

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DA
REGIÃO PROMOTORA DE GENES EM
HEPATOBLASTOMA**

LUÍS HENRIQUE TOSHIHIRO SAKAMOTO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de mestre**

Área de concentração: Oncologia

**Orientador: Dr. André Luiz Vettore de Oliveira
Co-Orientador: Profa. Dra. Beatriz de Camargo**

**São Paulo
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Sakamoto, Luís Henrique Toshihiro

Avaliação do perfil de metilação da região promotora de genes em hepatoblastoma / Luís Henrique Toshihiro Sakamoto - São Paulo, 2008.

84p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: André Luiz Vettore de Oliveira

Descritores: 1. HEPATOBLASTOMA. 2. METILAÇÃO DO DNA. 3. METALOTIONEINA. 4. REGIÕES PROMOTORAS (GENÉTICA).

“A falsa ciência gera ateus; a verdadeira ciência leva os homens a se curvar diante da divindade.”

Voltaire

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus queridos pais e àquelas que dão sentido à minha vida: Ivana e Mariana.

À vocês com muito amor e carinho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Meus eternos agradecimentos aos meus queridos pais pelo amor, carinho e apoio incondicionais e por me fazerem entender que o conhecimento é o maior bem que os pais podem dar aos filhos.

À minha amada alma-gêmea Ivana pelo carinho, incentivo e por agüentar as minhas idas e vindas de Brasília para São Paulo.

Ao meus sogro, sogra e cunhados pelo apoio nesta jornada.

Aos meus amigos-irmãos: Gustavo, Martinho, Bruno e Sidney pela amizade e momentos de descontração em Brasília.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por toda a felicidade pessoal e profissional que ele tem me proporcionado. Também agradeço por todos os percalços que Ele colocou em meu caminho, pois eles me fizeram crescer e valorizar o produto de meu esforço. Também agradeço por ter colocado nesse caminho pessoas maravilhosas às quais devo muito do que sou hoje.

Parafraseando Issac Newton, se hoje sou um pouco melhor do que ontem foi porque me apoiei sobre ombros de gigantes.

Agradeço ao meu orientador Dr. André Vettore, por ter aberto as portas de seu laboratório e, mesmo sabendo que minha formação era essencialmente médica e não laboratorial, aceitou o desafio de me orientar em uma dissertação na área de biologia molecular. Muito obrigado!

Meus sinceros agradecimentos e admiração à minha co-orientadora Profa. Dra. Beatriz de Camargo que sempre me incentivou em minha formação como oncologista pediátrico e pesquisador. Certamente não teria chegado até aqui sem você.

Ao Dr. André Lopes Carvalho, meus agradecimentos pelas proveitosas discussões sobre metilação e pela ajuda com as análises estatísticas do trabalho.

À Dra. Vilma Martins pelo apoio e ensinamentos em biologia celular e molecular.

Agradeço também aos meus atuais colegas de trabalho do Núcleo de Onco-hematologia Pediátrica da SES-DF/Brasília: Raquel, Paula e José Carlos, por terem me incentivado a vir para São Paulo fazer a residência médica em oncologia pediátrica e, principalmente, à Dra. Isis Quezado Magalhães pelo incentivo e apoio prestados desde a época da universidade.

Ao término do mestrado, percebo que o caminho foi, para mim, muito mais importante do que o destino. Ao longo dessa “estrada laboratorial” aprendi muito, mas, principalmente, conheci pessoas às quais serei eternamente grato.

Encontrei pessoas maravilhosas, cuja amizade pretendo levar para o resto da vida. Muito obrigado à vocês: Claudinha, Robertinha, Val Andrade, Carol, Alex e Dani.

À minha amiga e colega de profissão Viviane Sonaglio pelo apoio e companheirismo nos momentos difíceis da residência médica e do mestrado.

Não posso deixar de agradecer também ao Fabrício Carvalho e Luciane Kagohara por me ensinarem não só a técnica da MSP-Q, mas também várias outras técnicas de laboratório. Aprendi muito com vocês!

Aos colegas de laboratório: Andréa Seixas, Andréa Trevisan, Fábio Piccoli, Benjamin Heck, Cinthia Couto, Emerson, Marianna Rettori, Valéria Paixão, Maria Isabel Achatz, Fernanda Góes, Luciana Pinto, Roberta Felix, Ivete, Ivania, Simone e Manuela, muito obrigado pelo apoio, convivência, ensinamento e pelos momentos de descontração.

Muito obrigado também aos demais colegas e funcionários do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, em nome da Dra. Luisa Lina Villa, por terem proporcionado um ambiente de pesquisa adequado ao meu trabalho.

Agradeço também ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo, em nome do Dr. Fernando Augusto Soares e ao Departamento de Anatomia Patológica da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo por terem fornecido as amostras do meu trabalho.

Um agradecimento especial à colega Mariana Cajaiba que realizou as revisões das lâminas do meu estudo.

Às queridas meninas da Biblioteca do Hospital A. C. Camargo: Suely Francisco, Francyne Pólen e Rosinéia Aguiar pela atenção e paciência na busca dos “milhares” de artigos que solicitei ao longo desses anos e pela ajuda na correção e formatação desta dissertação.

À todos do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do Hospital A. C. Camargo, em nome da Sra. Irde Contesini, por todo o auxílio na busca por prontuários e coleta de dados.

Agradeço também à SOBOPE (Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica) pelo fornecimento dos dados clínicos dos nossos pacientes escritos nos Protocolos SIOPEL. Obrigado Sandra e Cida pela ajuda.

Aos membros da minha banca de qualificação, Dra. Gilda Porta e Dra. Cláudia Rainho, pela leitura dos relatórios e pelas proveitosas sugestões.

Agradeço também à Pós-graduação da Fundação Antônio Prudente, em nome do Dr. Luiz Fernando Lima Reis, pela oportunidade de ter feito parte deste programa de mestrado e por toda assistência prestada. Agradecimentos especiais à Ana Maria Kuninari e Luciana Pitombeira pela paciência e ajuda prestada desde o início.

Ao CNPQ e ao Instituto Ludwig pelo apoio financeiro à esta pesquisa.

Agradeço também à Banca Julgadora pelo tempo prestado à leitura e avaliação dessa dissertação.

RESUMO

Sakamoto LHT. **Avaliação do perfil de metilação da região promotora de genes em hepatoblastoma**. São Paulo; 2008. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

O hepatoblastoma é o tumor maligno hepático mais comum em crianças, entretanto constitui apenas 1% do total de neoplasias na infância. Sua baixa frequência, portanto, dificulta a realização de estudos clínicos e pesquisas de novas estratégias terapêuticas. Os fatores prognósticos relevantes para essa doença estão relacionados, quase exclusivamente, ao grau de ressecabilidade tumoral, não existindo, até o momento, dados suficientes para a inclusão de fatores biológicos na estratificação dos pacientes por grupos de risco. Estudos de microarray que compararam o perfil de expressão de hepatoblastomas com tecido hepático normal, mostraram que grande parte dos genes diferencialmente expressos estava, de fato, hipoexpressa, o que pode, hipoteticamente, sugerir a interferência de mecanismos de silenciamento genético como, por exemplo, a hipermetilação do DNA. A técnica de MSP-Q foi utilizada na avaliação do perfil de metilação de 25 genes em 20 amostras parafinadas de hepatoblastomas. Observou-se a presença de hipermetilação de ilhas CpG em mais de 25% das amostras para 8 genes (*APC*, *CCND2*, *CDH1*, *COX2*, *HIN1*, *MT1G*, *RASSF1A* e *SOCS1*). A análise dos dados clínicos em conjunto com a pesquisa de metilação mostrou não haver correlação entre a presença de metilação em *APC*, *RASSF1A*, *SOCS1* e *MT1G* e variáveis clínicas clássicas. No entanto, tanto a presença quanto o nível de metilação de *MT1G* apresentou uma correlação inversa com as taxas de sobrevida globais dos pacientes em questão. À saber, este foi o primeiro relato de hipermetilação da região promotora de *MT1G* em hepatoblastomas e de sua associação com o prognóstico da doença.

