares identificadas ao longo deste trabalho, e previamente discutidas.

Estratificação de risco*	ID, Sexo, Idade ao diag.	Histologia	Metástase	Transplante	Recidiva	Sobrevida global	β-catenina nuclear (IHQ)	Expressão gênica <i>CX3CL1</i> (qPCR)	Expressão gênica <i>CX3CR1</i> (qPCR)	Assinaturas Mutacionais
Baixo	HB17, F,36m	Epitelial Fetal	Não	Não	Não	>5 anos	Negativo	Não	Sim	HB-S2
	HB18, M,9m	Epitelial e Mesenquimal misto	Não	Sim	Não	>5 anos	Positivo	Sim	Sim	HB-S1
	HB31, M,30m	Epitelial Fetal	Não	Não	Não	>5 anos	Positivo	Sim	Não	HB-S3
Intermediário	HB15, F,18m	Epitelial Embrionário	Não	Sim	Não	1 ano	Positivo	Sim	Sim	HB-S3
	HB16, M,9m	Epitelial Fetal	Não	Não	Não	>5 anos	Positivo	Não	Não	HB-S2
	HB33, F,1m	Epitelial Embrionário e Fetal	Não	Não	Não	>5 anos	Positivo	Sim	Não	HB-S2
Alto	HB28, M,17a	Epitelial e Mesenquimal misto	Não	Não	Sim	4 anos	ND	Não	Sim	HB-S2
	HB30, M,54m	HB/HCC features	Pulmonar	Sim	Sim	5 anos	Não	Não	Não	HB-S3
	HB32, F,36m	Epitelial e Mesenquimal misto	Pulmonar	Sim	Não	>5 anos	Positivo	Sim	Sim	HB-S1
	HB46, M,28m	Epitelial e Mesenquimal misto	Pulmonar	Não	Não	>2 anos	Positivo	Não	Não	HB-S1

**Figura 43** - Análise integrada entre resultados clínicos e moleculares. \*A figura acima é dividida inicialmente com o subgrupo de risco que o paciente foi estratificado, de acordo com o CHIC (CZAUDERNA et al. 2016; MEYERS et al. 2017). São apresentadas informações clínicas sobre a idade ao diagnóstico, sexo e histologia do tumor. Além disso, estão disponíveis informações sobre metástase, se o paciente foi submetido a um transplante e teve recidiva. Os resultados de *CX3CL1* e *CX3CR1* estão de acordo com os dados de expressão gênica, discutidos no Capítulo 2 e correspondem ao valor de  $RQ > 2$ . A última coluna apresenta em qual assinatura mutacional cada uma das amostras se enquadrou. ND: Dado não disponível.

Assume-se que mutações germinativas em genes de predisposição ao câncer em crianças e adolescentes são eventos raros. Entretanto, muito provavelmente a predisposição genética a câncer infantil é sub-diagnosticada, o que tem implicações sérias. A prevalência e o espectro de mutações predisponentes entre crianças e adolescentes com câncer não são conhecidos. Apenas a identificação desses pacientes pode levar a ajustes terapêuticos e programas de rastreamento específicos relacionados à síndrome. Adicionalmente, a detecção de mutações em genes de predisposição a câncer em um indivíduo afetado assegura a investigação de seus familiares para seguimento clínico, bem como aconselhamento genético.

A despeito dessas considerações, o reconhecimento de suscetibilidade genética no câncer pediátrico é dificultado pelo fato de que mutações em genes de predisposição a câncer não causam necessariamente uma síndrome com fenótipo clínico reconhecível. Além disso, muitas vezes não há histórico familiar de câncer evidente, em especial pelo tamanho das famílias atuais, assim como pelo fato de que as mutações podem ocorrer *de novo* ou então se manifestar apenas em padrão de herança recessiva. Com base nessas considerações, vários estudos buscam identificar características clínicas que possam selecionar dentre os pacientes pediátricos aqueles que podem estar em alto risco de predisposição genética. Algumas características detectadas em um subconjunto de cânceres pediátricos indicam mutações genéticas predisponentes, incluindo (a) histórico familiar de câncer; (b) tumores bilaterais, multifocais ou múltiplos; (c) idade mais precoce ao diagnóstico do que tumores esporádicos do mesmo tipo; (d) achados físicos sugestivos de síndrome de predisposição; e (e) ocorrência de tipos específicos de tumores que frequentemente ocorrem no contexto de predisposição genética, incluindo hepatoblastomas (JONGMANS et al. 2016).

Um estudo de 2015 (ZHANG et al.) investigou 1120 pacientes com menos de 20 anos de idade; os genomas (em 595 pacientes), exomas (em 456) ou ambos (em 69). Foram analisadas as sequências de DNA de 565 genes, incluindo 60 que foram associados a síndromes de predisposição autossômica dominante, para a presença de mutações germinativas (**Figura 44**). Em sessenta genes de predisposição a câncer de herança autossômica dominante, foram identificadas 633 variantes germinativas não-sinônimas, das quais 78 (12%) foram consideradas patogênicas 17 (3%)

provavelmente patogênicas 226 (36%) significância incerta 273 (43%) provavelmente benignas e 39 (6%) benignas. As 95 variantes que foram consideradas patogênicas ou provavelmente patogênicas incluíram 54 mutações *missense* 14 mutações sem sentido 12 mutações *frameshift*, 9 mutações de sítio de *splicing* e 1 deleção *in-frame*, bem como 5 alterações no número de cópias genômicas; essas mutações foram detectadas em 21 dos 60 genes em 94 pacientes. O gene *TP53* foi o mais comumente mutado (em 50 pacientes), seguido por *APC* (em 6), *BRCA2* (em 6), *NF1* (em 4), *PMS2* (em 4), *RBI* (em 3) e *RUNX1* (em 3).

Autosomal dominant cancer-predisposition genes (60)	+	Autosomal recessive cancer-predisposition genes (29)	+	Tyrosine kinase genes (23)	+	Tumor-suppressor genes (58)	+	Other cancer genes (395)	=	<b>Total (565)</b>																																																																													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin: 0 auto;"> <thead> <tr> <th colspan="9" style="text-align: center;">Cancer Predisposition</th> <th colspan="2" style="text-align: center;">RASopathy</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ALK</td><td>CDC73</td><td>DICER1</td><td>MLH1</td><td>PAX5</td><td>RBI</td><td>SDHC</td><td>SUFU</td><td>WT1</td><td>BRAF</td><td>NRAS</td> </tr> <tr> <td>APC</td><td>CDH1</td><td>EPCAM</td><td>MSH2</td><td>PHOX2B</td><td>RET</td><td>SDHD</td><td>TMEM127</td><td></td><td>CBL</td><td>PTPN11</td> </tr> <tr> <td>BAP1</td><td>CDK4</td><td>FH</td><td>MSH6</td><td>PMS2</td><td>RUNX1</td><td>SMAD4</td><td>TP53</td><td></td><td>HRAS</td><td>RAF1</td> </tr> <tr> <td>BMPR1A</td><td>CDKN1C</td><td>GATA2</td><td>NF1</td><td>PRKAR1A</td><td>SDHA</td><td>SMARCA4</td><td>TSC1</td><td></td><td>KRAS</td><td>SHOC2</td> </tr> <tr> <td>BRCA1</td><td>CDKN2A</td><td>MAX</td><td>NF2</td><td>PTCH1</td><td>SDHAF2</td><td>SMARCB1</td><td>TSC2</td><td></td><td>MAP2K1</td><td>SOS1</td> </tr> <tr> <td>BRCA2</td><td>CEBPA</td><td>MEN1</td><td>PALB2</td><td>PTEN</td><td>SDHB</td><td>STK11</td><td>VHL</td><td></td><td>MAP2K2</td><td></td> </tr> </tbody> </table>											Cancer Predisposition									RASopathy		ALK	CDC73	DICER1	MLH1	PAX5	RBI	SDHC	SUFU	WT1	BRAF	NRAS	APC	CDH1	EPCAM	MSH2	PHOX2B	RET	SDHD	TMEM127		CBL	PTPN11	BAP1	CDK4	FH	MSH6	PMS2	RUNX1	SMAD4	TP53		HRAS	RAF1	BMPR1A	CDKN1C	GATA2	NF1	PRKAR1A	SDHA	SMARCA4	TSC1		KRAS	SHOC2	BRCA1	CDKN2A	MAX	NF2	PTCH1	SDHAF2	SMARCB1	TSC2		MAP2K1	SOS1	BRCA2	CEBPA	MEN1	PALB2	PTEN	SDHB	STK11	VHL		MAP2K2	
Cancer Predisposition									RASopathy																																																																														
ALK	CDC73	DICER1	MLH1	PAX5	RBI	SDHC	SUFU	WT1	BRAF	NRAS																																																																													
APC	CDH1	EPCAM	MSH2	PHOX2B	RET	SDHD	TMEM127		CBL	PTPN11																																																																													
BAP1	CDK4	FH	MSH6	PMS2	RUNX1	SMAD4	TP53		HRAS	RAF1																																																																													
BMPR1A	CDKN1C	GATA2	NF1	PRKAR1A	SDHA	SMARCA4	TSC1		KRAS	SHOC2																																																																													
BRCA1	CDKN2A	MAX	NF2	PTCH1	SDHAF2	SMARCB1	TSC2		MAP2K1	SOS1																																																																													
BRCA2	CEBPA	MEN1	PALB2	PTEN	SDHB	STK11	VHL		MAP2K2																																																																														

**Fonte:** ZHANG et al. (2015).

**Figura 44** - Categorias dos 565 genes de câncer analisados para mutações germinativas. O número de genes em cada categoria é mostrado entre parênteses. Os genes que possuem categorias sobrepostas são listados apenas uma vez.

A história familiar é comumente usada para identificar pessoas com possível predisposição hereditária ao câncer, especialmente dentro da população pediátrica com câncer (KNAPKE et al. 2012a). Entretanto, no trabalho acima descrito não houve prevalência de histórico familiar de câncer nos pacientes com mutações nos genes de predisposição a câncer. Da mesma forma, dentro da casuística estudada neste trabalho, nenhum paciente apresentava histórico familiar importante de câncer. No entanto, houve uma prevalência de pacientes com sinais clínicos adicionais que poderiam indicar mutações herdadas, dentre eles, cinco pacientes síndrômicos com hepatoblastoma (dois casos de tumor congênito, um com craniossinostose complexa e dois pacientes com associação de Hirschprung).

A associação entre alterações congênitas e câncer pediátrico é reconhecida de longa data. AGHA et al. (2005) estudaram uma coorte de 45.200 crianças com

anomalias congênitas e outra de 45.200 crianças sem anomalias congênitas, verificando risco seis vezes maior de desenvolvimento de tumores durante o primeiro ano de vida nas crianças com malformações. Recentemente, uma revisão sistemática relacionada a risco de câncer pediátrico em associação a defeitos de nascimento também comprovou a relevância desse achado (JOHNSON et al. 2017). KRIVIT e GOOD em 1957 verificaram uma incidência três vezes maior de leucemia em indivíduos com síndrome de Down. Atualmente é reconhecido que aproximadamente 1% das crianças com síndrome de Down desenvolvem síndrome mieloproliferativa transitória, leucemia mielóide aguda da síndrome de Down e/ou leucemia linfoblástica aguda de células B (LANGE 2000; XAVIER e TAUB 2010a), doenças ocasionadas pelo aumento de dose de genes específicos em decorrência da trissomia do cromossomo 21 (XAVIER e TAUB 2010b).

De fato, um dos principais fatores que aumentam a associação entre anomalias congênitas e risco de câncer na infância é a presença de alterações cromossômicas como na síndrome de Down. Além de *RBI*, cujas mutações germinativas ou somáticas causam o tumor embrionário retinoblastoma, o tumor de Wilms (tumor embrionário de rim) é outro exemplo clássico no qual o mapeamento do gene responsável pela predisposição ao câncer ocorreu por meio da identificação de uma alteração cromossômica em crianças sindrômicas. Após a constatação de um excesso de aniridia em crianças com tumores de Wilms (MILLER et al. 1968), foi caracterizado um conjunto raro de anomalias que constituem a síndrome *Wilms Tumor, Aniridia, Genitourinary Anomalies, and Mental Retardation syndrome* (WAGR; OMIM #194072). A identificação de deleção germinativa em 11p13 nos afetados pela síndrome WAGR levou à clonagem do gene supressor de tumor *WT1* (CALL et al. 1990; ROSE et al. 1990). Posteriormente, NG et al. (2007) estudaram 66 crianças afetadas por tumor de Wilms e encontraram defeitos congênitos em 45% delas; além de crianças com síndrome WAGR e deleção 11p13, identificaram pacientes com síndromes de Denys-Drash, aumento de crescimento (com ou sem assimetria de membros inferiores), Marshall-Smith e deficiência intelectual idiopática.

Estudos recentes vêm corroborando esse aumento de risco de câncer pediátrico também em defeitos de nascimento não relacionados a alterações

cromossômicas ou síndromes genéticas conhecidas (SIEGEL et al. 2017; NORWOOD et al. 2017). Um estudo populacional identificou associação específica de marcas cutâneas ao nascimento, como hemangiomas, linfangiomas, manchas café com leite e nevo pigmentado, a risco mais elevado de câncer infantil (JOHNSON et al. 2017). De fato, manchas café com leite são sinais observados em diferentes síndromes de predisposição a câncer como neurofibromatose tipo I e II, esclerose tuberosa, síndrome de McCune-Albright, anemia de Fanconi, entre outras (EVANS et al. 1992; GIAMPIETRO et al. 1993; FERNER et al. 2007; SUERINK et al. 2019). Mais recentemente, manchas café com leite foram reportadas em 60% dos portadores de mutações bialélicas em genes de reparo de DNA (WIMMER et al. 2014). Existem também descrições de associações específicas, como aumento de risco de linfoma em crianças com defeitos cardíacos congênitos, em especial correlacionado com condições mais complexas, sugerindo uma origem compartilhada no desenvolvimento das duas condições (COLLINS et al. 2018).

Hepatoblastomas ocorrem em associação a uma ampla variedade de anormalidades congênitas (NAROD et al. 1997; ANSELL et al. 2005), mas apenas duas condições genéticas estão fortemente relacionadas: síndrome de Beckwith-Wiedemann e polipose adenomatosa familiar. Adicionalmente, parece haver aumento de risco na trissomia do cromossomo 18 (PEREIRA et al. 2012) e também associação com outras anomalias congênitas, em especial anomalias renais (CHAN et al. 2014). Em um grande estudo de caso-controle de anomalias congênitas e hepatoblastomas, os resultados confirmaram associação de hepatoblastomas com anormalidades de rim e bexiga (VENKATRAMANI et al. 2014), embora o risco não seja tão alto quanto aquele das síndromes de Beckwith-Wiedemann e polipose adenomatosa familiar. Neste estudo, em uma das coortes (COG), as anomalias congênitas foram relatadas pela mãe e, portanto, a natureza precisa do defeito renal não pôde ser determinada para parte dos pacientes; algumas das mães relataram insuficiência renal ou rim aumentado, sendo que a doença subjacente poderia ter sido doença policística ou glomerulocística do rim.

Nossa casuística é composta por pacientes que desenvolveram um tumor muito raro, que se encontra dentro do grupo considerado em risco de carregar mutações em genes de predisposição a câncer. Adicionalmente, também reflete as

associações acima descritas de anomalias congênitas e câncer pediátrico, contendo alguns casos com apresentação clínica diferenciada, como em cinco pacientes síndrômicos. Em especial, identificamos no grupo como um todo, cinco pacientes com algum tipo de anomalia renal congênita.

Assim, como última parte deste estudo e ponto de partida para outros futuros, analisamos o perfil de variantes germinativas de alguns pacientes síndrômicos, em especial o exoma germinativo da paciente com hepatoblastoma congênito e agenesia renal, que desenvolveu hepatoblastoma exibindo uma histologia heterogênea. Este tumor apresentou o maior número de mutações somáticas aqui detectadas, incluindo a mutação no gene *CX3CLI* e seu perfil de alterações cromossômicas foi complexo comparado ao grupo tumoral (dados não mostrados). Além de variantes germinativas muito raras em genes relacionados à função hepática, como *HOXC4*, *PRSS56* e *CYP11A1*, a paciente apresentou duas variantes provavelmente patogênicas nos genes *BRCA1* e *FAH*, ambos genes de predisposição a câncer (RAHMAN et al. 2014), ressaltando o papel de mutações germinativas na etiologia de hepatoblastomas, no mínimo para um subgrupo de pacientes.

Este estudo tem várias limitações, dentre elas, podemos citar:

- A) A impossibilidade de coletar dados clínicos, epidemiológicos e histopatológicos de todos os pacientes – em alguns casos, foi perdido o seguimento do paciente na instituição antes de finalizar o tratamento;
- B) Não foi possível recuperar tecido normal e/ou tumoral de todos os pacientes estudados clinicamente.
- C) Pelo motivo citado acima, finalizamos esta tese com um número limitado de tumores estudados por sequenciamento de exoma;
- D) Validamos todas as variantes encontradas como somáticas; isso não descarta a possibilidade de que tenhamos feito uma filtragem e uma análise extremamente restritivas, excluindo mutações relevantes;
- E) Alguns estudos questionam qual seria o melhor tecido germinativo para estudo de mutações somáticas; no presente estudo, foi possível recuperar amostra de tecido hepático não-tumoral e sangue para grande parte dos pacientes, mas a busca por mutações somáticas foi predominantemente baseada em amostras de fígado não-tumoral.