SUMMARY

Sakamoto LHT. **[Gene promoter hypermethylation pattern in patients with hepatoblastoma]**. São Paulo; 2008. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Hepatoblastoma is the most common malignant liver tumor in childhood. Nevertheless, it comprises 1% of all cancers in this age group. Because its low frequency, there are few clinical trials and new drugs research. Few prognostic factors were related to hepatoblastoma. Most of them are related to resectability. Microarray studies comparing different expression patterns in hepatoblastoma samples and normal liver tissue show that most of differentially expressed genes are hypoexpressed in tumors. Aberrant DNA hypermethylation might be the cause of this gene silence or hypoexpression. We evaluated the methylation pattern of 25 genes in 20 paraffin-embedded hepatoblastoma specimens by MSP-Q. DNA hypermethylation of CpG island in more than 25% of samples was observed in 8 genes (*APC*, *CCND2*, *CDH1*, *COX2*, *HIN1*, *MT1G*, *RASSF1A* and *SOCS1*). The statistical analysis of clinical data and methylation pattern showed that there are no correlation between *APC*, *RASSF1A*, *SOCS1* and *MT1G* methylation and clinical characteristics. Nevertheless, both the methylation positivity and methylation level of *MT1G* showed inverse correlation with overall survival in these patients. This was the first report of CpG island hypermethylation in *MT1G* gene in hepatoblastoma and the first study that showed its association with prognosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Subtipos histológicos clássicos do hepatoblastoma e suas freqüências.	4
Figura 2	Exames de imagem utilizados no diagnóstico de hepatoblastoma	6
Figura 3	Sistema de Estadiamento PRETEXT do SIOPEL	8
Figura 4	Deaminação hidrolítica da 5-metil-citosina levando a formação de timidina	14
Figura 5	Processo de metilação da base citosina através da DNA metiltransferase	15
Figura 6	Possíveis Mecanismos de Silenciamento Gênico através da Metilação do DNA	17
Figura 7	Comparação entre os padrões de metilação dos dinucleotídeos CG em células normais e neoplásicas	18
Figura 8	Gráfico de comparação entre as sobrevidas globais em 5 anos no total de pacientes com hepatoblastoma (n=35) e a população selecionada para o estudo molecular (n=20).	39
Figura 9	Gráficos de comparações entre as taxas de sobrevida conforme características clínicas.	44-5
Figura 10	Gráfico de porcentual de amostras metiladas para cada um dos 25 genes avaliados no estudo-piloto.	49
Figura 11	Gráficos de dispersão com valores de PMR.	52
Figura 12	Gráfico de sobrevidas globais nos grupos de pacientes que apresentam metilação detectável.	54-5

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Seqüência dos primers forward e reverse para amplificação do fragmento de 133bp do gene ACTB.	28
Tabela 2	Seqüência dos primers forward e reverse para amplificação do fragmento de 133bp do gene ACTB após tratamento do DNA com bisulfito de sódio.	30
Tabela 3	Comparação das variáveis categóricas pesquisadas entre a amostra total de 35 pacientes e a amostra selecionada de 20 pacientes.	38
Tabela 4	Comparação das variáveis contínuas pesquisadas entre a amostra total de 35 pacientes e a amostra selecionada de 20 pacientes.	39
Tabela 5	Características clínicas dos 20 pacientes com hepatoblastoma submetidos ao estudo molecular.	43
Tabela 6	Comparação entre nível de metilação nos genes estudados e sobrevida global pelo modelo de Cox.	55
Tabela 7	Associação entre o estado de metilação do gene MT1G e variáveis clínicas estudadas.	56
Tabela 8	Associação entre o estado de metilação do gene RASSF1A e variáveis clínicas estudadas.	56
Tabela 9	Associação entre o estado de metilação do gene SOCS1 e variáveis clínicas estudadas.	57
Tabela 10	Associação entre o estado de metilação do gene APC e variáveis clínicas estudadas.	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Síndrome genéticas constitucionais associadas ao hepatoblastoma.	2
Quadro 2	Sistema de Estadiamento Children Oncology Group para Hepatoblastomas.	9
Quadro 3	Sequência de primers e sondas dos genes avaliados no estudo.	36
Quadro 4	Concentração de DNA nas amostras tumorais e margens estimada por espectrofotometria e resultado da PCR para ACTB após tratamento com bissulfito.	47
Quadro 5	Concentração de DNA nas amostras de tecido hepático normal fetal (NF) e adulto e resultado da PCR para ACTB após tratamento com bissulfito.	47
Quadro 6	Valores de PMR para as 20 amostras tumorais.	50
Quadro 7	Valores de PMR para as amostras de fígado normal fetal.	51

LISTA DE ABREVIACOES

ACTB	<i>Homo sapiens actin, beta gene</i>
AIM1	<i>Homo sapiens absent in melanoma 1 gene</i>
APC	<i>Homo sapiens adenomatosis polyposis coli gene</i>
CALCA	<i>Homo sapiens calcitonin-related polypeptide alpha gene</i>
CCNA1	<i>Homo sapiens cyclin A1 gene</i>
CCND2	<i>Homo sapiens cyclin D2 gene</i>
CDH1	<i>Homo sapiens cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial) gene</i>
COX2 (PTGS2)	<i>Homo sapiens prostaglandin-endoperoxide synthase 2 gene</i>
Ct	Cycle Threshold
DAPK	<i>Homo sapiens death-associated protein kinase 1 gene</i>
DNA	Ácido Desoxi-ribonucléico
ESR1	<i>Homo sapiens estrogen receptor 1 gene</i>
GSTP1	<i>Homo sapiens glutathione S-transferase pi gene</i>
HIC1	<i>Homo sapiens hypermethylated in cancer 1 gene</i>
HIN1(SCGB3A1)	<i>Homo sapiens secretoglobin, family 3A, member 1 gene</i>
Kb	kilobase
MGMT	<i>Homo sapiens O-6-methylguanine-DNA methyltransferase gene</i>
MINT31	<i>Homo sapiens methylated in tumours 31 gene</i>
MLH1	<i>Homo sapiens mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2</i>
MT1G	<i>Homo sapiens metallothionein 1G gene</i>
P14 ARF	<i>Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (variante de splicing) gene</i>
POG	Pediatric Oncology Group
CDKN2B	<i>Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 2B gene</i>
CDKN2A	<i>Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>

	<i>(variante de splicing) gene</i>
pb	par de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PMR	Percentual of Methylated Reference
RARB	<i>Homo sapiens retinoic acid receptor, beta gene</i>
RASSF1A	<i>Homo sapiens Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1 gene</i>
RB1	<i>Homo sapiens retinoblastoma 1 gene</i>
SFRP1	<i>Homo sapiens secreted frizzled-related protein 1 gene</i>
SIOPEL	The International Childhood Liver Tumour Strategy Group
SEER	<i>Surveillance Epidemiology and End Results</i>
SOCS1	<i>Homo sapiens suppressor of cytokine signaling 1 gene</i>
THBS1	<i>Homo sapiens thrombospondin 1 gene</i>
TIMP3	<i>Homo sapiens TIMP metalloproteinase inhibitor 3 gene</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Hepatoblastoma	1
1.2	Alterações Genéticas Estruturais em Hepatoblastoma	10
1.3	Expressão Gênica em Hepatoblastoma	12
1.4	Metilação do DNA	12
1.5	Metilação do DNA e Câncer	18
1.6	Metilação em Hepatoblastoma	20
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral	23
2.2	Objetivos Específicos	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Casuística	25
3.2	Dissecção Manual	26
3.3	Extração de DNA	27
3.4	Quantificação do DNA e Controle de Qualidade	28
3.5	Tratamento com Bissulfito de Sódio	29
3.6	Verificação da Qualidade do DNA após o Tratamento com Bissulfito de Sódio	30
3.7	Methylation-Specific PCR Quantitativa (MSP-Q)	31
3.8	Metilação in Vitro de DNA de Linfócitos	34
3.9	Análise Estatística	35
4	RESULTADOS	37
4.1	Caracterização Clínica da População	37
4.2	Extração do DNA e Tratamento com Bissulfito de Sódio	45
4.3	Resultados da MSP-Q	48
4.3.1	Estudo Piloto	48

4.3.2	Comparação entre o nível de metilação nos tecidos estudados	49
4.4	Associação entre Características Clínico-Patológicas e Hipermetilação	53
5	DISCUSSÃO	58
6	CONCLUSÕES	75
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 HEPATOBLASTOMA

O hepatoblastoma consiste no tumor maligno hepático mais comum da infância. Dados do programa de registro de câncer dos EUA, *Surveillance Epidemiology and End Results* (SEER), estimam uma incidência de 0,5-1,5 casos novos por milhão de crianças ao ano, o que corresponde à cerca de 79% das neoplasias hepáticas em crianças menores de 15 anos e à cerca de 1% do total de casos de cânceres nessa faixa etária (PERILONGO et al. 2000a; SCHNATER et al. 2003; ARONSON et al. 2005).

Essa baixa incidência é, possivelmente, responsável pela baixa casuística dos estudos clínicos existentes e pela limitada quantidade de estudos para desenvolvimento de quimioterápicos mais eficazes.

A maioria dos casos de hepatoblastoma ocorre em lactentes ou crianças jovens, com mediana de idade ao diagnóstico de 16 meses, segundo casuística do *Pediatric Oncology Group* (POG). De fato, segundo o SEER, a incidência de tumores hepáticos malignos em lactentes, que é de 11,2 casos por milhão ao ano, sofre um declínio conforme o aumento da idade na infância (TOMLINSON E FINEGOLD 2002).

Estudos epidemiológicos sugerem, ainda, que existe associação do hepatoblastoma com prematuridade e baixo peso ao nascimento (HERZOG et al. 2000). TANIMURA et al. (1998) observaram que o risco relativo para o

desenvolvimento de hepatoblastoma em recém-nascidos com menos de 1.000g é de 15,64, comparado com 2,53 para aqueles entre 1.000g e 1.500g e 1,21 para recém-nascidos com peso entre 2.000g e 2.500g.

Uma incidência aumentada de hepatoblastoma tem sido observada em pacientes com diferentes síndromes, como de Beckwith-Wiedemann, de Li-Fraumeni, hemi-hipertrofia e polipose adenomatosa familiar (FAP) (Quadro 1). DEBAUN e TUCKER (1998), com base em dados do registro de pacientes com síndrome de Beckwith-Wiedemann, observaram um risco relativo de desenvolvimento de hepatoblastoma de 2.280 vezes (intervalo de confiança 95%: 928-1.165) nos primeiros quatro anos de vida (DEBAUN E TUCKER 1998). Em pacientes portadores da FAP esse risco é de 1.220 vezes (intervalo de confiança 95%: 230-2.168) nos primeiros quatro anos (GIARDIELLO et al. 1991).

Quadro 1 - Síndrome genéticas constitucionais associadas ao hepatoblastoma.

Doença	Localização Cromossômica	Gene Envolvido
Polipose Adenomatosa Familiar	5q21.22	<i>APC</i>
Síndrome de Beckwith-Wiedemann	11p15.5	<i>P57KIP2, Wnt</i>
Síndrome de Li-Fraumeni	17p13	<i>TP53</i>
Doenças de Depósito de Glicogênio	Várias	

Fonte: *Adaptado de MUELLER et al. (2006)

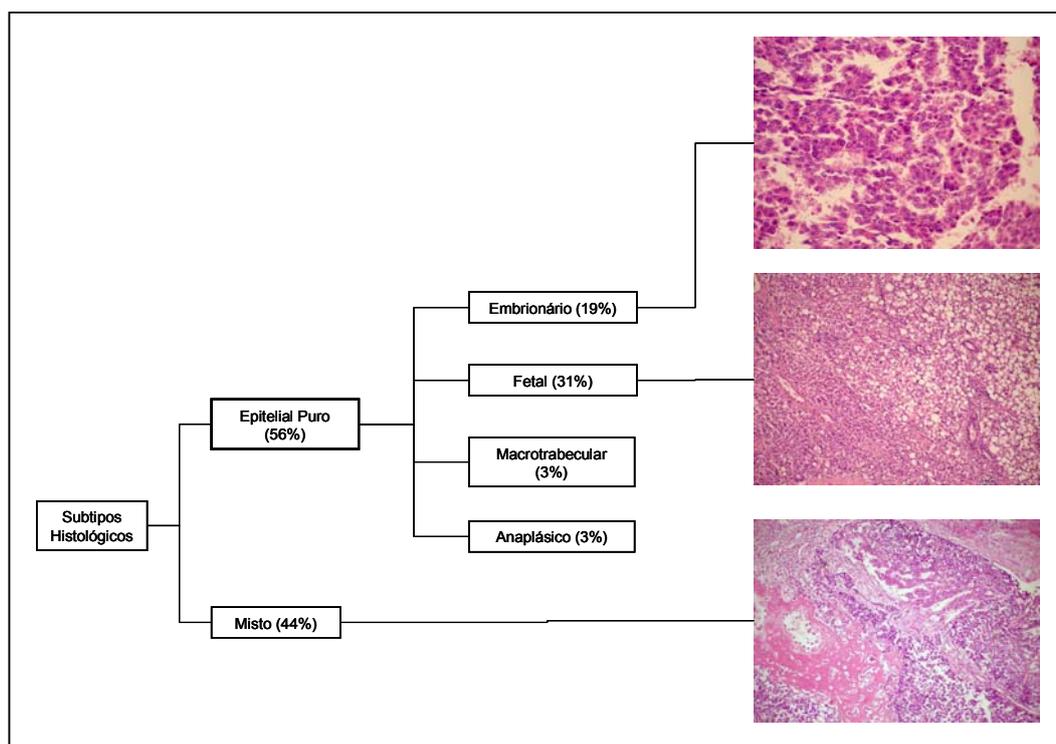
Em geral o hepatoblastoma se apresenta como um tumor abdominal oligossintomático, mas pode ser acompanhado de perda ponderal, anorexia, vômitos e dor abdominal, comumente, na presença de doença avançada. A doença parece ser discretamente mais freqüente em meninos e entre os

caucasianos. A localização no lobo direito do fígado ocorre em 60-70% dos casos (HERZOG et al. 2000; SCHNATER et al. 2003).