F) Não houve tempo hábil para aprofundar o estudo de outro gene com mutações recorrentes nos tumores (*CEP164*) e também do estudo no promotor do gene *TERT*.

Apesar das limitações, parte dos resultados está de acordo com a literatura. Além disso, algumas hipóteses inovadoras foram levantadas, possibilitando estudos futuros, em especial (a) uma investigação funcional acerca do papel da via *CX3CL1/CX3CRI* na tumorigênese de hepatoblastomas ou em sua progressão e (b) estudo do mecanismo mutacional relacionado às assinaturas gênicas identificadas.

---

# *CONCLUSÃO*

---

## 6 CONCLUSÃO

O objetivo principal deste estudo foi a análise de dados de exoma de hepatoblastomas visando a identificação de mutações somáticas e o delineamento de assinaturas mutacionais. Este é o primeiro trabalho descrevendo mutações somáticas em hepatoblastomas de pacientes brasileiros.

- I. Realizamos levantamento e análise de dados clínicos e epidemiológicos de 85 pacientes com hepatoblastoma diagnosticados e/ou tratados em Instituições de câncer pediátrico do Estado de São Paulo, entres os anos de 1977 e 2017 (apenas dois casos não são de SP).
  - A incidência deste tumor foi maior em meninos do que em meninas (1,9:1); entretanto o fator de pior prognóstico histologia epitelial embrionária, foi mais frequente em meninas;
  - Sinais clínicos adicionais e/ou anomalias congênitas foram achados frequentes nessa casuística, incluindo atraso de desenvolvimento, anomalias craniofaciais, doença de Hirschprung e, principalmente, anomalias renais congênitas; dois casos de hepatoblastomas eram congênitos, condição clínica ainda mais rara.
- II. A análise de exoma tumoral para identificação de mutações somáticas foi realizada em um grupo de 10 hepatoblastomas (coorte inicial) pareados com tecidos não-tumorais (fígado e/ou sangue periférico), que foram validadas e investigadas em coorte adicional de 12 tumores, por meio de painel de sequenciamento de nova geração.
  - Observamos que hepatoblastomas tem uma carga mutacional muito baixa, corroborando dados de outras casuísticas internacionais; o número de mutações somáticas codificadoras não-sinônimas, excluindo o hepatoblastoma congênito, foi de ~6 por amostra. O hepatoblastoma congênito estudado apresenta padrão mutacional atípico dentro do grupo, com número muito maior de mutações (38 mutações).

- Os genes afetados por mutações somáticas nos hepatoblastomas estavam enriquecidos para as vias em câncer (KO05200), metabolismo celular (KO01100) e interação das citocinas com receptor (KO01100);
- Nossos dados apontaram um novo conjunto de genes candidatos para a tumorigênese ou progressão de hepatoblastomas. Os genes *EGFR*, *LMBRD1* e *AHRR*, nos quais detectamos previamente metilação diferencial nestes tumores, apresentaram mutações no exoma. Três genes estavam mutados em mais de um tumor: *CTNNB1*, *CX3CL1* e *CEP164*;
- Estudo de mutações do gene *CTNNB1* e imunohistoquímica da beta-catenina evidenciaram ativação da via Wnt em todos os tumores, incluindo aqueles nos quais mutações na via Wnt não foram detectadas;
- O achado mais significativo da análise do exoma foi a detecção de uma mutação somática recorrente no gene *CX3CL1* (A235G), que codifica uma proteína chamada fractalquina, cuja interação com seu receptor *CX3CR1* atua na sinalização pró-sobrevivência para monócitos anti-inflamatórios;
- A análise de expressão gênica evidenciou aumento de expressão de *CX3CL1* no grupo de hepatoblastomas, resultado corroborado a nível proteico, incluindo tumores sem mutações detectáveis em *CX3CL1*, indicando haver vias alternativas para sua ativação; a investigação do padrão de metilação de sítios CpG mapeados neste gene mostrou no grupo de tumores uma hipometilação significativa no seu promotor, assim como aumento de metilação no corpo do gene, indicando um possível mecanismo alternativo para o aumento de expressão observado nos tumores sem mutação;
- Os dois tumores *CX3CL1*-mutados apresentaram também expressão proteica do receptor *CX3CR1*, evidenciando ativação desta via de quimiocina, resultado que nos levou a explorar esse dado em outra casuística de tumores;
- Em um grupo independente de hepatoblastomas, a análise qualitativa de *CX3CL1* e *CX3CR1* mostrou um padrão contrastante de expressão proteica em regiões de inflamação e em áreas com necrose. Em torno das

regiões necróticas, a expressão proteica de CX3CL1 e CX3CR1 foi observada em linfócitos infiltrados, indicando uma resposta imune normal; no entanto, nas regiões de inflamação, ambas as proteínas estavam fortemente positivas nas células tumorais, mas não foram detectadas nos linfócitos infiltrados, sugerindo um mecanismo de regulação desta via em favor das células tumorais.

III. Apresentamos a primeira avaliação de assinaturas mutacionais em hepatoblastomas, identificando uma nova assinatura específica para um subconjunto desses tumores.

- Utilizando os dados de mutações somáticas, foram identificadas três assinaturas mutacionais, sendo que duas possuíam grande sobreposição com assinaturas conhecidas do COSMIC (assinaturas 1, 6 e 29); a assinatura 29 foi previamente detectada apenas em carcinoma oral de células escamosas gengivo-bucal, em indivíduos com hábito de mascar tabaco;
- A assinatura HB-S3 não mostrou semelhança clara com qualquer assinatura já descrita, sendo observada apenas em três tumores com pior sobrevida global;
- As assinaturas detectadas no carcinoma hepatocelular não foram identificadas, sugerindo diferente mecanismo mutacional em hepatoblastomas.

IV. Ressaltamos neste estudo um provável componente genético importante de predisposição a câncer pelo menos em parte dos pacientes com hepatoblastoma, possivelmente relacionado à presença de sinais clínicos adicionais, como anormalidades renais, doença de Hirschprung e anomalias craniofaciais.

- A análise de variantes germinativas na paciente com tumor congênito e agenesia renal apresentou variantes raras em genes relacionados à função hepática, como *HOXC4*, *PRSS56* e *CYP11A1*, além de duas variantes em genes de predisposição a câncer (*BRCA1* e *FAH*).

---

*REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS*

---

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agha MM, Williams JI, Marrett L, To T, Zipursky A, Dodds L. Congenital abnormalities and childhood cancer. **Cancer** 2005; 103:1939-48.

Aguiar TFM, Carneiro TN, Da Costa CML, Rosenberg C, Werneck I, Krepischi ACV. The genetic and epigenetic landscapes of hepatoblastomas. **Appl Cancer Res** 2017; 37:20.

Ahn S, Jang S, Shim J, et al. Genomic portrait of resectable hepatocellular carcinomas: implications of RB1 and FGF19 aberrations for patient stratification. **Hepatology** 2014; 60:1972-82.

Aicardi J, Chevrie JJ, Roussellie F. Le syndrome spasmes em flexion, agenesie calleuse, anomalies chorio-rétiennes. **Arch Fr Pediatr** 1969; 26:1103-20.

Aicardi J. Aicardi Syndrome: old and new findings. **Int Pediatr** 1999; 14:5–8.

Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature** 2013; 500:415-21. Erratum in: **Nature** 2013a; 502:258.

Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Campbell PJ, Stratton MR. Deciphering signatures of mutational processes operative in human cancer. **Cell Rep** 2013b; 3:246-59.

Alexandrov LB, Stratton MR. Mutational signatures: the patterns of somatic mutations hidden in cancer genomes. **Curr Opin Genet Dev** 2014; 24:52-60.

Alexandrov LB, Jones PH, Wedge DC, et al. Clock-like mutational processes in human somatic cells. **Nat Genet** 2015; 47:1402-7.

Alwan S, Reefhuis J, Rasmussen SA, Olney RS, Friedman JM, National Birth Defects Prevention Study: use of selective serotonin-reuptake inhibitors in pregnancy and the risk of birth defects. **N Engl J Med** 2007; 356:2684-92.

Allan BJ, Parikh PP, Diaz S, Perez EA, Neville HL, Sola JE. Predictors of survival and incidence of hepatoblastoma in the paediatric population. **HPB (Oxford)** 2013; 15:741-6.

[ACS] American Cancer Society. **Late effects of childhood cancer treatment**. Available from: <URL:<https://bit.ly/2xxo0zl>> [2018 out 20].

Ammann RA, Plaschkes J, Leibundgut K. Congenital hepatoblastoma: a distinct entity? **Med Pediatr Oncol** 1999; 32:466-8.

[Anonymus] An early start on tackling childhood cancers. **Nature** 2017; 543:590.

Ansell P, Mitchell C, Roman E. Relationships between perinatal and maternal characteristics and hepatoblastoma: a report from the UKCCS. **Eur J Cancer** 2005; 41:741-8.

Aoki Y, Matsubara Y. Ras/MAPK syndromes and childhood hemato-oncological diseases. **Int J Hematol** 2013; 97:30-6.

Arai Y, Honda S, Haruta M, et al. Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and MDM4 amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2010; 49:596-609.

Arranz JA, Piñol F, Kozak L, et al. Splicing mutations, IVS6-1(G>T), account for 70% of fumarylacetoacetate hydrolase (FAH) gene alterations, including 7 novel mutations, in a survey of 29 tyrosinemia type I patients. **Hum Mutat** 2002; 20:180-8.

Aretz S, Koch A, Uhlhaas S, et al. Should children at risk for familial adenomatous polyposis be screened for hepatoblastoma and children with apparently sporadic hepatoblastoma be screened for APC germline mutations? **Pediatr Blood Cancer** 2006; 47:811-8.

Atlasi Y, Stunnenberg HG. The interplay of epigenetic marks during stem cell differentiation and development. **Nat Rev Genet** 2017; 18:643-658.

Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature** 1998; 392:565-8.

Balkwill F. Cancer and the chemokine network. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:540-50.

Bar-Peled L, Chantranupong L, Cherniack A, et al. A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. **Science** 2013; 340:1100-6.

Baujat G, Rio M, Rossignol S, et al. Paradoxical NSD1 mutations in Beckwith-Wiedemann syndrome and 11p15 anomalies in Sotos syndrome. **Am J Hum Genet** 2004; 74:715-20.

Baynam GS, Goldblatt J. A child with an FGFR3 mutation, a laterality disorder and an hepatoblastoma: novel associations and possible gene-environment interactions. **Twin Res Hum Genet** 2010; 13:297-300.

Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. **Nature** 1997; 385:640-4.

Beck A, Trippel F, Wagner A, et al. Overexpression of UHRF1 promotes silencing of tumor suppressor genes and predicts outcome in hepatoblastoma. **Clin Epigenetics** 2018; 2; 10:27.

Bell RJ, Rube HT, Xavier-Magalhães A, et al. Understanding tert promoter mutations: a common path to immortality. **Mol Cancer Res** 2016; 14:315-23.

Bell SP, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. **Annu Rev Biochem** 2002; 71:333-74.

Belkadi A, Bolze A, Itan Y, et al. Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2015; 112:5473-8.

Best MG, Sol N, Kooi I, et al. RNA-Seq of tumor-educated platelets enables blood-based pan-cancer, multiclass, and molecular pathway cancer diagnostics. **Cancer Cell** 2015; 28:666-76.

Blik J, Gicquel C, Maas S, et al. Epigenotyping as a tool for the prediction of tumor risk and tumor type in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS). **J Pediatr** 2004; 145:796-9.

Bombard Y, Offit K, Robson ME. Risks to relatives in genomic research: a duty to warn? **Am J Bioeth** 2012; 12:12-4.

Bove KE, Soukup S, Ballard ET, Ryckman F. Hepatoblastoma in a child with trisomy 18: cytogenetics, liver anomalies, and literature review. **Pediatr Pathol Lab Med** 1996; 16:253-62.

Boveri T. Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. **J Cell Sci** 2008; 121 Suppl 1:1-84.

Bozic I, Antal T, Ohtsuki H, et al. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107:18545-50.

Branco MR, Ficz G, Reik W. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. **Nat Rev Genet** 2011; 13:7-13.

Bray F, Colombet M, Mery L, et al. **Cancer incidence in five continents, Vol. XI**. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017. (IARC Scientific Publication n° 166).

Brookes E, Shi Y. Diverse epigenetic mechanisms of human disease. **Annu Rev Genet** 2014; 48:237-68.

Brodeur GM, Nichols KE, Plon SE, Schiffman JD, Malkin D. Pediatric cancer predisposition and surveillance: an overview, and a tribute to Alfred G. Knudson Jr. **Clin Cancer Res** 2017; 23:e1-e5.

Buckley J, Sather H, Ruccione K, Rogers P, Haas J, et al. A case control study of risk factors for hepatoblastoma: report from the childrens cancer study group. **Cancer** 1989; 64:1169-76.

Bulterys M, Goodman MT, Smith MA, et al. Hepatic tumors. In: Ries LA, Smith MA, Gurney JG, et al. editors. **Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995**. Bethesda, Md: National Cancer Institute, SEER Program 1999. p.91-8. (NIH Pub. n° 99-4649).

Buonuomo PS, Ruggiero A, Vasta I, Attinà G, Riccardi R, Zampino G. Second case of hepatoblastoma in a young patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome. **Pediatr Hematol Oncol** 2005; 22:623-8.

Bustin S. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol** 2000; 25:169-93.

Cai X, Cullen BR. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. **RNA** 2007; 13:313-6.

Cairns RA, Mak TW. The current state of cancer metabolism. **Nat Rev Cancer** 2016; 16:613-4.

Cairo S, Armengol C, De Reyniès A, et al. Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer. **Cancer Cell** 2008; 14:471-84.

Cajaiba MM, Neves JI, Casarotti FF, et al. Hepatoblastomas and liver development: a study of cytokeratin immunoeexpression in twenty-nine hepatoblastomas. **Pediatr Dev Pathol** 2006; 9:196-202.

Call KM, Glaser T, Ito CY, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. **Cell** 1990; 60:509-20.

Callinan PA, Feinberg AP. The emerging science of epigenomics. **Hum Mol Genet** 2006; 15 Spec No 1:R95-101.

Campbell BB, Light N, Fabrizio D, et al. Comprehensive analysis of hypermutation in human cancer. **Cell** 2017; 171:1042-1056.e10.

Campos AH, Silva AA, Mota LD, et al. The value of a tumor bank in the development of cancer research in Brazil: 13 years of experience at the AC Camargo Hospital. **Biopreserv Biobank** 2012; 10:168-73.

Capone I, Marchetti P, Ascierio PA, Malorni W, Gabriele L. sexual dimorphism of immune responses: a new perspective in cancer immunotherapy. **Front Immunol** 2018; 21; 9:552.

Carmichael SL, Ma C, Rasmussen SA, et al. Craniosynostosis and maternal smoking. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol** 2008; 82:78-85.

Carmichael SL, Ma C, Rasmussen SA, et al. Craniosynostosis and risk factors related to thyroid dysfunction. **Am J Med Genet A** 2015; 167A:701-7.

Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nat Med** 2000; 6:389-95.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature** 2000; 407:249-57.

[CDCP] Centers for Disease Control and Prevention. **Facts about birth defects**. Available from: <URL:<https://bit.ly/2mp15nf>> [2018 out 15].

Chabner BA. Princípios gerais da quimioterapia do câncer. In: Brunton LL, Knollman B, Chabner B, editores. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12<sup>a</sup> ed. São Paulo: Amgh Editora; 2012. p.1667-77.

Chan R, Mascarenhas L, Venkatramani R. Hepatoblastoma and hypoplastic kidneys: a new association. **Pediatr Blood Cancer** 2014; 61:1476-8.

Chargaff E. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. **Experientia** 1950; 6:201-9.

Charo I, Ransohoff R. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **N Engl J Med** 2006; 354:610-21.

Cheng Y, Zhou T, Chen W, Yin X, Yao J, Zhang Y. Preliminary study correlating CX3CL1/CX3CR1 expression with gastric carcinoma and gastric carcinoma perineural invasion. **World J Gastroenterol** 2014; 20:4428-32.

Childhood Cancer International. **Reasons why childhood cancer should be a global child health priority**. Available from: <URL:<https://bit.ly/2TS6ZM2>> [2018 out 10].

Clocchiatti A, Cora E, Zhang Y, Dotto GP. Sexual dimorphism in cancer. **Nat Rev Cancer** 2016; 16:330-9.

Cock P, Christopher J, Naohisa G, Michael H, Peter M. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. **Nucleic Acids Res** 2010; 38:1767-71.

Collins RT 2nd, Von Behren J, Yang W, et al. Congenital heart disease complexity and childhood cancer risk. **Birth Defects Res** 2018; 110:1314-21.

Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell** 2006; 124:263-6.

Conran RM, Hitchcock CL, Waclawiw MA, Stocker JT, Ishak KG. Hepatoblastoma: the prognostic significance of histologic type. **Pediatr Pathol** 1992; 12:167-83.

Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. **Nat Genet** 2011; 43:838-46.

Copley MR, Babovic S, Benz C, et al. The Lin28b-let-7-Hmga2 axis determines the higher self-renewal potential of fetal haematopoietic stem cells. **Nat Cell Biol** 2013; 15:916-25.

Chisholm J. Economics of sequencing. In: Davies SC, editor. **Generation genome**. London: Department of Health; 2017. p.201-7. (Annual Report of the Chief Medical Officer 2016).

Csepregi A, Ebert MP, Röcken C, et al. Promoter methylation of CDKN2A and lack of p16 expression characterize patients with hepatocellular carcinoma. **BMC Cancer** 2010; 10:317.

Cui X, Liu B, Zheng S, Dong K, Dong R. Genome-wide analysis of DNA methylation in hepatoblastoma tissues. **Oncol Lett** 2016; 12:1529-34.

Curia MC, Zuckermann M, De Lellis L, et al. Sporadic childhood hepatoblastomas show activation of beta-catenin, mismatch repair defects and p53 mutations. **Mod Pathol** 2008; 21:7-14.

Czauderna P. Hepatoblastoma throughout SIOPEL trials - clinical lessons learnt. **Front Biosci (Elite Ed)** 2012; 4:470-9.

Czauderna P, Lopez-Terrada D, Hiyama E, et al. Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy. **Curr Opin Pediatr** 2014; 26:19-28.

Czauderna P, Haeberle B, Hiyama E, et al. The Children's Hepatic Tumors International Collaboration (CHIC): novel global rare tumor database yields new prognostic factors in hepatoblastoma and becomes a research model. **Eur J Cancer** 2016; 52:92-101.

Czauderna P, Garnier H. Hepatoblastoma: current understanding, recent advances, and controversies. **F1000 Res** 2018; 7:53.

Darbari A, Sabin KM, Shapiro CN, Schwarz KB. Epidemiology of primary hepatic malignancies in U.S. children. **Hepatology** 2003; 38:560-6.

Dasouki M, Barr M Jr. Trisomy 18 and hepatic neoplasia. **Am J Med Genet** 1987; 27:203-5.

Davidoff AM. Neuroblastoma. **Semin Pediatr Surg** 2012; 21:2-14.

DeBaun MR, Tucker MA. Risk of cancer during the first four years of life in children from The Beckwith-Wiedemann Syndrome Registry. **J Pediatr** 1998; 132:398-400.

De Berardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. **Sci Adv** 2016; 2: e1600200.

De Fine Licht S, Schmidt L, Rod N, Schmiegelow K. Hepatoblastoma in the Nordic countries. **Int J Cancer** 2012; 131:E555-61.

De Ioris M, Brugieres L, Zimmermann A, et al. Hepatoblastoma with a low serum alpha-fetoprotein level at diagnosis: the SIOPEL group experience. **Eur J Cancer** 2008; 44:545-50.

Dennis S, Aikawa M, Szeto W, D'amore P, Papkoff J. A secreted frizzled related protein, Frza, selectively associates with Wnt-1 protein and regulates Wnt-1 signaling. **J Cell Sci** 1999; 112:3815-20.

Depristo Ma, Banks E, Poplin R, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. **Nat Genet** 2011; 43:491-8.

De Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:24-37.

Dinehart SM. The treatment of actinic keratoses. **J Am Acad Dermatol** 2000; 42:25-8.

Ding Y, Xi Y, Chen T, et al. Caprin-2 enhances canonical Wnt signaling through regulating LRP5/6 phosphorylation. **J Cell Biol** 2008; 182:865-72.

Dolan S, Fitch M. The management of venous thromboembolism in cancer patients. **Br J Nurs** 2007; 6:1308-12.

Dome JS, Huff V. Wilms tumor predisposition 2003 Dec 19 [updated 2016; 20]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. editors. **GeneReviews**® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018. Available from: <URL:<https://bit.ly/2tpY0X0>> [2018 out 12]

Downing JR, Wilson RK, Zhang J, et al. The Pediatric Cancer Genome Project. **Nat Genet** 2012; 44:619-22.

Douglass EC, Reynolds M, Finegold M, Cantor AB, Glicksman A. Cisplatin, vincristine, and fluorouracil therapy for hepatoblastoma: a Pediatric Oncology Group study. **J Clin Oncol** 1993; 11:96-9.

Durham EL, Howie RN, Cray JJ. Gene/environment interactions in craniosynostosis: a brief review. **Orthod Craniofac Res** 2017; 20 Suppl 1:8-11.

Eggermann T, Perez de Nanclares G, Maher ER, et al. Imprinting disorders: a group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci. **Clin Epigenetics** 2015; 7:123.

Ehrenpreis T. Hirschsprung's disease. **Am J Dig Dis** 1971; 16:1032-52.

Eichenmüller M, Trippel F, Kreuder M, et al. The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies with HCC-like features. **J Hepatol** 2014; 61:1312-20.

Eichenmüller M, Gruner I, Hagl B, et al. Blocking the hedgehog pathway inhibits hepatoblastoma growth. **Hepatology** 2009; 49:482-90.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol** 2007; 35:495-516.

Ergin H, Yildirim B, Dagdeviren E, et al. A prenatally detected case of congenital hepatoblastoma. **Pathol Oncol Res** 2008; 14:97-100.

Erreni M, Siddiqui I, Marelli G, et al. The fractalkine-receptor axis improves human colorectal cancer prognosis by limiting tumor metastatic dissemination. **J Immunol** 2016; 196:902-14.

Evans HH, Evans TE. Methylation of the deoxyribonucleic acid of *Physarum polycephalum* at various periods during the mitotic cycle. **J Biol Chem** 1970; 245:6436-41.

Evans DG, Huson SM, Donnai D, et al. A genetic study of type 2 neurofibromatosis in the United Kingdom. II. Guidelines for genetic counselling. **J Med Genet** 1992; 29:847-52.

Ezkurdia I, Juan D, Rodriguez JM, et al. Multiple evidence strands suggest that there; be as few as 19,000 human protein-coding genes. **Hum Mol Genet** 2014; 23:5866-78.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell** 1990; 61:759-67.

Federico S, Brennan R, Dyer MA. Childhood cancer and developmental biology a crucial partnership. **Curr Top Dev Biol** 2011; 94:1-13.

Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. **Nature** 1983a; 301:89-92.

Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation of RAS oncogenes in primary human cancers. **Biochem Biophys Res Commun** 1983b; 111:47-54.

Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nat Rev Genet** 2006; 7:21-33.

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. **Eur J Cancer** 2013; 49:1374-403.

Ferner RE. Neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2: a twenty first century perspective. **Lancet Neurol** 2007; 6:340-51.

Feusner JH, Krailo MD, Haas JE, Campbell JR, Lloyd DA, Ablin AR. Treatment of pulmonary metastases of initial stage I hepatoblastoma in childhood. Report from the Childrens Cancer Group. **Cancer** 1993; 71:859-64.

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

Flavahan WA, Gaskell E, Bernstein BE. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. **Science** 2017; 357:pii: eaal2380.

Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. **Am J Cancer Res** 2017; 7:1016-36.

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1992; 89:1827-31.

Fronhoffs S, Totzke G, Stier S, et al. A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. **Mol Cell Probes** 2002; 16:99-110.

Fujimoto A, Totoki Y, Abe T, et al. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. **Nat Genet** 2012; 44:760-4.

Fujita A, Ochi N, Fujimaki H, et al. A novel WTX mutation in a female patient with osteopathia striata with cranial sclerosis and hepatoblastoma. **Am J Med Genet A** 2014; 164A:998-1002.

Futreal PA, Coin L, Marshall M, et al. A census of human cancer genes. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:177-83.

Garber JE, Li FP, Kingston JE, et al. Hepatoblastoma and familial adenomatous polyposis. **J Natl Cancer Inst** 1988; 80:1626-8. Erratum in: **J Natl Cancer Inst** 1989; 81:461.

Gardner MJ, Altman DG. Confidence intervals rather than P values: estimation rather than hypothesis testing. **Br Med J (Clin Res Ed)** 1986; 292:746-50.

Gatta G, van der Zwan JM, Casali PG, et al. RARECARE working group. Rare cancers are not so rare: the rare cancer burden in Europe. **Eur J Cancer** 2011; 47:2493-511.

Gebauer J, Lehnert H, Schmid SM, Spix C, Stein A, Langer T. Late effects following childhood cancer treatment: a special challenge for transition medicine. **Internist (Berl)** 2018; 59:1157-62.

Germain T, Favelier S, Cercueil JP, Denys A, Krausé D, Guiu B. Liver segmentation: practical tips. **Diagn Interv Imaging** 2014; 95:1003-16.

Giampietro PF, Adler-Brecher B, Verlander PC, Pavlakis SG, Davis JG, Auerbach AD. The need for more accurate and timely diagnosis in Fanconi anemia: a report from the International Fanconi Anemia Registry. **Pediatrics** 1993; 91:1116-20.

Gnarra M, Behr G, Kitajewski A, et al. History of the infantile hepatic hemangioma: From imaging to generating a differential diagnosis. **World J Clin Pediatr** 2016; 5:273-80.

Grabole N, Tischler J, Hackett JA, et al. Prdm14 promotes germline fate and naive pluripotency by repressing FGF signalling and DNA methylation. **EMBO Rep** 2013; 14:629-37.

Gray SG, Eriksson T, Ekström C, et al. Altered expression of members of the IGF-axis in hepatoblastomas. **Br J Cancer** 2000; 82:1561-7.

Greaves M. Author Correction: A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Nat Rev Cancer** 2018; 18:526.

Green RC, Berg JS, Grody WW, et al. CORRIGENDUM: ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. **Genet Med** 2017; 19:606.

Greenberg HS, Kazak AE, Meadows AT. Psychologic functioning in 8- to 16-year-old cancer survivors and their parents. **J Pediatr** 1989; 114:488-93.

Greger V, Passarge E, Höpping W, Messmer E, Horsthemke B. Epigenetic changes; contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. **Hum Genet** 1989; 83:155-8.

Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. **Annu Rev Immunol** 2014; 32:659-702.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell** 2010; 140:883-99.

Gröbner SN, Worst BC, Weischenfeldt J, et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. **Nature** 2018; 555:321-7.

Groden J, Thliveris A, Samowitz W, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. **Cell** 199; 66:589-600.

Grosfeld J, O'Neill J. History of pediatric surgery: a brief overview. In: Coran AG, Caldamone A, Adzick NS, Krummel TM, Laberge J-M, Shamberger R, editors. **Pediatric surgery**. 7<sup>th</sup> ed. New York: Elsevier; 2012. p.3-17.

Gryfe R, Gallinger S. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and colorectal cancer. **Surgery** 2001; 130:17-20.

Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. **Cell** 2006; 127:679-95.

Haas JE, Muczynski KA, Krailo M, et al. Histopathology and prognosis in childhood hepatoblastoma and hepatocarcinoma. **Cancer** 1989; 64:1082-95.

Haas JE, Feusner JH, Finegold MJ. Small cell undifferentiated histology in hepatoblastoma; be unfavorable. **Cancer** 2001; 92:3130-4.

Habas R, Dawid I, He X. Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. **Genes Dev** 2003; 17:295-309.

Habas R, Kato Y, He X. Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel formin homology protein Daam1. **Cell** 2001; 107:843-54.

Haber DA, Settleman J. Cancer: drivers and passengers. **Nature** 2007; 446:145-6.

Hackett JA, Surani MA. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 2013; 368:20110328.

Hackett JA, Sengupta R, Zyllicz JJ, et al. Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. **Science** 2013; 339:448-52.

Hackett JA, Dietmann S, Murakami K, Down TA, Leitch HG, Surani MA. Synergistic mechanisms of DNA demethylation during transition to ground-state pluripotency. **Stem Cell Reports** 2013; 1:518-31.

Hackett JA, Surani MA. Beyond DNA: programming and inheritance of parental methylomes. **Cell** 2013; 153:737-9.

Hackshaw A, Rodeck C, Boniface S. Maternal smoking in pregnancy and birth defects: a systematic review based on 173 687 malformed cases and 11.7 million controls. **Hum Reprod Update** 2011; 17:589-604.

Hamilton SR, Aaltonen LA. **Pathology and genetics of tumours of the digestive system**. Lyon: IARC Press; 2000. (World Health Organization Classification of Tumours, n° 2).

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-74.

Haricharan RN, Georgeson KE. Hirschsprung disease. **Semin Pediatr Surg** 2008; 17:266-75.

Hayman MJ. Avian acute leukemia viruses. **Curr Top Microbiol Immunol** 1983; 103:109-25.

Heck JE, Meyers TJ, Lombardi C, et al. Case-control study of birth characteristics and the risk of hepatoblastoma. **Cancer Epidemiol** 2013; 37:390-5.

Heerema-McKenney A, Leuschner I, Smith N, Sennesh J, Finegold MJ. Nested stromal epithelial tumor of the liver: six cases of a distinctive pediatric neoplasm with frequent calcifications and association with cushing syndrome. **Am J Surg Pathol** 2005; 29:10-20.

Heikkine T, Ekblad U, Laine K. Transplacental transfer of citalopram, fluoxetine and their primary demethylated metabolites in isolated perfused human placenta. **BJOG** 2002; 109:1003-8.

Helleday T, Eshtad S, Nik-Zainal S. Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. **Nat Rev Genet** 2014; 15:585-98.

Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2004; 59 2 Suppl:21-6.

Heuckeroth RO. Hirschsprung disease - integrating basic science and clinical medicine to improve outcomes. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol** 2018; 15:152-67.

Heyn H, Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. **Nat Rev Genet** 2012; 13:679-92.

Hill DA, Swanson PE, Anderson K, et al. Desmoplastic nested spindle cell tumor of liver: report of four cases of a proposed new entity. **Am J Surg Pathol** 2005; 29:1-9.

Hirschman BA, Pollock BH, Tomlinson GE. The spectrum of APC mutations in children with hepatoblastoma from familial adenomatous polyposis kindreds. **J Pediatr** 2005; 147:263-6.

Hiyama E. Pediatric hepatoblastoma: diagnosis and treatment. **Transl Pediatr** 2014; 3:293-9.

Hoadley KA, Yau C, Hinoue T; Cancer Genome Atlas Network. et al. Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. **Cell** 2018; 173:291-304.e6.

Hooft C, Boedts F, Van Acker K. [Wiedemann-Beckwith syndrome (omphalocele-macroglossia-gigantism)]. **Ann Pediatr (Paris)** 1969; 16:49-56.

Honda S, Arai Y, Haruta M, et al. Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypermethylation of the H19 differentially methylated region in hepatoblastoma. **Br J Cancer** 2008; 99:1891-9.

Honda S, Miyagi H, Suzuki H, et al. RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients. **Pediatr Surg Int** 2013; 29:1147-52.

Honda S, Minato M, Suzuki H, et al. Clinical prognostic value of DNA methylation in hepatoblastoma: Four novel tumor suppressor candidates. **Cancer Sci** 2016; 107:812-9.

Hooks KB, Audoux J, Fazli H, et al. New insights into diagnosis and therapeutic options for proliferative hepatoblastoma. **Hepatology** 2018; 68:89-102.

Hoover DM, Mizoue LS, Handel TM, Lubkowski J. The crystal structure of the chemokine domain of fractalkine shows a novel quaternary arrangement. **J Biol Chem** 2000; 275:23187-93.

Hopkins IJ, Humphrey I, Keith CG, Susman M, Webb GC, Turner EK. The Aicardi syndrome in a 47, XXY male. **Aust Paediatr J** 1979; 15:278-80.

Horta BL, Victora CG, Menezes AM, Halpern R, Barros FC. Low birthweight, preterm births and intrauterine growth retardation in relation to maternal smoking. **Paediatr Perinat Epidemiol** 1997; 11:140-51.

Houssaint E. Differentiation of the mouse hepatic primordium. I. An analysis of tissue interactions in hepatocyte differentiation. **Cell Differ** 1980; 9:269-79.

Hovestadt V, Remke M, Kool M, et al. Robust molecular subgrouping and copy-number profiling of medulloblastoma from small amounts of archival tumour material using high-density DNA methylation arrays. **Acta Neuropathol** 2013; 125:913-6.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M. **Childhood cancer by the ICCC. SEER Cancer Statistics Review 1975-2009 (Vintage 2009 Populations)**. Bethesda, MD. National Cancer Institute: 2012. Section 29. Uptodate August 2012. Available from: <URL:<https://bit.ly/2X4T0Vu>> [2018 set 16].

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. **SEER Cancer Statistics Review 1975-2014**. National Cancer Institute. Bethesda, MD. November 2016, SEER data submission, posted to the SEER web site. Updated April 2, 2018. Available from: <URL:<https://bit.ly/2GKX5s7>> [2018 set 16].

Hoyt AT, Canfield MA, Romitti PA, et al. Associations between maternal periconceptional exposure to secondhand tobacco smoke and major birth defects. **Am J Obstet Gynecol** 2016; 215:613.e1-613.e11.

Hu CW, Chen JL, Hsu YW, Yen CC, Chao MR. Trace analysis of methylated and hydroxymethylated cytosines in DNA by isotope-dilution LC-MS/MS: first evidence of DNA methylation in *Caenorhabditis elegans*. **Biochem J** 2015; 465:39-47.