Em relação aos exames laboratoriais, sabe-se que a elevação dos níveis séricos de alfafetoproteína acima do normal para a idade, ocorre em mais de 90% dos casos de hepatoblastoma (HERZOG et al. 2000; MUELLER et al. 2006). Esta proteína, normalmente produzida pelo organismo durante a fase embrionária e fetal do desenvolvimento intra-uterino, tem a sua produção gradativamente diminuída após o nascimento, chegando aos valores normais de adulto (menos de 10ng/mL) ao final do primeiro ano de vida. Alguns estudos demonstraram que níveis de alfafetoproteína abaixo de 100ng/mL ao diagnóstico implicariam em menores taxas de sobrevida em pacientes com hepatoblastoma (HERZOG et al. 2000; FUCHS et al. 2002). Entretanto, este não constitui ainda um fator prognóstico universalmente aceito. Essa proteína pode ser, no entanto, usada como marcador diagnóstico, na presença de tumor hepático em uma criança em idade compatível com surgimento de hepatoblastoma, bem como marcador de sucesso terapêutico, uma vez que após a retirada do tumor, os níveis de proteína devem cair até seus valores normais. Também funciona como marcador de recaída já que tende a aumentar quando o tumor recai.

Histologicamente, o hepatoblastoma constitui um tumor embrionário que contém parênquima epitelial hepático e pode ser classificado como epitelial (56%) ou epitelial/mesenquimal misto (44%). O tipo epitelial pode, ainda, ser subdividido em: fetal puro (31%), embrionário (19%), macrotrabecular (3%) e pequenas células indiferenciadas (3%). Quando

associado a algum componente mesenquimal (tipo misto), este geralmente é composto por matriz osteóide ou cartilagem (Figura 1) (HERZOG et al. 2000).



Legenda: As lâminas coradas em HE são provenientes de pacientes do estudo.

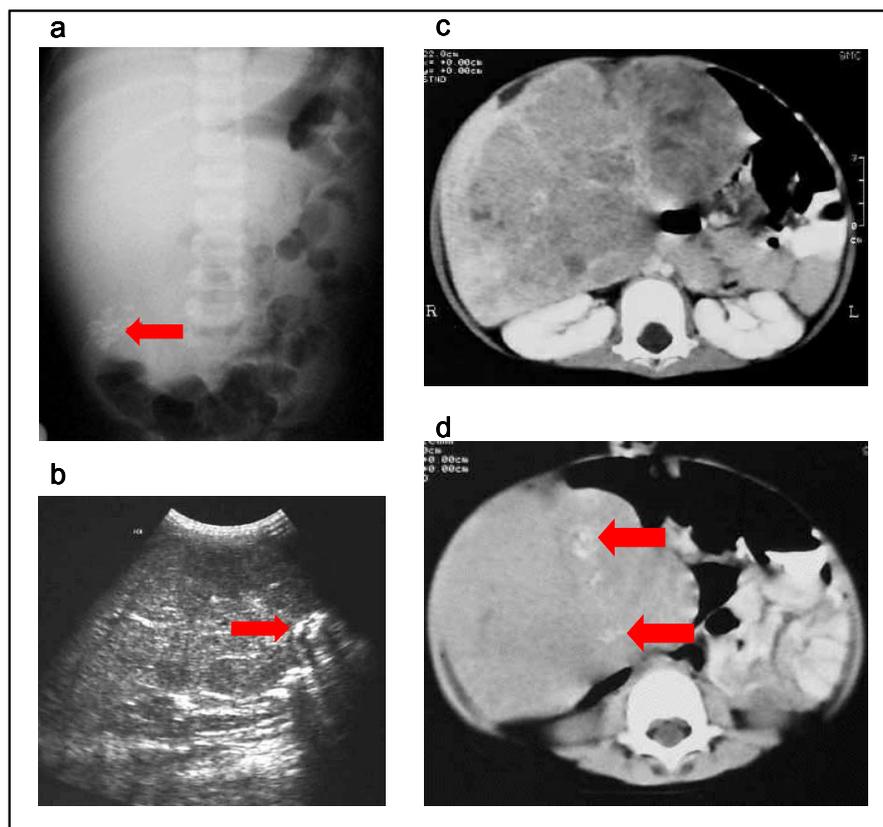
Figura 1 - Subtipos histológicos clássicos do hepatoblastoma e suas frequências.

SAXENA et al. (1993), em estudo que enfatizou os efeitos da quimioterapia sobre o hepatoblastoma, verificaram que a matriz osteóide estava presente em cerca de 36% dos tumores não tratados com quimioterapia. Quando o paciente recebia tratamento neoadjuvante este percentual subia para 82% e, na maioria dos casos, este componente osteóide compunha mais de 90% da área tumoral, o que sugere que a presença deste componente mesenquimal possa estar associada com resposta à quimioterapia (SAXENA et al. 1993). De fato, estudo de HAAS et

al. (1989) mostrou que a presença de elementos mesenquimais estava associada com melhor prognóstico naqueles pacientes com doença avançada (HAAS et al. 1989).

Entretanto, consensualmente, nenhum tipo histológico parece ter valor prognóstico independente. Mesmo o subtipo fetal puro, apontado como determinante de melhor prognóstico, parece perder a sua importância estatística quando o tumor não é completamente ressecado (JUNG et al. 2001). Alguns autores mostram, contudo, que os hepatoblastomas de pequenas células indiferenciadas parecem evoluir com maior frequência de recaídas e óbito (HAAS et al. 1989).

Os exames de imagem constituem ferramentas essenciais tanto para o diagnóstico, quanto para o estadiamento do hepatoblastoma (figura 2). Ao raio-X simples de abdome, as calcificações, que ocorrem em alguns casos, podem ser visualizadas. Este exame, entretanto, tem pouco valor no diagnóstico de massas hepáticas. A ultrassonografia de abdome pode ser aplicada tanto no momento do diagnóstico, para verificação da presença do tumor, quanto no estadiamento, para detecção de comprometimento de grandes vasos, quanto no intra-operatório a fim de auxiliar o cirurgião no momento da ressecção tumoral. À tomografia de abdome observa-se geralmente um tumor hepático volumoso, com loculações, áreas de necrose e calcificação. A ressonância magnética de abdome também pode ser utilizada, no entanto tem a desvantagem de ser mais demorada que o ultrassom e a tomografia (TOMLINSON e FINEGOLD 2002; MUELLER et al. 2006).



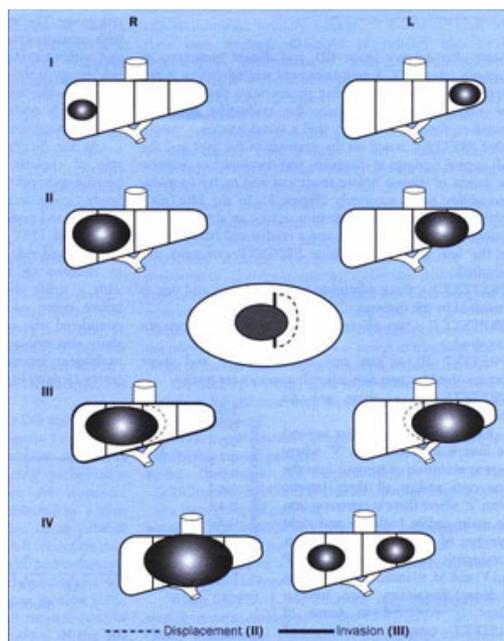
Legenda: a) Raio-X de abdome mostrando pequenas áreas de calcificação (seta vermelha) em um volumoso hepatoblastoma. b) Ultrassom de abdome de diagnóstico mostrando volumoso tumor hepático também com área de calcificação (seta vermelha). c) Tomografia computadorizada com contraste venoso em que pode ser visualizado hepatoblastoma acometendo ambos lobos hepáticos. d) O mesmo tumor apresenta áreas de calcificação (setas vermelhas) que também podem ser vistas na tomografia.

Figura 2 - Exames de imagem utilizados no diagnóstico de hepatoblastoma.

A pedra angular do tratamento dos pacientes portadores de hepatoblastoma, atualmente, consiste na completa ressecção da neoplasia, uma vez que apenas estes alcançarão efetivamente a cura. Reflexo desta importância reside no fato de que a extensão tumoral extra-hepática, multifocalidade, invasão vascular e metástase à distância, fatores clássicos de pior prognóstico para hepatoblastoma, são características que impedem ressecção completa do tumor (HERZOG et al. 2000; JUNG et al. 2001; CZAUDERNA et al. 2005).

Seguindo esse princípio, a estratégia de tratamento dessa doença acabou se dividindo em duas grandes vertentes com eficácias equivalentes. Uma prioriza a ressecção no início do tratamento, sempre que possível, reservando a quimioterapia neoadjuvante para aqueles casos em que o tumor é inicialmente irressecável (ORTEGA et al. 2000). A segunda, representada principalmente pelo grupo cooperativo europeu SIOPEL, preconiza que a quimioterapia neoadjuvante seja administrada a todos os pacientes e, em seguida, após a redução volumétrica do tumor, seja realizada a ressecção do mesmo (FINEGOLD 2002).

Tendo em vista essas duas linhas de tratamento, o estadiamento dos pacientes com hepatoblastoma pode ser feito de duas formas. A primeira, que valoriza critérios pré-operatórios do tumor, é adotada pelo grupo europeu SIOPEL e foi denominado estadiamento PRETEXT. Neste sistema o fígado é dividido em 4 setores analisados através de exames de imagem (tomografia computadorizada ou ressonância magnética). Conforme ilustrado na figura 3, a quantidade de setores livres de doença determina os estádios: PRETEXT I, três setores adjacentes livres ou apenas 1 setor acometido por neoplasia; PRETEXT II, dois setores adjacentes livres ou tumor acometendo dois setores; PRETEXT III, 1 setor ou 2 setores não-adjacentes livres (tumor envolvendo 2 ou 3 setores); PRETEXT IV, nenhum setor livre (ou todos os 4 setores acometidos). Também são avaliados: disseminação extra-hepática direta para linfonodos hilares (E), presença de metástases à distância (M), envolvimento de veia porta (P) e envolvimento de veia hepática (V) (ROEBUCK et al. 2007).



Legenda: Ao estágio PRETEXT são acrescentados: (E) se existe disseminação direta extra-hepática para linfonodos hilares, (M) se existem metástases à distância, (P) se existe envolvimento de veia porta e (V) se existe comprometimento de veia hepática.

Fonte: SCHNATER et al. (2003)

Figura 3 - Sistema de estadiamento PRETEXT do SIOPEL.

A segunda forma de estadiamento valoriza características pós-cirúrgicas e é adotada pelo grupo norte-americano COG (*Children Oncology Group*). Resumidamente, conforme descrito na Quadro 2, estágio I representa doença completamente ressecada; estágio II, tumor ressecado macroscopicamente, porém com doença residual microscópica ou tumores ressecados após quimioterapia pré-operatória ou tumores com ruptura intra-operatória; estágio III, tumores inicialmente irressecáveis, incluindo aqueles parcialmente ressecados ou com envolvimento linfonodal; estágio IV, presença de metástases à distância (MUELLER et al. 2006).

Quadro 2 - Sistema de Estadiamento Children Oncology Group para Hepatoblastomas.

Estadiamento	Característica
Estádio I	Tumor completamente ressecado com margens microscópicas livres
Estádio II	Tumor ressecado macroscopicamente com evidência de doença residual microscópica Tumor ressecado após quimioterapia neoadjuvante Ruptura intra-operatória
Estádio III	Tumor irressecável Tumor parcialmente ressecado Envolvimento linfonodal
Estádio IV	Presença de metástases à distância

Apesar de a cirurgia do tumor primário constituir a peça fundamental no tratamento do hepatoblastoma, menos da metade dos pacientes apresentam-se com doença ressecável ao diagnóstico. Assim, a introdução dos esquemas quimioterápicos baseados em platina foi, sem dúvida, uma das principais responsáveis pela melhora observada nas taxas de sobrevida de portadores de hepatoblastoma. Assim, tumores inicialmente irressecáveis na era pré-cisplatina, passaram a ser operáveis quando respondiam a este esquema quimioterápico (TOMLINSON E FINEGOLD 2002; MUELLER et al. 2006).

Para pacientes com tumores irressecáveis mesmo após quimioterapia neoadjuvante e com doença confinada ao fígado existe, ainda, a opção do transplante hepático (OTTE et al. 2004).

Não existe consenso sobre o papel da radioterapia no tratamento dos pacientes com hepatoblastoma (HABRAND e PRITCHARD 1991; HABRAND et al. 1992), motivo pelo qual, nódulos metastáticos pulmonares que continuam visíveis após quimioterapia neoadjuvante podem ter indicação de

retirada cirúrgica, principalmente se o tumor primário for completamente ressecado (FEUSNER et al. 1993).

O prognóstico dos pacientes portadores de hepatoblastoma melhorou significativamente nas últimas 3 décadas, passando de taxas de sobrevida global em 5 anos de cerca de 30% para os atuais 75% quando analisados todos os estádios conjuntamente. Separados por estádios, as taxas de sobrevida livre de doença, segundo dados norte-americanos do COG são de 100% para estágio I (ressecção completa do tumor), 74% para estágio II (doença residual microscópica), 50% para estágio III (doença residual macroscópica) e 29% para estágio IV (doença metastática), resultados estatisticamente semelhantes aos do grupo europeu SIOPEL (SCHNATER et al. 2003).

1.2 ALTERAÇÕES GENÉTICAS ESTRUTURAIS EM HEPATOBLASTOMA

Grande parte dos estudos referentes à biologia do hepatoblastoma se concentra nas alterações citogenéticas presentes no tumor, entretanto, até o momento, não se demonstrou a existência de um padrão consistente de anormalidades cromossômicas. De fato, as alterações mais freqüentemente encontradas (amplificações nos cromossomos 1q, 2q, 7q, 8, 17q e 20) ainda não puderam ser relacionadas à etiologia e nem ao prognóstico da neoplasia (HERZOG et al. 2000; SCHNATER et al. 2003). Além disso, a maioria dos hepatoblastomas não apresentam alterações cromossômicas detectáveis.