Huang LC, Ho M, Chang WC, Chen HY, Hung YC, Chiu TH. Prenatal diagnosis of fetal hepatoblastoma with a good neonatal outcome: case report and narrative literature review. **Pediatr Hematol Oncol** 2011; 28:150-4.

Huang IC, Bhakta N, Brinkman TM, et al. Determinants and consequences of financial hardship among adult survivors of childhood cancer: a report from the St. Jude Lifetime Cohort Study. **J Natl Cancer Inst** 2018; 111:189-200.

Hughes LJ, Michels VV. Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis. **Am J Med Genet** 1992; 43:1023-5.

[IARC] Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. **Smokeless tobacco and some tobacco-specific n-nitrosamines**. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2007. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, n° 89.) Available from: <URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326497>> [2018 set 16].

Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A. Axin, A Negative Regulator of the Wnt Signaling Pathway, Forms A Complex With GSK-3beta And Beta-Catenin and Promotes GSK-3beta-Dependent Phosphorylation of Beta-Catenin. **EMBO J** 1998; 17:1371-84.

Imai T, Hieshima K, Haskell C. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. **Cell** 1997; 91:521-530.

Ito E, Sato Y, Kawauchi K, et al. Type 1a glycogen storage disease with hepatoblastoma in siblings. **Cancer** 1987; 59:1776-80. Erratum in: **Cancer** 1987; 60:723.

Izycka-Swieszewska E, Bien E, Stefanowicz J, et al. Malignant gliomas as second neoplasms in pediatric cancer survivors: neuropathological study. **Biomed Res Int** 2018; 2018:4596812.

Jia D, Dong R, Jing Y, et al. Exome sequencing of hepatoblastoma reveals novel mutations and cancer genes in the Wnt pathway and ubiquitin ligase complex. **Hepatology** 2014; 60:1686-96.

Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nat Rev Genet** 2012; 13:484-92.

Jones S, Chen WD, Parmigiani G, et al. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2008; 105:4283-8.

Jongmans MC, Loeffen JL, Waanders E, et al. Recognition of genetic predisposition in pediatric cancer patients: an easy-to-use selection tool. **Eur J Med Genet** 2016; 59:116-25.

Johnson D, Wilkie AO. Craniosynostosis. **Eur J Hum Genet** 2011; 19:369-76.

Johnson K, Williams K, Ross J, Krailo M, Tomlinson G. Parental tobacco and alcohol use and risk of hepatoblastoma in offspring: a report from the Children's Oncology Group. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2013; 22:1837-43.

Johnson KJ, Lee JM, Ahsan K, et al. Pediatric cancer risk in association with birth defects: a systematic review. **PLoS One** 2017; 12:e0181246.

Kalish JM, Jiang C, Bartolomei MS. Epigenetics and imprinting in human disease. **Int J Dev Biol** 2014; 58:291-8.

Kamien BA, Gabbett MT. Aicardi syndrome associated with hepatoblastoma and pulmonary sequestration. **Am J Med Genet A** 2009; 149A:1850-2.

Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. **Nature** 2013; 502:333-9.

Karin M. Nuclear factor-kappa B in cancer development and progression. **Nature** 2006; 441:431-6.

Kasai M, Watanabe I. Histologic classification of liver-cell carcinoma in infancy and childhood and its clinical evaluation: a study of 70 cases collected in Japan. **Cancer** 1970; 25:551-63.

Kato M, Takita J, Takahashi K, et al. Hepatoblastoma in a patient with sotos syndrome. **J Pediatr** 2009; 155:937-9.

Kaufmann U, Zuppinger C, Waibler Z, et al. The armadillo repeat region targets ARVCF to cadherin-based cellular junctions. **J Cell Sci** 2000; 113:4121-35.

Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. **J Cell Sci** 2003; 116:2627-34.

Kervancioglu Demirci E, Salamonsen LA, Gauster M. The role of CX3CL1 in fetal-maternal interaction during human gestation. **Cell Adh Migr** 2016; 10:189-96.

Kido T, Lo RC, Li Y, et al. The potential contributions of a Y-located protooncogene and its X homologue in sexual dimorphisms in hepatocellular carcinoma. **Hum Pathol** 2014; 45:1847-58.

Kingston JE, Herbert A, Draper GJ, Mann JR. Association between hepatoblastoma and polyposis coli. **Arch Dis Child** 1983; 58:959-62.

Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. **Nature** 1997; 386:761, 763.

Kisseljova NP, Kisseljov FL. DNA demethylation and carcinogenesis. **Biochemistry (Mosc)** 2005; 70:743-52.

Kitagawa M, Hatakeyama S, Shirane M, et al. An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin. **EMBO J** 1999; 18:2401-10.

Kitanovski L, Ovcak Z, Jazbec J. Multifocal hepatoblastoma in a 6-month-old girl with trisomy 18: a case report. **J Med Case Rep** 2009; 3:8319.

Kleinjans J, Botsivali M, Kogevinas M, Merlo DF; NewGeneris consortium. Fetal exposure to dietary carcinogens and risk of childhood cancer: what the newgeneris project tells us. **BMJ** 2015; 351:h4501.

Knapke S, Nagarajan R, Correll J, Kent D, Burns K. Hereditary cancer risk assessment in a pediatric oncology follow-up clinic. **Pediatr Blood Cancer** 2012a; 58:85-9.

Knapke S, Zelle K, Nichols KE, Kohlmann W, Schiffman JD. Identification, management, and evaluation of children with cancer-predisposition syndromes. **Am Soc Clin Oncol Educ Book** 2012b:576-84.

Koch A, Denkhaus D, Albrecht S, Leuschner I, von Schweinitz D, Pietsch T. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. **Cancer Res** 1999; 59:269-73.

Koch A, Weber N, Waha A. Mutations and elevated transcriptional activity of *AXIN2* in hepatoblastomas. **J Pathol** 2004; 204:546-54.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med** 1998; 4:844-7.

Kosaki R, Takenouchi T, Takeda N, et al. Somatic *CTNNB1* mutation in hepatoblastoma from a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome and germline *GPC3* mutation. **Am J Med Genet A** 2014; 164A:993-7.

Kratz CP, Franke L, Peters H, et al. Cancer spectrum and frequency among children with Noonan, Costello, and cardio-facio-cutaneous syndromes. **Br J Cancer** 2015; 112:1392-7.

Krepischi AC, Pearson PL, Rosenberg C. Germline copy number variations and cancer predisposition. **Future Oncol** 2012; 8:441-50.

Krivit W, Good R. Simultaneous occurrence of mongolism and leukemia; report of a nationwide survey. **AMA J Dis Child** 1957; 94:289-93.

Kruh GD. Lustrous insights into cisplatin accumulation: copper transporters. **Clin Cancer Res** 2003; 9:5807-9.

Kubista M, Andrade J, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. **Mol Aspects Med** 2006; 27:95-125.

Kumon K, Kobayashi H, Namiki T, et al. Frequent increase of DNA copy number in the 2q24 chromosomal region and its association with a poor clinical outcome in hepatoblastoma: cytogenetic and comparative genomic hybridization analysis. **Jpn J Cancer Res** 2001; 92:854-62.

Labi V, Erlacher M. How cell death shapes cancer. **Cell Death Dis** 2015; 6:e1675.

Lai M, Burjonrappa S. Perinatal hemorrhage complicating neonatal hepatoblastoma: case report. **J Pediatr Surg** 2012; 47:e29-32.

Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:253-66.

Lang JC, Whitelaw B, Talbot S, Wilkie NM. Transcriptional regulation of the human c-myc gene. **Br J Cancer Suppl** 1988; 9:62-6.

Lange B. The management of neoplastic disorders of haematopoiesis in children with Down's syndrome. **Br J Haematol** 2000; 110:512-24.

Laurenti E, Dick JE. Molecular and functional characterization of early human hematopoiesis. **Ann N Y Acad Sci** 2012; 1266:68-71.

Lee DD, Seung HS. Learning the parts of objects by non-negative matrix factorization. **Nature** 1999; 401:788-91.

Lee H, El Jabbour T, Ainechi S, et al. General paucity of genomic alteration and low tumor mutation burden in refractory and metastatic hepatoblastoma: comprehensive genomic profiling study. **Hum Pathol** 2017; 70:84-91.

Lee JT, Bartolomei MS. X-inactivation, imprinting, and long noncoding RNAs in health and disease. **Cell** 2013; 152:1308-23.

Levene P. The structure of yeast nucleic acid. IV. Ammonia hydrolysis. **J Biol Chem** 1919; 40:415-24.

Levi B, Wan DC, Wong VW, Nelson E, Hyun J, Longaker MT. Cranial suture biology: from pathways to patient care. **J Craniofac Surg** 2012; 23:13-9.

Lewis MT, Ross S, Strickland PA, Snyder CJ, Daniel CW. Regulated expression patterns of *IRX-2*, an Iroquois-class homeobox gene, in the human breast. **Cell Tissue Res** 1999; 296:549-54.

Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics** 2010; 26:589-95.

Libbrecht L, Desmet V, Roskams T. Stages of normal and aberrant intrahepatic bile duct development in a mixed hepatoblastoma. **Histopathology** 2003; 42:618-20.

Lichtman AH. Imunidade mediada pelas células T. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, editores. **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p.93-116.

Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **J Clin Invest** 2007; 117:1175-83.

Lindor NM, McMaster ML, Lindor CJ, Greene MH; National Cancer Institute, Division of Cancer Prevention, Community Oncology and Prevention Trials Research Group. Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes - second edition. **J Natl Cancer Inst Monogr** 2008; (38):1-93.

Liu J, Wang Z, Li X, Zhang X, Zhang C. Inhibition of centrosomal protein 164 sensitizes rhabdomyosarcoma cells to radiotherapy. **Exp Ther Med** 2017; 13:2311-15.

Liu JF, Tsao YT, Hou CH. Fractalkine/CX3CL1 induced intercellular adhesion molecule-1-dependent tumor metastasis through the *CX3CR1/PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B* pathway in human osteosarcoma. **Oncotarget** 2016; 8:54136-48.

Lopes RI, Lorenzo A. Recent advances in the management of Wilms' tumor. **F1000Res** 2017; 6:670.

Lopes LF, de Camargo B, Bianchi A. Late effects of childhood cancer treatment. **Rev Assoc Med Bras (1992)** 2000; 46:277-84.

López-Terrada D, Gunaratne PH, Adesina AM, et al. Histologic subtypes of hepatoblastoma are characterized by differential canonical Wnt and Notch pathway activation in DLK+ precursors. **Hum Pathol** 2009; 40:783-94.

López-Terrada D, Zimmermann A. Current issues and controversies in the classification of pediatric hepatocellular tumors. **Pediatr Blood Cancer** 2012; 59:780-4.

López-Terrada D, Alaggio R, de Dávila MT, Children's Oncology Group Liver Tumor Committee, et al. Towards an international pediatric liver tumor consensus classification: proceedings of the Los Angeles COG liver tumors symposium. **Mod Pathol** 2014; 27:472-91.

Llambi F, Green DR. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the *BCL-2* family. **Curr Opin Genet Dev** 2011; 21:12-20.

Lv CY, Zhou T, Chen W, Yin XD, Yao JH, Zhang YF. Preliminary study correlating *CX3CL1/CX3CR1* expression with gastric carcinoma and gastric carcinoma perineural invasion. **World J Gastroenterol** 2014; 20:4428-32..

Ma X, Liu Y, Liu Y, et al. Pan-cancer genome and transcriptome analyses of 1,699 paediatric leukaemias and solid tumours. **Nature** 2018; 555:371-6.

MacKinlay GA, Pritchard J. A common language for childhood liver tumours. **Pediatr Surg Int** 1992; 7:325-6.

MacRoberts MH. L. H. Bailey's citations to Gregor Mendel. **J Hered** 1984; 75:500-1.

Maibach R. Challenges and Opportunities of International Therapeutic Trials. In: Zimmermann A, Perilongo G, Malogolowkin M, von Schweinitz D, editors. **Pediatric liver tumors**. New York: Springer; 2011. p.201-7.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. **Nature** 2008; 454:436-44.

Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. **Annu Rev Genomics Hum Genet** 2008; 9:387-402.

Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. **Annu Rev Anal Chem** (Palo Alto Calif) 2013; 6:287-303.

Maris JM, Denny CT. Focus on embryonal malignancies. **Cancer Cell** 2002; 2:447-50.

Maris JM, Michael D, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. **Lancet** 2006; 369:2106-20.

Maris JM. Defining why cancer develops in children. **N Engl J Med** 2015; 373:2373-5.

Martincorena I, Roshan A, Gerstung M, et al. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. **Science** 2015; 348:880-6.

Martinelli S, De Luca A, Stellacci E, et al. Heterozygous germline mutations in the CBL tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype. **Am J Hum Genet** 2010; 13; 87:250-7.

Maruyama K, Ikeda H, Koizumi T. Hepatoblastoma associated with trisomy 18 syndrome: a case report and a review of the literature. **Pediatr Int** 2001; 43:302-5.

Maschietto M, De CB, Brentani H; et al. Molecular profiling of isolated histological components of Wilms tumor implicates a common role for the WNT signaling pathway in kidney and tumor development. **Oncology** 2008; 75:81-91.

Maschietto M, Rodrigues TC, Kashiwabara AY, et al. DNA methylation landscape of hepatoblastomas reveals arrest at early stages of liver differentiation and cancer-related alterations. **Oncotarget** 2016; 8:97871-89.

Matsunaga T, Sasaki F, Ohira M, Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor, et al. Analysis of treatment outcome for children with recurrent or metastatic hepatoblastoma. **Pediatr Surg Int** 2003; 19:142-6.

Mayne PD, Kovar IZ. Calcium and phosphorus metabolism in the premature infant. **Ann Clin Biochem** 1991; 28:131-42.

Mclaughlin CC, Baptiste MS, Schymura MJ. Maternal and infant birth characteristics and hepatoblastoma. **Am J Epidemiol** 2006; 163:818-28.

Mclin A, Rankin A, and Zorn M. Repression of Wnt/{beta}-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. **Development** 2007; 134:2207-17.

Medlock ES, Haar JL. The liver hemopoietic environment: I. Developing hepatocytes and their role in fetal hemopoiesis. **Anat Rec** 1983; 207:31-41.

Mélik-Parsadaniantz S, Rostène W. Chemokines and neuromodulation. **J Neuroimmunol** 2008; 198:62-8.

Meyers RL, Katzenstein HM, Krailo M, McGahren ED 3rd, Malogolowkin MH. Surgical resection of pulmonary metastatic lesions in children with hepatoblastoma. **J Pediatr Surg** 2007; 42:2050-6.

Meyers RL, Czauderna P, Otte JB. Surgical treatment of hepatoblastoma. **Pediatr Blood Cancer** 2012; 59:800-8.

Meyers RL, Tiao G, de Ville de Goyet J, Superina R, Aronson DC. Hepatoblastoma state of the art: pre-treatment extent of disease, surgical resection guidelines and the role of liver transplantation. **Curr Opin Pediatr** 2014; 26:29-36.

Meyers RL, Maibach R, Hiyama E, et al. Risk-stratified staging in paediatric hepatoblastoma: a unified analysis from the Children's Hepatic tumors International Collaboration. **Lancet Oncol** 2017; 18:122-31.

Miao J, Kusafuka T, Udatsu Y, Okada A. Sequence variants of the *AXIN* gene in hepatoblastoma. **Hepatol Res** 2003; 25:174-9.

Miki D, Ochi H, Hayes CN, et al. Variation in the *DEPDC5* locus is associated with progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus carriers. **Nat Genet** 2011; 43:797-800.

Miller A, Korem M, Almog R, Galboiz Y. Vitamin B12, demyelination, remyelination and repair in multiple sclerosis. **J Neurol Sci** 2005; 233:93-7.

Miller RW. Wilms' tumor, congenital heart defects, pheochromocytomas and thyroid cancer. **Am J Dis Child** 1968; 116:564-5.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Cancer José de Alencar Gomes da Silva. **Incidência, mortalidade e morbidade hospitalar por câncer: em crianças, adolescentes e adultos jovens no Brasil**. Rio de Janeiro; INCA; 2017. Disponível em: <URL:<https://bit.ly/2BCYYng>> [2018 jan 12]

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Cancer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro; INCA; 2018.

Miousse IR, Koturbash I. The fine LINE: methylation drawing the cancer landscape. **Biomed Res Int** 2015; 2015:131547.

Monga S, Monga H, Tan X, Mule K, Pediaditakis P, and Michalopoulos K. Beta-catenin antisense studies in embryonic liver cultures: role in proliferation, apoptosis, and lineage specification. **Gastroenterology** 2003 124:202-16.

Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. **Immunity** 1994; 1:661-73.

Murakami T, Cardones AR, Hwang ST. Chemokine receptors and melanoma metastasis. **J Dermatol Sci** 2004; 36:71-8.

Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nat Rev Cancer** 2008; 8:618-31.

Mussa A, Chiesa N, Porta F, Baldassarre G, Silengo MC, Ferrero GB. The overlap between Sotos and Beckwith-Wiedemann syndromes. **J Pediatr** 2010; 156:1035-1036.

Nakamura S, Sho M, Kanehiro H, Tanaka T, Kichikawa K, Nakajima Y. Adult hepatoblastoma successfully treated with multimodal treatment. **Langenbecks Arch Surg** 2010; 395:1165-8.

Narod SA, Hawkins MM, Robertson CM, Stiller CA. Congenital anomalies and childhood cancer in Great Britain. **Am J Hum Genet** 1997; 60:474-85.

Nature Video. **Tumour immunology and immunotherapy**. 2015. Available from: <URL:<https://bit.ly/2N98NOF>> [2018 set 15].

[NCI] National Cancer Institute. **Extragenital germ cell tumors treatment (PDQ®)**. Health Professional Version. Updated: February 25, 2015. Available from: <URL:<https://bit.ly/2SZDkmW>> [2018 set 15].

[NCI] National Cancer Institute. **Childhood liver cancer treatment (PDQ®)**. Health Professional Version. Updated: November 28, 2018 Available from: <URL:<https://bit.ly/2V2SeGG>> [2018 set 15].

[NCI] National Cancer Institute. **Children cancer**. Updated: September 25 2018. Available from: <URL:<https://bit.ly/1KEStiH>> [2018 ago 15].

[NHGRI] National Human Genome Research Institute. **The cost of sequencing a human genome**. Available from: <URL:<https://bit.ly/1U15yDW>> [2018 set 15].

Ng A, Griffiths A, Cole T, et al. Congenital abnormalities and clinical features associated with Wilms' tumour: a comprehensive study from a centre serving a large population. **Eur J Cancer** 2007; 43:1422-9.

Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, Breast Cancer Working Group of the International Cancer Genome Consortium, et al. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. **Cell** 2012; 149:979-93.

Norwood MS, Lupo PJ, Chow EJ, et al. Childhood cancer risk in those with chromosomal and non-chromosomal congenital anomalies in Washington State: 1984-2013. **PLoS One** 2017; 12:e0179006.

Northcott PA, Buchhalter I, Morrissy AS, et al. The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. **Nature** 2017; 547:311-7.

Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science** 1976; 194:23-8.

Nunes G. Arterite de Takayasu: tratamento com anti-TNF em uma casuística brasileira. **Rev Bras Reumatol** 2010; 50:291-8.

O'Hayre M, Salanga CL, Handel TM, Allen SJ. Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. **Biochem J** 2008; 409:635-49.

Ohno H, Takimoto G, McKeithan TW. The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. **Cell** 1990; 60:991-7.

Olivieri EH, Franco Lde A, Pereira RG, Mota LD, Campos AH, Carraro DM. Biobanking practice: RNA storage at low concentration affects integrity. **Biopreserv Biobank** 2014; 12:46-52.

Oishi N, Yamashita T, Kaneko S. Molecular biology of liver cancer stem cells. **Liver Cancer** 2014; 3:71-84.

Ortega JA, Douglass EC, Feusner JH, et al. Randomized comparison of cisplatin/vincristine/fluorouracil and cisplatin/continuous infusion doxorubicin for treatment of pediatric hepatoblastoma: a report from the Children's Cancer Group and the Pediatric Oncology Group. **J Clin Oncol** 2000; 18:2665-75.

Otte JB, Pritchard J, Aronson DC, International Society of Pediatric Oncology (SIOP), et al. Liver transplantation for hepatoblastoma: results from the International Society of Pediatric Oncology (SIOP) study SIOPEL-1 and review of the world experience. **Pediatr Blood Cancer** 2004; 42:74-83.

Paaby AB; Rockman MV. The many faces of pleiotropy. **Trends Genet** 2016 29:66-73.

Pai SG, Carneiro BA, Mota JM, et al. Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. **J Hematol Oncol** 2017; 10:101.

Pakakasama S, Tomlinson GE. Genetic predisposition and screening in pediatric cancer. **Pediatr Clin North Am** 2002; 49:1393-413.

Pan YR, Lee EY. UV-dependent interaction between *CEP164* and *XPA* mediates localization of *CEP164* at sites of DNA damage and UV sensitivity. **Cell Cycle** 2009; 8:655-64.

Pang D, McNally R, Birch JM. Parental smoking and childhood cancer: results from the United Kingdom Childhood Cancer Study. **Br J Cancer** 2003. 88:373-81.

Patel LR, Nykter M, Chen K, Zhang W. Cancer genome sequencing: understanding malignancy as a disease of the genome, its conformation, and its evolution. **Cancer Lett** 2013; 340:152-60.

Pavlova NN, Thompson CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism. **Cell Metab** 2016; 23:27-47.

Pearson K. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. In: Kotz S, Johnson NL, editors. **Breakthroughs in statistics. springer series in statistics (perspectives in statistics)**. New York: Springer; 1992. p.157-75.

Pereira EM, Marion R, Ramesh KH, Kim JS, Ewart M, Ricafort R. Hepatoblastoma in a mosaic trisomy 18 patient. **J Pediatr Hematol Oncol** 2012; 34:e145-8.

Pérez-Mancera PA, Young AR, Narita M. Inside and out: the activities of senescence in cancer. **Nat Rev Cancer** 2014; 14:547-58.

Perilongo G, Brown J, Shafford E, et al. Hepatoblastoma presenting with lung metastases: treatment results of the first cooperative, prospective study of the International Society of Paediatric Oncology on childhood liver tumors. **Cancer** 2000; 89:1845-53.

Perilongo G, Malogolowkin M, Feusner J. Hepatoblastoma clinical research: lessons learned and future challenges. **Pediatr Blood Cancer** 2012; 59:818-21.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res** 2002; 30:e36.

Pham TA, Gallo AM, Concepcion W, Esquivel CO, Bonham CA. Effect of liver transplant on long-term disease-free survival in children with hepatoblastoma and hepatocellular cancer. **JAMA Surg** 2015; 150:1150-8.

Pickles JC, Hawkins C, Pietsch T, Jacques TS. CNS embryonal tumours: WHO 2016 and beyond. **Neuropathol Appl Neurobiol** 2018; 44:151-62.

Pilati C, Letouzé E, Nault JC. Genomic profiling of hepatocellular adenomas reveals recurrent FRK-activating mutations and the mechanisms of malignant transformation. **Cancer Cell** 2014; 25:428-41.

Pincus M, Brandtrauf P, Koslosky W, Appruzzese W. Oncoproteínas e detecção precoce de tumores. In: Henry JB, editor. **Diagnósticos clínicos & tratamento por métodos laboratoriais**. 20<sup>a</sup> ed. Manole; 2008. p.1542-54.

Pinto RB, Ramos AR, Backes AN, et al. Hirschsprung disease and hepatoblastoma: case report of a rare association. **Sao Paulo Med J** 2016; 134:171-5.

Plackett RL. Karl Pearson and the Chi-Squared Test. **Int Statistical Rev** 1983; 51:59-72.

Pritchard J, Brown J, Shafford E, et al. Cisplatin, doxorubicin, and delayed surgery for childhood hepatoblastoma: a successful approach--results of the first prospective study of the International Society of Pediatric Oncology. **J Clin Oncol** 2000; 18:3819-28.

Prokurat A, Kluge P, Kościeszka A, Perek D, Kappeler A, Zimmermann A. Transitional liver cell tumors (TLCT) in older children and adolescents: a novel group of aggressive hepatic tumors expressing beta-catenin. **Med Pediatr Oncol** 2002; 39:510-8.

Pu C, Guo C, Jin X. Retrospective analysis of maternal and infant birth features of hepatoblastoma patients. **Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi** 2009; 17:459-61.

Rahman N. Realizing the promise of cancer predisposition genes. **Nature** 2014; 505:302-8. Erratum in: **Nature** 2014; 510:176.

Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. **Vet Pathol** 2005; 42:405-26.

RARECARE. **Surveillance of Rare Cancers in Europe**. Available from: <URL:<http://www.rarecare.eu>> [2018 out 10]

Rasmussen SA, Yazdy MM, Carmichael SL, Jamieson DJ, Canfield MA, Honein MA. Maternal thyroid disease as a risk factor for craniosynostosis. **Obstet Gynecol** 2007; 110:369-77.

Reefhuis J, Devine O, Friedman JM, Louik C, Honein MA, National Birth Defects Prevention S. Specific SSRIs and birth defects: Bayesian analysis to interpret new data in the context of previous reports. **BMJ** 2015; 351:h3190.

Regel I, Eichenmüller M, Joppien S, et al. *IGFBP3* impedes aggressive growth of pediatric liver cancer and is epigenetically silenced in vascular invasive and metastatic tumors. **Mol Cancer** 2012; 11:9.

Reyes JD, Carr B, Dvorchik I, et al. Liver transplantation and chemotherapy for hepatoblastoma and hepatocellular cancer in childhood and adolescence. **J Pediatr** 2000; 136:795-804.

Richardson S, Browne ML, Rasmussen SA, et al. Associations between periconceptional alcohol consumption and craniosynostosis, omphalocele, and gastroschisis. **Birth Defects Res a Clin Mol Teratol** 2011; 91:623-30.

Ricketts CJ, De Cubas AA, Fan H, et al. The cancer genome atlas comprehensive molecular characterization of renal cell carcinoma. **Cell Rep** 2018; 23:3698.

Roberts JM, Pearson GD, Cutler JA, Lindheimer MD, National Heart Lung and Blood Institute. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. **Hypertens Pregnancy** 2003; 22:109-27.

Robertson KD. DNA methylation and human disease. **Nat Rev Genet** 2005; 6:597-610.

Rodrigues TC, Fidalgo F, da Costa CM, et al. Upregulated genes at 2q24 gains as candidate oncogenes in hepatoblastomas. **Future Oncol** 2014; 10:2449-57.

Rodrigues TC. **Anomalias genéticas e epigenéticas no tumor embrionário hepatoblastoma**. São Paulo; 2014. [Tese de doutorado-Universidade de São Paulo]

Rollins BJ. Chemokines. **Blood** 1997; 90:909-28.

Rosales RA, Drummond RD, Valieris R, Dias-Neto E, da Silva IT. signeR: an empirical Bayesian approach to mutational signature discovery. **Bioinformatics** 2017; 33:8-16.

Rose EA, Glaser T, Jones C, et al. Complete physical map of the WAGR region of 11p13 localizes a candidate Wilms' tumor gene. **Cell** 1990; 60:495-508.

Rougemont AL, McLin VA, Toso C, Wildhaber BE. Adult hepatoblastoma: learning from children. **J Hepatol** 2012; 56:1392-403.

Rushton J, López-Terrada D. Molecular and genetic basis of childhood cancer. **Cancer Biomark** 2010; 9:211-34.

Ruteshouser EC, Huff V. Familial Wilms tumor. **Am J Med Genet C Semin Med Genet** 2004; 129C:29-34.

Rutsch F, Gailus S, Miousse IR, et al. Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B12 metabolism. **Nat Genet** 2009; 41:234-9.

Sakamoto LH, de Camargo B, Cajaiba M, Soares FA, Vettore AL. *MTIG* hypermethylation: a potential prognostic marker for hepatoblastoma. **Pediatr Res** 2010; 67:387-93.

Saletta F, Seng MS, Lau LM. Advances in paediatric cancer treatment. **Transl Pediatr** 2014; 3:156-82.

Sameshima Y, Tsunematsu Y, Watanabe S, et al. Detection of novel germline p53 mutations in diverse-cancer-prone families identified by selecting patients with childhood adrenocortical carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 1992; 84:703-7.

Sanchez-Vega F, Mina M, Armenia J, et al. Oncogenic signaling pathways in the cancer genome atlas. **Cell** 2018; 173:321-337.e10.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1977; 74:5463-7.

Schieve LA, Meikle SF, Ferre C, Peterson HB, Jeng G, Wilcox LS. Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. **N Engl J Med** 2002; 346:731-7.

Schiffman JD, Geller JI, Mundt E, Means A, Means L, Means V. Update on pediatric cancer predisposition syndromes. **Pediatr Blood Cancer** 2013; 60:1247-52.

Schlessinger DI, Bhimji SS. **Embryology, epidermis**. [Updated 2017 Oct 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 Jan-. Available from: <URL:<https://bit.ly/2SyC5vE>> [2018 set 12]

Schneider NR, Cooley LD, Finegold MJ, Douglass EC, Tomlinson GE. The first recurring chromosome translocation in hepatoblastoma: der(4)t(1;4)(q12;q34). **Genes Chromosomes Cancer** 1997; 19:291-4.

Schulze K, Imbeaud S, Alexandrov L, Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. **Nat Genet** 2015; 47:505-11.

Schwarze K, Buchanan J, Taylor JC, Wordsworth S. Are whole-exome and whole-genome sequencing approaches cost-effective? A systematic review of the literature. **Genet Med** 2018; 20:1122-30.

Secretan B, Straif K, Baan R, et al. A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. **Lancet Oncol** 2009; 10:1033-4.

Semeraro M, Branchereau S, Maibach R, et al. Relapses in hepatoblastoma patients: clinical characteristics and outcome--experience of the International Childhood Liver Tumour Strategy Group (SIOPEL). **Eur J Cancer** 2013; 49:915-22.

Sergi CM, Caluseriu O, McColl H, Eisenstat DD. Hirschsprung's disease: clinical dysmorphology, genes, micro-RNAs, and future perspectives. **Pediatr Res** 2017; 81:177-91.

Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. **Nat Biotechnol** 2008; 26:1135-45.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics 2017. **CA Cancer J Clin** 2017; 67:7-30.

Silva AG, Krepschi AC, Pearson PL, Hainaut P, Rosenberg C, Achatz MI. The profile and contribution of rare germline copy number variants to cancer risk in Li-Fraumeni patients negative for *TP53* mutations. **Orphanet J Rare Dis** 2014; 9:63.

Sivasubramaniam S, Sun X, Pan YR, Wang S, Lee EY. *CEP164* is a mediator protein required for the maintenance of genomic stability through modulation of *MDC1*, *RPA*, and *CHK1*. **Genes Dev** 2008; 22:587-600.

Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. **Adv Immunol** 2006; 90:1-50.

Soma LA, Gollin SM, Remstein ED, et al. Splenic small B-cell lymphoma with *IGH/BCL3* translocation. **Hum Pathol** 2006; 37:218-30.

Sorahan T, Lancashire R. Parental cigarette smoking and childhood risks of hepatoblastoma: OSCC data. **Br J Cancer** 2004; 90:1016-8.

Soukup SW, Lampkin BL. Trisomy 2 and 20 in two hepatoblastomas. **Genes Chromosomes Cancer** 1991; 3:231-4.

Spector LG, Feusner JH, Ross JA. Hepatoblastoma and low birth weight. **Pediatr Blood Cancer** 2004; 43:706.

Spector LG, Johnson KJ, Soler JT. Perinatal risk factors for hepatoblastoma. **Br J Cancer** 2008; 98:1570-3.

Spector LG, Puumala SE, Carozza SE. Cancer risk among children with very low birth weights. **Pediatrics** 2009; 124:96-104.

Spector LG, Birch J. The epidemiology of hepatoblastoma. **Pediatr Blood Cancer** 2012; 59:776-9.

Stejskalová E, Malis J, Snajdauf J, et al. Cytogenetic and array comparative genomic hybridization analysis of a series of hepatoblastomas. **Cancer Genet Cytogenet** 2009; 194:82-7.

Stejskalova L, Pavek P. The function of cytochrome P450 1A1 enzyme (CYP1A1) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the placenta. **Curr Pharm Biotechnol** 2011; 12:715-30.

Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. **Blood** 2015; 126:9-16.

Stewart BW, Wild CP. **World Cancer Report: 2014**. Lyon: IARC; 2014.

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

Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. **Nature** 2009; 458:719-24.

Stringer M, Goldstein R, Filly R, et al. Fetal diaphragmatic hernia without visceral herniation. **J Pediatr Surg** 1995; 30:1264-6.

Suerink M, Ripperger T, Messiaen L, et al. Constitutional mismatch repair deficiency as a differential diagnosis of neurofibromatosis type 1: consensus guidelines for testing a child without malignancy. **J Med Genet** 2019; 56:53-62.

Sugawara W, Haruta M, Sasaki F, et al. Promoter hypermethylation of the *RASSF1A* gene predicts the poor outcome of patients with hepatoblastoma. **Pediatr Blood Cancer** 2007; 49:240-9.

Suksaweang S, Lin C, Jiang T, Hughes W, Widelitz B, Chuong M. Morphogenesis of chicken liver: identification of localized growth zones and the role of beta-catenin/Wnt in size regulation. **Dev Biol** 2004; 266:109-22.

Sumazin P, Chen Y, Treviño LR, et al. Genomic analysis of hepatoblastoma identifies distinct molecular and prognostic subgroups. **Hepatology** 2017; 65:104-21.

Tam AL, Lim HJ, Wistuba II, et al. Image-guided biopsy in the era of personalized cancer care: Proceedings from the Society of Interventional Radiology Research Consensus Panel. **J Vasc Interv Radiol** 2016; 27:8-19.

Tan X, Yuan Y, Zeng G, et al. Beta-Catenin deletion in hepatoblasts disrupts hepatic morphogenesis and survival during mouse development. **Hepatology** 2008; 47:1667-79.

Tang C, Zelenak C, Völkl J, et al. Hydration-sensitive gene expression in brain. **Cell Physiol Biochem** 2011; 27:757-68.