Entretanto, algumas alterações funcionais, como silenciamento de genes normalmente expressos, parecem ser mais relevantes no que se refere à gênese deste tumor. Sabe-se que a perda da heterozigose (LOH) de 11p15 é observada em até um terço dos pacientes com hepatoblastoma e a LOH de 1p em aproximadamente 33% dos mesmos (SCHNATER et al. 2003).

A associação entre hepatoblastoma e a polipose adenomatosa familiar (FAP) incentivou a procura de inativação do gene *APC* neste tumor. De fato, ODA et al. (1996) mostraram que cerca de 67% dos hepatoblastomas esporádicos possuem alterações desse gene (ODA et al. 1996). Além disso, frequência semelhante de mutações ativadoras do gene da β -catenina pode ser encontrada em associação com hepatoblastoma esporádico (KOCH et al. 1999; ANNA et al. 2000; UDATSU et al. 2001). Estes dados sugerem que a via de sinalização *Wnt* possa estar envolvida na gênese do tumor.

A presença ou ausência de mutação no gene da β -catenina não parece estar envolvida com o prognóstico da doença. Entretanto, a localização predominantemente nuclear, em contraposição à localização citossólica normal, parece estar associada com pior evolução (PARK et al. 2001).

1.3 EXPRESSÃO GÊNICA EM HEPATOBLASTOMA

Na literatura existem dois estudos que avaliaram o perfil de expressão gênica dos hepatoblastomas. Ambos utilizaram a técnica de *cDNA microarray*. YAMADA et al. (2004), comparando os perfis de expressão de amostras de hepatoblastoma e de tecido hepático normal, identificaram 86 genes diferencialmente expressos, sendo que 75 destes genes encontravam-se hipoexpressos nas amostras tumorais (YAMADA et al. 2004). NAGATA et al. (2003) encontraram 26 genes diferencialmente expressos em hepatoblastomas quando comparados à hepatócitos não-neoplásicos, sendo que, 50% deles estavam hipoexpressos no tecido maligno.

1.4 METILAÇÃO DO DNA

Um importante mecanismo envolvido no silenciamento da expressão gênica em eucariotos superiores é a metilação do DNA. Este evento epigenético envolve a adição de um radical metil no carbono da posição 5 da base nitrogenada citosina (C) (SINGAL e GINDER 1999; HERMAN e BAYLIN 2003).

Denominada por alguns de “a 5ª base nitrogenada”, a 5-metil-citosina corresponde a cerca de 4% das citosinas totais do genoma e, apesar de já ter sido descrita metilação no contexto “não-CpG”, observa-se que praticamente toda a metilação do DNA de mamíferos ocorre nas citosinas

localizadas a 5' de guaninas (G), ou seja, no dinucleotídeo CG (SINGAL e GINDER 1999; HERMAN e BAYLIN, 2003; LAIRD 2003). Surpreendentemente, a 5-metil-citosina é, aparentemente, flexível o suficiente para variar o seu estado de metilação à depender do tipo celular somático em questão (metilação do DNA parece ser tecido específica) e, ao mesmo tempo, estável à ponto de se manter durante a mitose ou meiose (LAIRD 2003).

Durante a evolução das espécies, o dinucleotídeo CG parece ter sido progressivamente eliminado do genoma dos eucariotos superiores, sendo que sua frequência observada corresponde a apenas 5-10% da frequência esperada (GARDINER-GARDEN e FROMMER 1987; ATTWOOD et al. 2002). É provável que a metilação da citosina tenha exercido papel importante nesse processo, uma vez que a maior parte dos sítios CG perdidos parece ter sofrido deaminação hidrolítica de 5-metil-citosina para timina (mutação do tipo transição – Figura 4). O restante dos dinucleotídeos CG são distribuídos pelo genoma humano de forma não-randômica em grandes extensões de seqüências com baixa frequência deste dinucleotídeo entremeadas por agrupamentos ricos em CG, denominados ilhas CpG (SINGAL e GINDER 1999; HERMAN e BAYLIN 2003; LAIRD 2003).

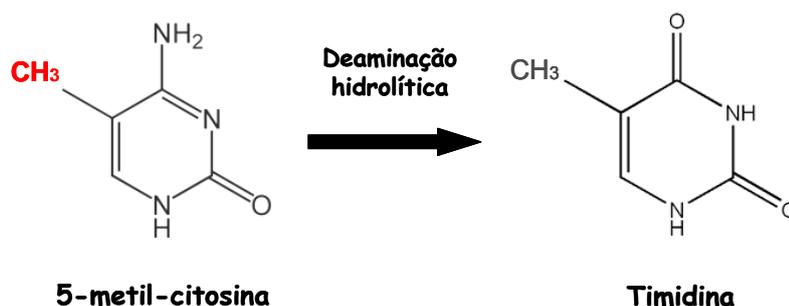


Figura 4 - Deaminação hidrolítica da 5-metil-citosina levando a formação de timidina

O tamanho dessas ilhas varia de 500pb a 5kb e elas correspondem a 1% a 2% do genoma total (GARDINER-GARDEN e FROMMER 1987; ATTWOOD et al. 2002). Estima-se que exista no genoma humano, aproximadamente 45 mil ilhas de CpGs e que essas seqüências estão localizadas principalmente, nas regiões promotoras e nos primeiros exons de cerca 60% dos genes (ANTEQUERA e BIRD 1993; NAKAO 2001). Em células normais, estas regiões encontram-se protegidas da ação da metilação, por mecanismos ainda não elucidados (ESTELLER 2005). Os dinucleotídeos CpGs remanescentes que ocorrem fora das ilhas CpGs, são amplamente metilados (ATTWOOD et al. 2002).

A metilação da citosina ocorre após a síntese de DNA através de uma reação catalisada por uma família de enzimas denominada DNA metiltransferase (DNMT). Essas enzimas transferem o grupo metil da S-adenosil-metionina para o carbono 5 da citosina (Figura 5). Em mamíferos foram identificados 3 subtipos de DNMT: DNMT1, DNMT3A e DNMT3B (HERMAN e BAYLIN 2003; BESTOR 2000).

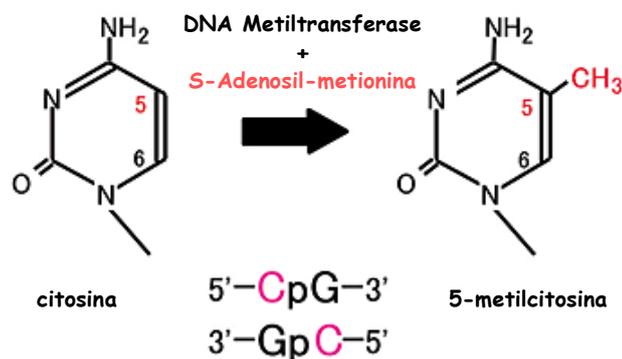


Figura 5 - Processo de metilação da base citosina através da DNA metiltransferase

A DNMT1 constitui a principal enzima DNMT nos mamíferos e catalisa a restauração dos sítios hemi-metilados, criados após a replicação semi-conservativa do DNA (durante a meiose ou mitose), em sítios completamente metilados, ou seja, é responsável pela manutenção do padrão de metilação nas células-filhas (BESTOR 2000; HERMAN e BAYLIN 2003).