Taniguchi T, Sullivan MJ, Ogawa O, Reeve AE. Epigenetic changes encompassing the *IGF2/H19* locus associated with relaxation of *IGF2* imprinting and silencing of *H19* in Wilms tumor. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1995; 92:2159-63.

Tanimura M, Matsui I, Abe J, et al. Increased risk of hepatoblastoma among immature children with a lower birth weight. **Cancer Res** 1998; 58:3032-5.

Toguchida J, Yamaguchi T, Dayton SH, et al. Prevalence and spectrum of germline mutations of the p53 gene among patients with sarcoma. **N Engl J Med** 1992; 326:1301-8.

Tomasetti C, Vogelstein B, Parmigiani G. Half or more of the somatic mutations in cancers of self-renewing tissues originate prior to tumor initiation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2013; 110:1999-2004.

Tomasetti C and Vogelstein B. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. **Science** 2015; 347:78-81.

Tomlinson GE, Douglass EC, Pollock BH, Finegold MJ, Schneider NR. Cytogenetic evaluation of a large series of hepatoblastomas: numerical abnormalities with recurring aberrations involving 1q12-q21. **Genes Chromosomes Cancer** 2005; 44:177-84.

Tonk VS, Wilson KS, Timmons CF, Schneider NR. Trisomy 2, trisomy 20, and del(17p) as sole chromosomal abnormalities in three cases of hepatoblastoma. **Genes Chromosomes Cancer** 1994; 11:199-202.

Toretsky JA, Zitomersky NL, Eskenazi AE, et al. Glypican-3 expression in Wilms tumor and hepatoblastoma. **J Pediatr Hematol Oncol** 2001; 23:496-9.

Tremblay KD, Zaret KS. Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. **Dev Biol** 2005; 280:87-99.

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

Trobaugh-Lotrario AD, Katzenstein HM. Chemotherapeutic approaches for newly diagnosed hepatoblastoma: past, present, and future strategies. **Pediatr Blood Cancer** 2012; 59:809-12.

Trobaugh-Lotrario AD, Chaiyachati BH, Meyers RL, et al. Outcomes for patients with congenital hepatoblastoma. **Pediatr Blood Cancer** 2013; 60:1817-25.

Trobaugh-Lotrario AD, Meyers RL, Feusner JH. Outcomes of Patients with Relapsed Hepatoblastoma Enrolled on Children's Oncology Group (COG) Phase I and II Studies. **J Pediatr Hematol Oncol** 2016; 38:187-90.

Trobaugh-Lotrario AD, López-Terrada D, Li P, Feusner JH. Hepatoblastoma in patients with molecularly proven familial adenomatous polyposis: clinical characteristics and rationale for surveillance screening. **Pediatr Blood Cancer** 2018; 65:e27103.

Truong B, Green AL, Friedrich P, et al. Ethnic, racial, and socioeconomic disparities in retinoblastoma. **JAMA Pediatr** 2015; 169:1096-104.

Turcotte LM, Georgieff MK, Ross JA, et al. Neonatal medical exposures and characteristics of low birth weight hepatoblastoma cases: a report from the Children's Oncology Group. **Pediatr Blood Cancer** 2014; 61:2018-23.

Udatsu Y, Kusafuka T, Kuroda S, Miao J, Okada A. High frequency of beta-catenin mutations in hepatoblastoma. **Pediatr Surg Int** 2001; 17:508-12.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol** 2002; 3:RESEARCH0034.

Van Tornout JM, Buckley JD, Quinn JJ, et al. Timing and magnitude of decline in alpha-fetoprotein levels in treated children with unresectable or metastatic hepatoblastoma are predictors of outcome: a report from the Children's Cancer Group. **J Clin Oncol** 1997; 15:1190-7.

Veeman M, Daxelrod J, Randall T. A second canon: functions and mechanisms of  $\beta$ -catenin-independent WNT signaling. **Cell** 2003; 5:367-77.

Venkatramani R, Spector LG, Georgieff M, et al. Congenital abnormalities and hepatoblastoma: a report from the Children's Oncology Group (COG) and the Utah Population Database (UPDB). **Am J Med Genet A** 2014; 164A:2250-5.

Venturi A, Piscaglia F, Vidili G, et al. Diagnosis and management of hepatic focal nodular hyperplasia. **J Ultrasound** 2007; 10:116-27.

Villani A, Greer MC, Kalish JM, et al. Recommendations for cancer surveillance in individuals with RASopathies and other rare genetic conditions with increased cancer risk. **Clin Cancer Res** 2017; 23:e83-e90.

Villanueva A, Newell P, Hoshida Y. Inherited hepatocellular carcinoma. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 2010; 24:725-34.

Vissers LE, Bonetti M, Paardekooper Overman J, et al. Heterozygous germline mutations in *A2ML1* are associated with a disorder clinically related to Noonan syndrome. **Eur J Hum Genet** 2015; 23:317-24.

Vogelstein B. Cancer: a deadly inheritance. **Nature** 1990; 348:681-2.

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. **Science** 2013; 339:1546-58.

von Schweinitz D, Hecker H, Harms D, et al. Complete resection before development of drug resistance is essential for survival from advanced hepatoblastoma--a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB-89. **J Pediatr Surg** 1995a; 30:845-52.

von Schweinitz D, Glüer S, Mildenerger H. Liver tumors in neonates and very young infants: diagnostic pitfalls and therapeutic problems. **Eur J Pediatr Surg** 1995b; 5:72-6.

Vuong AM, Shinde MU, Brender JD, National Birth Defects Prevention Study Investigators, et al. Prenatal exposure to nitrosatable drugs, dietary intake of nitrites, and preterm birth. **Am J Epidemiol** 2016; 183:634-42.

Waggoner D. Mechanisms of disease: epigenesis. **Semin Pediatr Neurol** 2007; 14:7-14.

Wallingford J, Habas R. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. **Development** 2005; 132:4421-36.

Wang LL, Filippi RZ, Zurakowski D, et al. Effects of neoadjuvant chemotherapy on hepatoblastoma: a morphologic and immunohistochemical study. **Am J Surg Pathol** 2010; 34:287-99.

Wang Z, Liu Q, Wilson CL, et al. Polygenic determinants for subsequent breast cancer risk in survivors of childhood cancer: The St Jude Lifetime Cohort Study (SJLIFE). **Clin Cancer Res** 2018; 24:6230-3.

Ward CJ, Yuan D, Masyuk TV, et al. Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. **Hum Mol Genet** 2003; 12:2703-10.

Ward CJ, Yuan D, Masyuk TV, et al. Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. **Hum Mol Genet** 2003; 12:2703-10.

Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. J.D. Watson and F.H.C. Crick. Published in Nature, number 4356 April 25 1953. **Nature** 1974; 248:765.

Weinberg AG, Finegold MJ. Primary hepatic tumors of childhood. **Hum Pathol** 1983; 14:512-37.

Wimmer K, Kratz CP, Vasen HF, EU-Consortium Care for CMMRD (C4CMMRD), et al. Diagnostic criteria for constitutional mismatch repair deficiency syndrome: suggestions of the European consortium 'care for CMMRD' (C4CMMRD). **J Med Genet** 2014; 51:355-65.

Wood LD, Parsons DW, Jones S, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. **Science** 2007; 318:1108-13.

Woodfield SE, Shi Y, Patel RH, et al. A novel cell line based orthotopic xenograft mouse model that recapitulates human hepatoblastoma. **Sci Rep** 2017; 7:17751.

Wu GX, Lin YM, Zhou TH, Gao H, Pei G. Significant down-regulation of alpha-albumin in human hepatoma and its implication. **Cancer Letters** 2000; 160:229-36.

Wu JT, Roan Y, Knight JA. Serum levels of AFP in normal infants: their clinical and physiological significance. In: Mizejewski GJ, Porter I, editors. **Alfa-fetoprotein and congenital disorders**. New York: Academic Press; 1985. p.111-22.

Wu M, Yu S. New insights into the molecular mechanisms targeting tubular channels/transporters in *PKD* Development. **Kidney Dis (Basel)** 2016; 2:128-35.

Xavier AC, Taub JW. Acute leukemia in children with Down syndrome. **Haematologica** 2010; 95:1043-5.

Xavier AC, Ge Y, Taub J. Unique clinical and biological features of leukemia in Down syndrome children. **Expert Rev Hematol** 2010; 3:175-86.

Xia Z, Lu Y, Li X, Mao T, Chen XM, Zhou R. Upregulation of *KSRP* by miR-27b provides IFN- $\gamma$ -induced post-transcriptional regulation of *CX3CL1* in liver epithelial cells. **Sci Rep** 2015; 5:17590.

Xu X, Huang P, Yang B, Wang X, Xia J. Roles of *CXCL5* on migration and invasion of liver cancer cells. **J Transl Med** 2014; 12:193.

[WHO] World Health Organization. **Global nutrition targets 2025: low birth weight policy brief**. Washington: WHO; 2014. [WHO reference number: WHO/NMH/NHD/14.5]

Wang X. Apoptose. In: Alberts B, editor. **Biologia molecular da célula**. 5<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed; 2010. p.1115-27.

Yadav A, Gupta A, Yadav S, et al. Association of Wnt signaling pathway genetic variants in gallbladder cancer susceptibility and survival. **Tumour Biol** 2016; 37:8083-95.

Yamada N, Yasui K, Dohi O, et al. Genome-wide DNA methylation analysis in hepatocellular carcinoma. **Oncol Rep** 2016; 35:2228-36.

Yamanaka Y, Wilson EM, Rosenfeld RG, Oh Y. Inhibition of insulin receptor activation by insulin-like growth factor binding proteins. **J Biol Chem** 1997; 272:30729-34.

Yang Y, Hou J, Shao M, et al. *CXCL5* as an autocrine or paracrine cytokine is associated with proliferation and migration of hepatoblastoma HepG2 cells. **Oncol Lett** 2017; 14:7977-85.

Yoon JM, Burns RC, Malogolowkin MH, Mascarenhas L. Treatment of infantile choriocarcinoma of the liver. **Pediatr Blood Cancer** 2007; 49:99-102.

Yuan Y, Van Allen EM, Omberg L, et al. Assessing the clinical utility of cancer genomic and proteomic data across tumor types. **Nat Biotechnol** 2014; 32:644-52.

Yuan Y, Liu L, Chen H, et al. Comprehensive characterization of molecular differences in cancer between male and female patients. **Cancer Cell** 2016; 29:711-722.

Zatkova A, Rouillard JM, Hartmann W, et al. Amplification and overexpression of the *IGF2* regulator *PLAG1* in hepatoblastoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2004; 39:126-37.

Zeiger JS, Beaty TH, Hetmanski JB, et al. Genetic and environmental risk factors for sagittal craniosynostosis. **J Craniofac Surg** 2002; 13:602-6.

Zhang H, Zhang H, Zhang Y, et al. Dishevelled-DEP domain interacting protein (DDIP) inhibits Wnt signaling by promoting *TCF4* degradation and disrupting the TCF4/beta-catenin complex. **Cell Signal** 2010; 22:1753-60.

Zhang J, Walsh MF, Wu G, et al. Germline mutations in predisposition genes in pediatric cancer. **N Engl J Med** 2015; 373:2336-2346.

Zhang MZ, Mai W, Li C, et al. *PKHD1* protein encoded by the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease associates with basal bodies and primary cilia in renal epithelial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004; 101:2311-6.

Zhao R, Duncan SA. Embryonic development of the liver. **Hepatology** 2005; 41:956-67.

Zhou X, Edmonson MN, Wilkinson MR, et al. Exploring genomic alteration in pediatric cancer using ProteinPaint. **Nat Genet** 2016; 48:4-6.

Ziapour P, Ataei R, Shadifar M, et al. New intracellular and molecular aspects in pathophysiology of colorectal cancer. **Gastroenterol Hepatol Bed Bench** 2011; 4:43-52.

Zimmermann A. Hepatoblastoma with cholangioblastic features ('cholangioblastic hepatoblastoma') and other liver tumors with bimodal differentiation in young patients. **Med Pediatr Oncol** 2002; 39:487-91.

Zlotnik A. Chemokines and cancer. **Int J Cancer** 2006; 119:2026-9.

Zorn AM. Liver development. In: StemBook [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008. Available from: <URL:<https://bit.ly/2tnMD1H>> [2018 set 12]

Zsíros J, Maibach R, Shafford E, et al. Successful treatment of childhood high-risk hepatoblastoma with dose-intensive multiagent chemotherapy and surgery: final results of the SIOPEL-3HR study. **J Clin Oncol** 2010; 28:2584-90.

Zynger DL, Gupta A, Luan C, Chou PM, Yang GY, Yang XJ. Expression of glypican 3 in hepatoblastoma: an immunohistochemical study of 65 cases. **Hum Pathol** 2008; 39:224-30.

---

*ANEXOS*

---

## Anexos 1 e 2 - Artigos publicados

### Anexo 1

#### **The genetic and epigenetic landscapes of hepatoblastomas**

Authors: Talita Ferreira Marques Aguiar, Thaise Nayane Carneiro, Cecilia Maria Lima da Costa, Carla Rosenberg, Isabela Werneck da Cunha and Ana Cristina Victorino Krepischi. **Applied Cancer Research** 2017; 37:20

### Anexo 2

#### **Atypical presentation of a germline APC mutation in a child with supratentorial primitive neuroectodermal tumor**

Authors: Aguiar TF, Barbosa-Teixeira AC, Costa SS, Ezquina S, Gimenez TM, Novak E, Cristofani LM, Rosenberg C, Odone Filho V, Krepischi ACV. **Pediatr Blood Cancer**. 2018 Dec 4:e27566. doi: 10.1002/pbc.27566. PMID: 30511453

REVIEW

Open Access



# The genetic and epigenetic landscapes of hepatoblastomas

Talita Ferreira Marques Aguiar<sup>1</sup>, Thaise Nayane Carneiro<sup>2</sup>, Cecilia Maria Lima da Costa<sup>3</sup>, Carla Rosenberg<sup>2</sup>, Isabela Werneck da Cunha<sup>4</sup> and Ana Cristina Victorino Krepischi<sup>2\*</sup>

## Abstract

Primary liver cancers are rare in children, and the most common type is hepatoblastoma (HB), an embryonal tumor with histological features that resemble different stages of liver cell differentiation. However, mainly because of its rarity, molecular data on HB tumorigenesis remain scarce. This article reviews the current knowledge regarding genetic and epigenetic alterations reported in HB cases, with emphasis on the recent findings of next-generation sequencing studies.

**Keywords:** Embryonal cancer, Hepatoblastoma, Pediatric liver tumor, Genetic predisposition, Mutation, Epigenetics

## Background

Cancer cells are characterized by the acquisition of several capacities during the stages of tumorigenesis [1], including maintenance of proliferation signaling, inhibition of growth suppressors, resistance to cell death, induction of angiogenesis, activation of invasive and metastatic pathways, ability to evade immunological destruction and modification of cellular metabolism. These features are the outcome of the progressive accumulation of somatic mutations in key genes, a process that generally requires long periods of time [1]. In tumors of adults, most mutations triggering tumorigenesis are often due to DNA repair dysfunction due to aging as well as exposure to environmental factors such as cigarette smoke, chemicals and ultraviolet radiation.

Although neoplasia is rare in children, it is the leading cause of death among young people in developed countries. For example, in the United States, 15,789 children and adolescents (up to 19 years old) were diagnosed with cancer in 2014, and 1,960 died from the disease [2]. It is estimated that approximately 10% of all tumors in children are driven by inherited mutations, with a portion being associated with known genetic syndromes, such as Li-Fraumeni and Beckwith-Wiedemann, which

confer an increased risk of developing certain types of tumors [2].

Embryonal tumor, a subtype of pediatric cancer, is defined mainly by its presumptive origin from partially undifferentiated primordial cells that have undergone genetic mutations [3]. The major hypothesis of origin is based on the occurrence of signaling errors that prevent both cell maturation and differentiation during embryonic development. These molecular defects during organogenesis could lead to either malformation of the organ or development of an embryonal tumor.

This article reviews the current knowledge regarding the major genetic and epigenetic alterations that occur in the genome of hepatoblastomas (HBs), an embryonal liver tumor. We discuss novel genomic data for HB, with emphasis on the recent findings of next-generation sequencing and their implications for HB tumorigenesis.

## Main text

### Prevalence and clinical features of hepatoblastomas

Primary liver cancers are rare in children. HB is the most common type, representing approximately 1% of all cancers in this age group [4]. According to a US study [5] carried out between 2002 and 2008, approximately 10 of every one million children under one year of age are affected by HB. The diagnosis is based primarily on ultrasound and CT scan following detection of an increased abdominal mass; symptoms include anorexia, weight loss and pain [6]. An elevated level of  $\alpha$ -

\* Correspondence: ana.krepischi@ib.usp.br

<sup>2</sup>Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



fetoprotein (AFP), a major component of the carcinoembryonic proteome [7], is considered a HB marker as well as a prognostic factor [8].