DNMT3A e DNMT3B parecem estar envolvidas no processo de metilação de novos sítios, isto é da metilação *de novo* (BESTOR 2000; HERMAN e BAYLIN 2003).

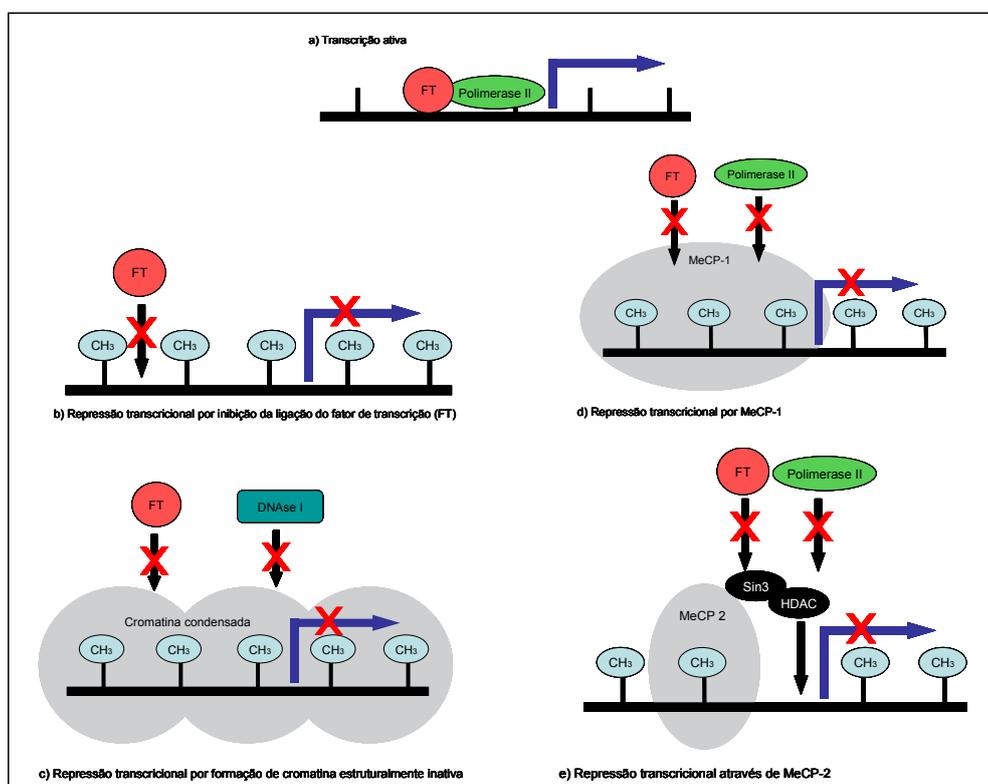
A metilação das ilhas CpG situadas na região promotora de certos genes tem sido relacionada com seu silenciamento transcricional. De fato, já foi demonstrada a importância fisiológica desse mecanismo no desenvolvimento embrionário dos mamíferos, na proteção contra parasitas intra-genômicos, na inativação de um dos cromossomos X em mulheres e no *imprinting* genômico (SINGAL e GINDER 1999; ATTWOOD et al. 2002; LAIRD 2003). Além disso, alterações patológicas no padrão normal de

metilação das citosinas estão possivelmente envolvidas no surgimento de certas doenças mentais e na carcinogênese (LAIRD 2003; EGGER et al. 2004).

Existem três possíveis mecanismos pelos quais a metilação do DNA pode levar ao silenciamento gênico, como ilustrado na Figura 6. O primeiro mecanismo envolve a interferência direta das citosinas metiladas com a ligação dos fatores de transcrição nos seus sítios de reconhecimento específicos dentro da região promotora (6-b). Dentre os fatores de transcrição que reconhecem seqüências CG e são sensíveis à metilação estão AP-2, c-Myc/Myn, CREB, E2F e NF-kB. Outros fatores, entretanto, se mostram resistentes à metilação, como por exemplo Sp1 e CTF. Portanto, nestes casos, outra forma de silenciamento deve estar envolvida. Um segundo mecanismo possível é através da alteração da estrutura cromatínica para um estado mais condensado e inativo e, portanto, inacessível aos fatores de transcrição (Figura 6-c). O terceiro mecanismo proposto consiste na ligação de repressores transcricionais específicos denominados *methyl cytosine binding proteins 1 e 2* (MeCP) ao DNA metilado e, com isso, impedindo a interação dos fatores de transcrição (figuras 6-d e 6-e) (SINGAL e GINDER 1999).

MeCP 1 consiste em um grande complexo protéico que se liga a múltiplos sítios CG metilados e impede a ligação dos fatores de transcrição e da RNA polimerase II aos seus sítios de reconhecimento (Figura 6-d). Células com deficiência de MeCP-1 demonstram repressão reduzida de genes metilados. MeCP-2 é mais abundante do que o primeiro complexo e é

capaz de se ligar ao DNA contendo apenas um dinucleotídeo CG. Além disso, MeCP-2 parece estar associado a um complexo co-repressor que contém o repressor transcricional Sin3 e histona deacetilases. Assim, além de impedir o acesso dos fatores de transcrição e a atividade da polimerase II, MeCP-2, através de sua associação com histonas deacetilases, também pode determinar uma alteração da estrutura da cromatina para um estado inativo (figura 6-e) (SINGAL e GINDER 1999).



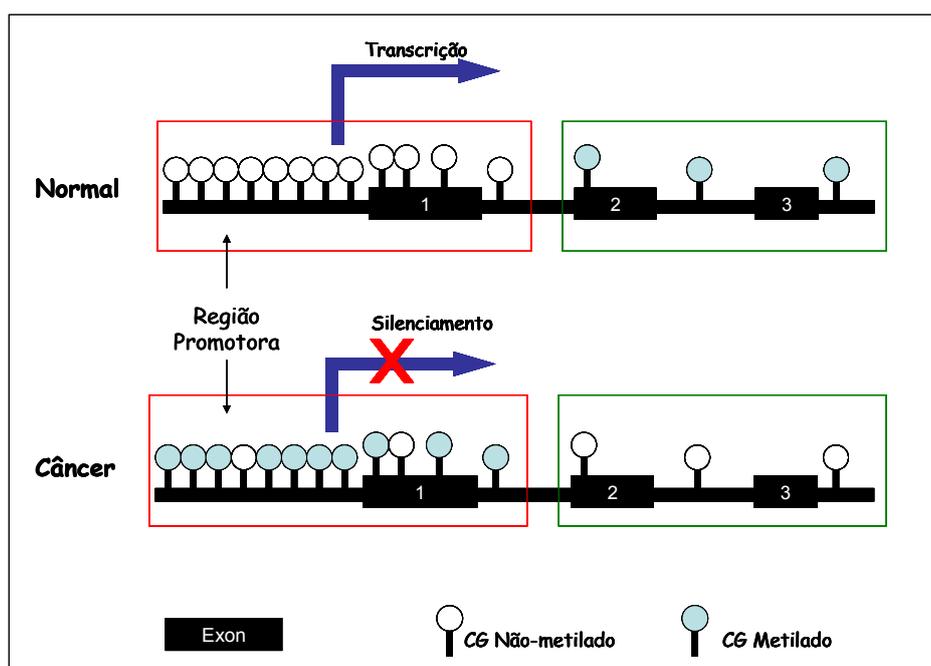
Legenda: a) Representação da região 5' de um gene com ilha CpG não metilada – os sítios de ligação específica dos fatores de transcrição e da RNA polimerase II estão livres e, portanto, a transcrição pode ocorrer (seta azul). b) Na presença de metilação das ilhas CpG (CH₃) os sítios de ligação dos fatores de transcrição (FT) ficam bloqueados e a transcrição é impedida. c) Em um segundo mecanismo possível, a metilação do DNA induz uma conformação condensada da cromatina, impedindo, portanto, a ligação dos fatores de transcrição ao DNA. Esse mecanismo foi deduzido através de experimentos de sensibilidade e resistência de cromossomos à DNase I. d) Um terceiro mecanismo proposto é através de recrutamento pelo DNA metilado da MeCP-1 ou MeCP-2 (e).