Regarding histological features, HBs can be highly variable both within and between cases with epithelial and stromal components. The epithelial component can be embryonal or fetal, the stromal component is composed of connective tissue and even heterologous elements such as bone, cartilage and skeletal muscle are usually found. HBs are classified according to their components. Mixed stromal and epithelial subtype is the most common (approximately 44% of cases). Among pure epithelial, a combination of embryonal and fetal type epithelia can also be found in different proportions. Purely fetal HBs account for 31% of the cases, and embryonal type accounts for 19% of the tumors. Macrotrabecular tumors, which are infrequent and need to be distinguished from hepatocellular carcinoma (HCCs), and small cell undifferentiated type, account for only 3% of HBs, each [9]. An important aspect is the differential diagnosis between HBs occurring in elder children (>5 years old) and HCCs. In these cases, the presence of a stromal component, which is exclusively found on HBs, is a major feature to distinguish HCCs from HBs.

Between 1975 and 2010, childhood cancer mortality decreased by more than 50% [10], and this statistic is also valid for HB, because most cases are responsive to chemotherapy, with reductions in both tumor mass and AFP serum levels. Indeed, preoperative chemotherapy can completely eradicate metastatic pulmonary disease and multinodular liver disease. A relevant milestone in HB was the risk stratification of patients that allowed differential treatments.

Historically, four independent groups proposed trials for HB treatment: the International Childhood Liver Tumor Strategy Group (SIOPEL); the Children's Oncology Group (COG), and its derived groups: the Children's Cancer Group (CCG) and the Pediatric Oncology Group (POG); the German Society for Pediatric Oncology and Hematology (GPOH); and the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumors (JPLT) [11]. All groups contributed to HB management collecting data that have been used to associate clinical characteristics with different disease outcomes. Some characteristics that predict for worse outcomes, the 'poor' prognostic factors, have been identified across groups, such as metastatic disease at enrollment [12–15]; however, some risk factors achieved statistical significance in certain group studies, while remaining non-significant in others [12–15].

A review published in 2014 [16] summarizes the studies carried out by SIOPEL trials, which in 1990 established the preoperative chemotherapy for all cases, and introduced radiology-based staging called PRETEXT (PRETreatment EXTent of disease). This first trial was

called SIOPEL 1 and collected data about 194 patients during four years, investigating the role of the cisplatin/doxorubicin combination chemotherapy [17]. The PRETEXT is based on pretreatment imaging with ultrasound and CT scans and/or magnetic resonance imaging, and describes the site and size of the tumor, invasion of the vessels and distant spread; the system identifies four PRETEXT stages (I–IV), which reflect the number of liver sections that are affected by the tumor [13, 18]. SIOPEL 1 data also showed that two risk groups could be distinguished: the standard risk patients, with resectable tumors and no metastases, and the high-risk patients, with either unresectable tumors and/or metastasis, or low AFP. Following, SIOPEL 2 (1994–1998) introduced a patient stratification for treatment based on the two risk categories; standard risk patients were treated with cisplatin alone to avoid the cardiotoxicity associated with doxorubicin, whereas high-risk patients were treated with the combination of cisplatin/doxorubicin/carboplatin [19]. Other SIOPEL trials have occurred [20, 21], and current trial is SIOPEL 6, with standard risk patients [22].

The progress in the genomic research leads to the development of individualized strategies for the management of many types of cancer, based on specific biomarkers. However, in very rare tumors, like HB, the identification of biomarkers with impact on prognosis and treatment remains very challenging. Besides AFP levels, the main risk factors significantly associated with HB are clinical features. The Children's Hepatic tumors International Collaboration (CHIC) was launched to address the challenge of the development of biologic markers, and the identification of reliable prognostic risk factors for tailoring treatment, in very rare tumors, like hepatoblastomas. A centralized online platform merged data from eight completed hepatoblastoma trials with a total of 1,605 cases treated between 1988 and 2008 [23]. Using the resulting database, increased risk was detected for adverse disease outcome for PRETEXT IV tumors, macrovascular venous or portal involvement, contiguous extrahepatic disease, primary tumor multifocality, and tumor rupture. Risk factors associated with the worst outcome were higher age ( $\geq 8$  years), low AFP ( $< 100$  ng/ml), and metastatic disease. The novel prognostic factors that were identified, as well as the established factors, will be used to develop a future common global risk stratification system.

#### **Environmental and genetic risk factors**

Although the etiology of embryonal tumors has not been fully clarified, evidence supports the hypothesis of failure in the normal process of differentiation during fetal or postnatal development [3, 24]. Several studies have investigated the role of environmental factors during pregnancy that could be causally related to HB development

[5], including pre-eclampsia [25], maternal overweight condition during pregnancy [26, 27], and treatment for infertility [26]. However, the only factor consistently associated with increased HB risk is low weight at birth [5] and prematurity [23] followed by tobacco consumption during pregnancy; the two latter may also be related to low weight at birth [5].

In adult tumors, the current simplified hypothesis of cancer origin is accumulation of somatic mutations acquired over time [28]. In contrast, the development of pediatric tumors occurs over brief periods, suggesting the existence of either genetic predisposition or highly penetrant somatic mutations in undifferentiated cells [29]. Indeed, some genetic syndromes present an increased predisposition for HB development due to the presence of germline mutations. These syndromic patients correspond to approximately 15% of all HB cases [30]. Familial adenomatous polyposis (FAP), a cancer predisposition syndrome caused by germline mutations in the *APC* gene, is associated with HB in children 0-4 years of age [30, 31], with an estimated risk of HB development in FAP patients of 0.42% [32]. A study on 93 patients who developed HB published in 2005 identified eight (8.6%) cases in families with early-onset colon cancer or multiple colon polyps, features that suggest that FAP and *APC* germline mutations were present in these patients [33]. Interestingly, there was an apparent over representation of mutations in the 5' region of *APC* in these cases. Beckwith-Wiedemann syndrome is an overgrowth syndrome associated with predisposition to the development of embryonal tumors, including Wilm's tumor, neuroblastoma, adrenocortical carcinoma and HB [34, 35]. The relative risk of developing HB in this syndrome is 2-3 times higher than in the general population, and the underlying molecular defect is related to dysfunction of the imprinting mechanism at the 11p15.5 region, which contains the *H19* and *IGF2* genes [36]. The role of *H19* and *IGF2* in sporadic HBs (not related to genetic syndromes) has been investigated in some studies that seek to compare expression of these genes between HBs and normal liver [37, 38]. Two other syndromes of growth disorder that were already associated with HB are Sotos, caused by mutations or deletions of the *NSD1* gene, located at 5q35 [39], and Simpson-Golabi-Behmel, caused by mutations in the *GPC3* gene, located at Xq26 [40].

Interestingly, a few cases of HB have been reported in children with trisomy of chromosome 18 (Edwards Syndrome) [41-45]. Given the rarity of the two conditions, such findings suggest an etiologic association rather than a random occurrence.

### Genomic alterations

#### Cytogenetic findings

Whole-chromosome aneuploidy is a common feature of HBs; the most common gains affect chromosomes 2, 8,

and 20 [16], whereas the most frequent genomic loss is of chromosome 18 [16]. It is still not well established whether HB tumorigenesis is driven by changes in the copy number of genes mapped to these aneuploidies or whether such chromosomal changes already reflect mitotic errors inherent to HB development [46-48].

Structural chromosomal rearrangements have also been observed in HBs, such as the recurrent translocation der (4) t (1;4) (q12;q34) in three cases described by Schneider et al. in 1997 [49]. At least one focal rearrangement, 2q24 gain, is a relatively frequent copy number alteration in HB genomes, correlating with tumor aggressiveness. Our group [50] has recently evaluated the pattern of chromosomal gains and losses in samples of sporadic HBs using array-CGH, and we delineated a critical region of 10 Mb at 2q24, which harbors several genes. Among these genes, *DAPL1* and *ERMN* exhibited overexpression in HBs as compared to control livers, suggesting their potential relevance to this type of tumor.

#### Genetic findings and next-generation sequencing studies

Pediatric tumors harbor an average number of non-synonymous mutations that is generally lower than the number detected in adult solid tumors, with approximately only 9.6 mutations per sample [28]. The proposed explanation for such a small number of mutations is based on two main assumptions. Firstly, pediatric tumors probably arise early from undifferentiated precursor cells, leading to tumor development in a short period [51]. Secondly, mutations in pediatric tumors would be more penetrant than those arising in adult tumors [52].

In 1999, Koch and co-workers [53] studied a group of 52 tumors, reporting a recurrent mutation in *CTNNB1*, currently the most frequent mutation reported for HBs. The *CTNNB1* gene, located at 3p21, encodes the cytosolic protein  $\beta$ -catenin, plays an important role in cell adhesion and communication [53], and is also involved in Wnt signaling [54]. Wnt signaling is closely related to embryonic development, promoting cell growth and division (proliferation) and acting in cell differentiation. The *CTNNB1* mutations reported in HB result in the absence of  $\beta$ -catenin degradation and migration to the nucleus, with activation of the canonical Wnt pathway in events not related to embryonic development [55].

The *AXIN1* and *AXIN2* genes, downstream components of the Wnt pathway that also participate in the degradation of  $\beta$ -catenin, were reported to be mutated in some cases of HB [56-58]. In addition, mutations were described in the *PIK3CA* gene, and in growth factors of this signaling pathway, such as *IGF2*, showing altered expression in this tumor type [59].

Next-generation sequencing (NGS) has greatly accelerated the identification of driver genes in cancer,

including those related to HB tumorigenesis. Overall, the exome studies performed to date have revealed a very low frequency of somatic mutations in HBs (<5 mutations per tumor) even compared to other pediatric tumors [60].

Jia et al. published [51] exome sequencing data from six HB samples, identifying 24 non-synonymous somatic mutations affecting 21 different genes. Among these mutations, they described a novel alteration in *CTNNB1* (G512V), two different mutations in a proposed novel HB gene, *CAPRN2* (R968H/S969), and nucleotide changes in Ubiquitin ligase complex-related genes (*SPOP*, *KLHL22*, *TRPC4AP* and *RNF169*). In this work, the protein level of  $\beta$ -catenin was found to be increased in the nucleus of HB cells overexpressing *CAPRN2*, both wild-type and mutant forms, indicating activation of the Wnt pathway. The authors also employed a shRNA-mediated loss-of-function screening strategy to identify potential cancer-associated genes, performing proliferation assays with HepG2 and HUH-6 cell lines. Knock-down of *SPOP*, *OR511* and *CDC20B* significantly promoted proliferation in both cell lines, suggesting that although *CAPRN2* may be an oncogene, *SHOP*, *OR511* and *CDC20B* could represent novel tumor suppressors in HB.

Three other HB exome sequencing studies [60–62] have been published. The first study on HBs was conducted by Eichenmuller et al. [60], who investigated 15 samples of HB and three cases of an aggressive subtype of HB (HCC-like) that affects children over 5 years of age, and exhibits clinical and histopathological features that resemble hepatocellular carcinoma [63]. The authors described a relatively simple genome for HBs, with only ~2.9 mutations per tumor, particularly affecting *CTNNB1* (12/15 cases) and *NFE2L2* (2/15 cases) genes. *NFE2L2* encodes a protein recognized by the complex KEAP1/CUL3, which is active in proteasomal degradation.

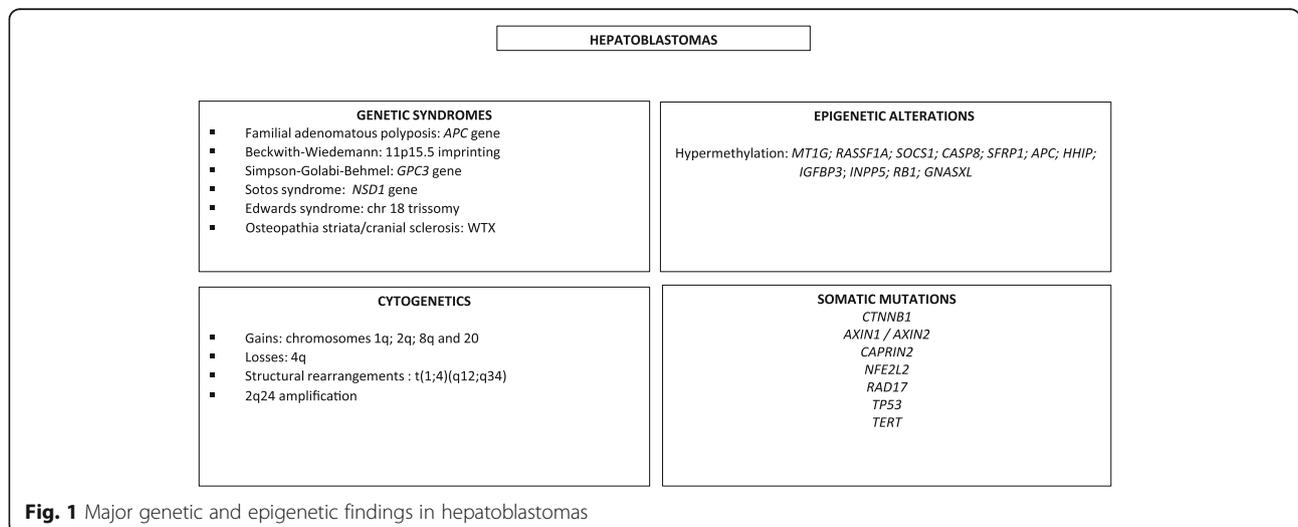
The identified *NFE2L2* mutations alter the structure of the protein, which is not recognized by the KEAP1/CUL3 complex and thus accumulates in the cytoplasm. Immunohistochemical analysis confirmed this effect, showing that *NFE2L2* overexpression occurs in association with vascular invasion and metastasis. In addition to *CTNNB1* and *NFE2L2* mutations, the *TERT* promoter was found to be mutated in this tumor cohort, and deletions were detected in *RAD17* and *TP53*.

Fujita et al. [61] reported a patient that had been with osteopathia striata, cranial sclerosis, and HB. A nonsense heterozygous mutation was identified in *WTX* (*c.1045C > T p.Glu349*), a tumor suppressor gene related to Wilm's tumor. The somatic *WTX* mutation identified in the HB was also present in peripheral blood DNA, indicating that a germline mutation was responsible for the syndromic signs, and probably associated with the HB development in this case.

A third study by Kosaki et al. [62] involved HB exome sequencing for a patient diagnosed with Simpson-Golabi-Behmel syndrome. The authors detected a *CTNNB1* somatic mutation (p.Ile35Ser), previously reported in HBs and other cancer types [44]. The patient was also carrier of a germline mutation in *GPC3*, a gene already known to cause Simpson-Golabi-Behmel syndrome. Changes in *GPC3* expression have been associated with several forms of cancer. In particular, this gene is overexpressed in hepatocellular carcinoma [64], representing an important diagnostic biomarker.

**Epigenetics**

DNA methylation is a major epigenetic control mechanism of gene expression that involves the addition of a covalent methyl radical to the cytosine carbon 5 via the action of DNA methyltransferase enzymes (*DNMTs*) [65, 66]. The methylation patterns in differentiated cells are generally



stable and inheritable during development. However, at least two events of overall methylation pattern reprogramming occur through removal of these epigenetic marks followed by new methylation [67] in both embryogenesis and gametogenesis. This reprogramming seems to have a crucial role in establishing differentiation potential of cells, as well as specific expression patterns in different tissues [68]. Aberrant DNA methylation patterns have been associated with several diseases, including cancer [69]. The anomalous methylation pattern often detected in tumor samples [70–72] are characterized by global hypomethylation, mainly affecting repetitive sequences, and specific promoter hypermethylation in early stages of tumorigenesis and throughout cancer progression [73], as an alternative mechanism for tumor suppressor gene inactivation. To date, HBs have remained largely unexplored regarding DNA methylation profile, both in coding and repetitive sequences. Methylation studies have identified hypermethylation in several gene promoters, including *MTIG*, that showed a significant correlation with poor prognosis [73]; *RASSF1A*, which plays a role as a tumor suppressor [74], and *SOCS1*, *CASP8*, *SFRP1*, *APC*, *HHIP* and *IGFBP3* [73, 75, 76]. Additionally, a high frequency of *H19* gene inactivation has been reported in HBs, including promoter hypermethylation [77].

A recent study [78] of HB evaluated the level of methylation of 33 differentially methylated regions subjected to imprinting. Compared to control livers, hypomethylation at specific loci was detected both in tumors and in the adjacent normal tissues, suggesting that hypomethylation may precede neoplastic growth. However, hypermethylation of *INPP5*, *RBI* and *GNASXL* was observed as exclusive tumor events. This work also analyzed the level of methylation of the repetitive sequence *LINE-1*, which is usually hypomethylated in solid tumors. Except for a very low level hypomethylation in the first CpG of *LINE-1*, no significant differences were observed between HBs, adjacent normal tissues and normal livers. The authors suggested that the absence of *LINE-1* hypomethylation could reflect a distinct mechanism for the development of embryonal tumors.

Comprehensive methylation studies of HB genomes are still required to clarify a possible link between HB tumorigenesis and changes in methylation.

## Conclusions

The box below summarizes the main genetic findings already disclosed for HB (Fig. 1). The paucity of genetic alterations can be explained using the most accepted model of the origin of embryonal tumors, which suggests that oncogenesis probably occurs in yet undifferentiated cells. Thus, fewer mutational events would be required in comparison to adult solid tumors, thereby exhibiting a type of “shortcut” for tumorigenesis.

Some current studies are focusing on strategies that could highlight common underlying events for both organ development and tumorigenesis. Such research lines seek to strengthen the hypothesis that embryonal tumors have an intrauterine/perinatal origin. However, full characterization of the mutational burden of HBs is warranted to define how these genetic and epigenetics changes may disrupt development and influence tumorigenesis.

## Abbreviations

AFP: α-fetoprotein; CCG: Children’s cancer group; CHIC: Children’s hepatic tumors international collaboration; COG: Children’s oncology group; DNMTs: DNA methyltransferase enzymes; FAP: Familial adenomatous polyposis; GPOH: German society for pediatric oncology and haematology; HB: Hepatoblastoma; HCC: Hepatocellular carcinoma; JPLT: Japanese study group for pediatric liver tumors; NGS: Next-generation sequencing; POG: Pediatric oncology group; PRETEXT: Pretreatment extent of disease; SIOPEL: Société internationale d’oncologie pédiatrique—epithelial liver tumor study group.

## Acknowledgements

Not applicable.

## Funding

Not applicable.

## Availability of data and materials

Not applicable.

## Authors’ contributions

TFMA is a PhD student and contributed to the research and organization of all information used in the text also contributed formatting and article design; TN is master’s degree student and contributed to the research and organization of all information used in the text; CMLC is a pediatricist and contributed to the review and improvement of clinical and epidemiological data presented in the text; CR is a biologist and contributed to the improvement of information on next Generation sequencing, as well as revision of the text; IWC is a pathologist and contributed to the improvement of information related to pathology; ACVK is biologist and contributed to the research and organization of all information used in the text, formatting, design and revising it, and is the corresponding author. All authors read and approved the final manuscript.

## Authors’ information

Not applicable.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Consent for publication

Not applicable.

## Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

## Publisher’s Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Author details

<sup>1</sup>International Center for Research, A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil. <sup>2</sup>Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>3</sup>Department of Oncology Pediatric, A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil. <sup>4</sup>Department of Pathology, A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil.

Received: 29 December 2016 Accepted: 5 May 2017

Published online: 23 May 2017

## References

- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
- Ward E, Desantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics. *Cancer J Clin*. 2014;64(2):83–103.
- Maris JM, Denny CT. Focus on embryonal malignancies. *Cancer Cell*. 2002;2:447–50.
- Stiller CA, Pritchard J, Steliarova-Foucher E. Liver cancer in European children: incidence and survival, 1978–1997. Report from the automated childhood cancer information system project. *Eur J Cancer*. 2006;42:115–123.
- Spector LG, Birch J. The epidemiology of hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;59(5):776–9.
- Exelby PR, Filler RM, Grosfeld JL. Liver tumors in children in the particular reference to hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: American academy of pediatrics surgical section survey. *J Pediatr Surg*. 1975;10:329–37.
- Wu JT, knight JA. Alpha-fetoprotein: its use in clinical medicine ASCP check sample. *Clin Chem*. 1987;27:1.
- Van Tornout JM, Buckley JD, Quinn JJ, et al. Timing and magnitude of decline in alpha-fetoprotein levels in treated children with unresectable or metastatic hepatoblastoma are predictors of outcome: a report from the Children's cancer group. *J Clin Oncol*. 1997;15:1190–7.
- Terrada D, Alaggio R, Dávila MT. Towards an international pediatric liver tumor consensus classification: proceedings of the Los Angeles COG liver tumors symposium. *Mod Pathol*. 2014;27:472–91.
- Smith MA, Altekruze SF, Adamson PC, et al. Declining childhood and adolescent cancer mortality. *Cancer*. 2014;16:2497–506.
- Perilongo G, Malogolowkin M, Feusner J. Hepatoblastoma clinical research: lessons learned and future challenges. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;59:818e21.
- Fuchs J, Ryzdzynski J, von Schweinitz D, Bode U, Hecker H, Weinel P, et al. Pretreatment prognostic factors and treatment results in children with hepatoblastoma. A report of the German cooperative paediatric liver tumor study HB-94. *Cancer*. 2002;95:172e82.
- Aronson DC, Schnater JM, Staalman CR, Weverling GJ, Plaschkes J, Perilongo G, et al. Predictive value of the pretreatment extent of disease system in hepatoblastoma: results from the international society of pediatric oncology liver tumor study group SIOPEL-1 study. *J Clin Oncol*. 2005;23:1245e52.
- Meyers RL, Rowland JR, Krailo M, Chen Z, Katzenstein HM, Malogolowkin MH. Pretreatment prognostic factors in hepatoblastoma: a report of the Children's oncology group. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;53:1016e22.
- Maibach R, Roebuck D, Brugieres L, Capra M, Brock P, Dall'igna P, et al. Prognostic stratification for children with hepatoblastoma: the SIOPEL experience. *Eur J Cancer*. 2012;48:1543e9.
- Czauderna P, Lopez-Terrada D, Hiyama E, et al. Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy. *Curr Opin Pediatr*. 2014;26:19–28.
- Guglielmi M, Perilongo G, Cecchetto G, Rondelli R, Lanino E, Siracusa F, et al. Rationale and results of the international society of pediatric oncology (SIOP) Italian pilot study on childhood hepatoma: surgical resection d'emblee or after primary chemotherapy? *J Surg Oncol Suppl*. 1993;3:122–6.
- Roebuck DJ, Aronson D, Clapuyt P, Czauderna P, de Ville de Goyet J, Gauthier F, et al. International childhood liver tumor strategy group 2005 PRETEXT: a revised staging system for primary malignant liver tumors of childhood developed by the SIOPEL group. *Pediatr Radiol*. 2007;37:123–32.
- Perilongo G, Shafford E, Maibach R, et al. Risk adapted treatment for childhood hepatoblastoma: final report of the second study of the international society of pediatric oncology, SIOPEL 2. *Eur J Cancer*. 2004;40:411–21.
- Zsiros J, Maibach R, Shafford E, et al. Successful treatment of childhood high-risk hepatoblastoma with dose-intensive multiagent chemotherapy and surgery: final results of the SIOPEL-3HR study. *J Clin Oncol*. 2010;28:2584–90.
- Zsiros J, Brugieres L, Brock P, Roebuck D, Maibach R, Zimmermann A, Childs M, Pariente D, Laithier V, Otte JB, Branchereau S, Aronson D, Rangaswami A, Ronghe M, Casanova M, Sullivan M, Morland B, Czauderna P, Perilongo G. Dose-dense cisplatin-based chemotherapy and surgery for children with high-risk hepatoblastoma (SIOPEL-4): a prospective, single-arm, feasibility study. International childhood liver Tumours strategy group (SIOPEL). *Lancet Oncol*. 2013;14(9):834–42.
- Perilongo G, Maibach R, Shafford E, et al. Cisplatin versus cisplatin plus doxorubicin for standard risk hepatoblastoma. *N Engl J Med*. 2009;361:1662–70.
- Meyers RL, Maibach R, Hiyama E, Häberle B, Krailo M, Rangaswami A, Aronson DC, Malogolowkin MH, Perilongo G, von Schweinitz D, Ansari M, Lopez-Terrada D, Tanaka Y, Alaggio R, Leuschner I, Hishiki T, Schmid I, Watanabe K, Yoshimura K, Feng Y, Rinaldi E, Saraceno D, Derosa M, Czauderna P. Risk-stratified staging in paediatric hepatoblastoma: a unified analysis from the Children's hepatic tumors international collaboration. *Lancet Oncol*. 2016;S1470–2045(16):30598–8.
- Maschietto M, de Camargo B, Brentani H, Grundy P, Sredni ST, Torres C, Mota LD, Cunha IW, Patrão DF, Costa CM, Soares FA, Brentani RR, Carraro DM. Molecular profiling of isolated histological components of wilms tumor implicates a common role for the Wnt signaling pathway in kidney and tumor development. *Oncology*. 2008;75(1–2):81–91.
- Ansell P, Mitchell CD, Roman E. Relationships between perinatal and maternal characteristics and hepatoblastoma: a report from the UKCCS. *Eur J Cancer*. 2005;41:741–48.
- McLaughlin CC, Baptiste MS, Schymura MJ. Maternal and infant birth characteristics and hepatoblastoma. *Am J Epidemiol*. 2006;163:818–28.
- Pu CL, Guo CB, Jin XQ. Retrospective analysis of maternal and infant birth features of hepatoblastoma patients. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2009;17:459–61.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339:1546–58.
- Davenport KP, Blanco FC, Sandler AD. Pediatric malignancies: neuroblastoma, Wilm's tumor, hepatoblastoma, rhabdomyosarcoma, and sacrococcygeal teratoma. *Surg Clin North Am*. 2012;92:745–67.
- Kingston JE, Herbert A, Draper GJ, et al. Association between hepatoblastoma and polyposis coli. *Arch Dis Child*. 1983;58:959–62.
- Garber JE, Li FP, Kingston JE, et al. Hepatoblastoma and familial adenomatous polyposis. *J Natl Cancer Inst*. 1988;80:1626–628.
- Hughes LJ, Michels VV. Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis. *Am J Med Genet*. 1992;43:1023–25.
- Hirschman BA, Pollock BH, Tomlinson GE. The spectrum of APC mutations in children with Hepatoblastoma from familial adenomatous polyposis kindreds. *J Pediatr*. 2005;147:263–66.
- Beckwith J. Macroglossia, Omphalocele, adrenal cytomegaly, gigantism and hyperplastic visceromegaly. *Birth Defects*. 1969;5:188–96.
- Wiedemann H. Complexe malformatif familial avec hernie ombilicale et macroglossie—“un syndrome nouveau?”. *J Genet Hum*. 1964;13:223–32.
- Bliek J, Gicquel C, Maas S. Epigenotyping as a tool for the prediction of tumor risk and tumor type in patients with beckwith-Wiedemann syndrome (BWS). *J Pediatr*. 2004;145:796–99.
- Fukuzawa R, Umezawa A, Ochi K, et al. High frequency of inactivation of the imprinted H19 gene in “sporadic” hepatoblastoma. *Int J Cancer*. 1999;82:490–97.
- Ross JA, Rakloff GA, Davies SM. H19 and IGF-2 allele-specific expression in hepatoblastoma. *Br J Cancer*. 2000;82:753–56.
- Kato M, Takita J, Takahashi K, et al. Hepatoblastoma in a patient with Sotos syndrome. *J Pediatr*. 2009;155:937–39.
- Toretzky JA, Zitomersky NL, Eskenazi AE, et al. Glypican-3 expression in wilms tumor and hepatoblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2001;23:496–99.
- Dasouki M, Barr M. Trisomy 18 and hepatic neoplasia. *Am J Med Genet*. 1987;7:203–05.
- Mamlok V, Nichols M, Lockhart L, et al. Trisomy 18 and hepatoblastoma. *Am J Med Genet*. 1989;33:125–26.
- Teraguchi M, Nogi S, Ikemoto Y, et al. Multiple hepatoblastomas associated with trisomy 18 in a 3-year-old girl. *Pediatr Hematol Oncol*. 1997;14:463–67.
- Bove K, Soukup S, Ballard E, et al. Hepatoblastoma in a child with trisomy 18: Cytogenetics, liver anomalies and literature review. *Pediatr Pathol Lab Med*. 1996;16:253–62.
- Maruyama K, Ikeda H, Koizumi T. Hepatoblastoma associated with trisomy 18 syndrome: a case report and a review of the literature. *Pediatr Int*. 2001;43:302–5.
- Soukup SW, Lampkin BL. Trisomy 2 and 20 in two hepatoblastomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 1991;3:231–34.
- Tonk VS, Wilson KS, Timmons CF, et al. Trisomy 2, trisomy 20, and del (17p) as sole chromosomal abnormalities in three cases of hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994;11:199–202.
- Tomlinson GE, Douglass EC, Pollock BH, et al. Cytogenetic analysis of a large series of hepatoblastoma: numerical aberrations with recurring translocations involving 1q12-21. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;44:177–84.
- Schneider NR, Cooley LD, Finegold MJ, et al. The first recurring chromosome translocation in hepatoblastoma: der (4) t (1;4) (q12;q34). *Genes Chromosomes Cancer*. 1997;19:291–94.

50. Rodrigues TC, Fidalgo F, da Costa CML, Ferreira EN, da Cunha IW, Carraro DM, Krepischki ACV, Rosenberg C. Upregulated genes at 2q24 gain as candidate oncogenes in hepatoblastomas. *Future Oncol.* 2014;10(15):2449–57.
51. Jia D, Dong R, Jing Y, Xu D, Wang Q, Chen L, Li Q, Huang Y, Zhang Y, Zhang Z, Liu L, Zheng S, Xia Q, Wang H, Dong K, He X. Exome sequencing of hepatoblastoma reveals novel mutations and cancer genes in the Wnt pathway and ubiquitin ligase complex. *Hepatology.* 2014;60(5):1686–96.
52. Tomasetti C, Vogelstein B, Parmigiani G. Half or more of the somatic mutations in cancers of self-renewing tissues originate prior to tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(6):1999–2004.
53. Koch A, Denkhaus D, Albrecht S, et al. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res.* 1999;59:26973.
54. Udatsu Y, Kusafuka T, Kuroda S, et al. High frequency of beta-catenin mutations in hepatoblastoma. *Pediatr Surg Int.* 2001;17:508–12.
55. Park WS, Oh RR, Park JY, et al. Nuclear localization of beta-catenin is an important prognostic factor in hepatoblastoma. *J Pathol.* 2001;193:83–90.
56. Koch A, Weber N, Waha A, et al. Mutations and elevated transcriptional activity of conductin (AXIN2) in hepatoblastomas. *J Pathol.* 2004;204:546–54.
57. Miao J, Kusafuka T, Udatsu Y, et al. A. Sequence variants of the Axin gene in hepatoblastoma. *Hepatol. Res.* 2003;25:174–9.
58. Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, et al. Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene.* 2002;21:4863–71.
59. Hartmann W, Kuchler J, Koch A, et al. Activation of phosphatidylinositol-3'kinase/AKT signaling is essential in hepatoblastoma survival. *Clin Cancer Res.* 2009;15:4538–45.
60. Eichenmuller M, Trippel F, Kreuder M, Beck A, Schwarzmayr T, Haberle B, et al. The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies with HCC-like features. *J Hepatol.* 2014;61:1312–20.
61. Fujita A, Ochi N, Fujimaki H, et al. A novel WTX mutation in a female patient with osteopathia striata with cranial sclerosis and hepatoblastoma. *Am J Med Genet A* 2014.
62. Kosaki R, Takenouchi T, Takeda N, Kagami M, Nakabayashi K, Hata K, Kosaki K. Somatic CTNBN1 mutation in hepatoblastoma from a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome and germline GPC3 mutation. *Am J Med Genet A.* 2014;164A(4):993–7. doi:10.1002/ajmg.a.36364.
63. Prokurat A, Kluge P, Kosciesza A, et al. Transitional liver cell tumors (TLCT) in older children and adolescents: a novel group of aggressive hepatic tumors expressing betacatenin. *MedPediatr Oncol.* 2002;39:510–8.
64. Midorikawa Y, Ishikawa S, Iwanari H, et al. Glypican-3, overexpressed in hepatocellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling. *Int J Cancer.* 2003;103:455–65.
65. Branco MR, Ficiz G, REIK W. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nat Rev Genet.* 2012;13:7–13.
66. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2012;13:484–92.
67. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet.* 2013;14:204–20.
68. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science.* 2001;293:1089–93.
69. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet.* 2005;6:597–610.
70. Ponder BA. Cancer genetics. *Nature.* 2001;411:336–41.
71. Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:607–20.
72. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet.* 2006;7:21–33.
73. Sakamoto LH, De Camargo B, Cajaiba M, Soares FA, Vettore AL. MT1G hypermethylation: a potential prognostic marker for hepatoblastoma. *Pediatr Res.* 2010;67:387–93.
74. Honda S, Miyagi H, Suzuki H, Minato M, Haruta M, Kaneko Y, Hatanaka KC, Hiyama E, Kamijo T, Okada T, Taketomi A. RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients. *Pediatr Surg Int.* 2013;29:1147–52.
75. Regel I, Eichenmuller M, Joppien S, Liebl J, Haberle B, Muller-Hocker J, Vollmar A, Von SD, Kappler R. IGFBP3 impedes aggressive growth of pediatric liver cancer and is epigenetically silenced in vascular invasive and metastatic tumors. *Mol Cancer.* 2012;11:9.
76. Tomlinson GE, Kappler R. Genetics and epigenetics of hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2012;59:785–92.
77. Honda S, Arai Y, Haruta M, Sasaki F, Ohira M, Yamaoka H, Horie H, Nakagawara A, Hiyama E, Todo S, Kaneko Y. Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypermethylation of the H19 differentially methylated region in hepatoblastoma. *Br J Cancer.* 2008;99:1891–99.
78. Rumbajan JM, Maeda T, Souzaki R, Mitsui K, Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Nishioka K, Harada R, Aoki S, Kohashi K, Oda Y, Hata K, Saji T, Taguchi T, Tajiri T, Soejima H, Joh K. Comprehensive analyses of imprinted differentially methylated regions reveal epigenetic and genetic characteristics in hepatoblastoma. *BMC Cancer.* 2013;13:608.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)