Fonte: Adaptada de SINGAL e GINDER (1999).

Figura 6 – Possíveis Mecanismos de Silenciamento Gênico através da Metilação do DNA.

1.5 METILAÇÃO DO DNA E CÂNCER

Basicamente dois tipos de alterações do padrão de metilação do DNA podem estar presentes em células neoplásicas. De fato, como ilustra a Figura 7, quase todos os tipos de câncer apresentam tanto perda de metilação em regiões pobres em dinucleotídeos CG, que deveriam estar metilados (hipometilação do DNA), quanto ganhos de metilação em ilhas CpG localizadas em regiões promotoras de genes (hipermetilação ou metilação aberrante) (SINGAL e GINDER 1999; HERMAN e BAYLIN 2003).



Legenda: A figura esquematiza um suposto gene com 3 exons. A porção 5' do gene (quadro vermelho) apresenta alta concentração de dinucleotídeos CG (ilha CpG) que, em condições normais, encontram-se não-metilados. Em células neoplásicas, entretanto, é freqüente o achado de metilação nesses dinucleotídeos. Fora da região promotora (quadro verde), cuja concentração de dinucleotídeos CG é menor do que a esperada, geralmente o que se encontra é uma hipometilação desses resíduos em células provenientes de câncer.

Fonte: Adaptado de HERMAN e BAYLIN (2003)

Figura 7 - Comparação entre os padrões de metilação dos dinucleotídeos CG em células normais e neoplásicas.

É possível que a hipometilação do DNA esteja envolvida com a carcinogênese através da reversão do silenciamento transcricional de certas regiões normalmente inativadas do genoma como, por exemplo, genes virais inseridos, seqüências repetitivas e genes reprimidos pelo *imprinting* genômico. Estudos em camundongos, nos quais se induz a perda de metilação do DNA, demonstram uma freqüência aumentada de linfomas tímicos, possivelmente devido ao aumento da instabilidade genética (HERMAN e BAYLIN 2003).

Além disso, a perda de metilação poderia afetar a interação da fita de DNA com outras estruturas nucleares, causando, desta forma, instabilidade cromossômica funcional em células neoplásicas. Sabe-se, por exemplo, que regiões pericentroméricas dos cromossomos são dependentes do nível de metilação do DNA para que o fuso mitótico se ancore e, assim, a replicação do DNA transcorra normalmente. Pacientes portadores da síndrome imunodeficiência-instabilidade centromérica, associada com mutações germinativas no gene da DNMT3B, apresentam alterações estruturais evidentes em regiões pericentroméricas de certos cromossomos. Algumas das alterações nessas regiões parecem estar presentes também em células neoplásicas (SINGAL e GINDER 1999; HERMAN e BAYLIN 2003).

A inativação de genes supressores de tumor pode se dar tanto por eventos mutacionais, como também pela hipermetilação de ilhas CpG eventualmente presentes nas regiões promotoras desses genes. Seguindo a hipótese de Knudson, a ruptura da função de um gene supressor de tumor necessita da perda completa dos dois alelos codificantes. Quando causado

exclusivamente por alterações genéticas o primeiro evento mutacional em um dos alelos pode se dar tanto na linhagem germinativa (nos casos de câncer familiar), como em células somáticas (câncer esporádico). O segundo evento geralmente ocorre devido a perdas cromossômicas somáticas em regiões que contêm a sequência codificante do gene em questão, ou seja, quando ocorre perda de heterozigose (LOH, da sigla em inglês) (SINGAL e GINDER 1999; HERMAN e BAYLIN 2003).

A hipermetilação aberrante da região promotora pode ter o mesmo efeito de uma mutação em região codificante em um dos alelos de determinado gene, funcionando como o primeiro hit da hipótese de Knudson. Normalmente a LOH atua com segundo hit associado. No câncer hereditário, modificações epigenéticas não parecem atuar como primeiro hit, mas podem causar o segundo, enquanto que no câncer esporádico não é rara a observação de hipermetilação em ambas as cópias do gene) (SINGAL E GINDER 1999; HERMAN e BAYLIN 2003).

De fato, observa-se que a quantidade de genes relacionados ao câncer afetados por inativação epigenética é igual ou maior ao número de genes inativados por mutação (LAIRD 2003).

1.6 METILAÇÃO EM HEPATOBLASTOMA

Até o momento, poucos estudos avaliaram a contribuição da metilação aberrante do DNA na carcinogênese do hepatoblastoma. NAGAI et al. (2003), verificaram que ilhas CpG localizadas na região promotora do

gene *SOCS1* encontravam-se hipermetiladas em 7 de 15 casos de hepatoblastomas avaliados, à semelhança do que ocorre em casos de carcinoma hepatocelular, próprio de adultos. De fato, grande parte dos estudos de metilação em tumores hepáticos estão relacionados aos hepatocarcinomas que, apesar de também terem origem epitelial, como o hepatoblastoma, acometem, geralmente, crianças de maior faixa etária (maiores de 10 anos). HARADA et al. (2002), estudando a presença de metilação aberrante na região promotora de *RASSF1A* em tumores pediátricos e linhagens celulares, observaram presença da alteração em 19% dos casos de hepatoblastoma analisados. FUKUZAWA et al. (1999) demonstraram que a perda de expressão do gene *H19* em hepatoblastoma estava relacionada ao *imprinting* do alelo paterno e a hipermetilação da região promotora do alelo materno. Em outro estudo, a análise da frequência de hipermetilação do gene *CDKN2A* em 24 casos de hepatoblastoma demonstrou que 50% dos casos apresentavam a alteração na região promotora deste gene. sendo que, dos 12 tumores que se mostraram metilados, 8 apresentaram completa ausência de imunorreatividade para proteína *CDKN2A* ao exame imunohistoquímico, demonstrando a associação entre a hipermetilação do DNA e a inativação do gene (SHIM et al. 2003).

Assim, apesar dos estudos citogenéticos e moleculares relatarem a existência de alterações não randômicas relacionadas a esta neoplasia, nenhuma destas é consistente o suficiente para explicar a gênese deste tumor em sua maioria.

O fato de, provavelmente, a gênese do hepatoblastoma estar ligada a eventos ocorridos durante a embriogênese hepática e o conhecimento de que o mecanismo de metilação do DNA exerce fundamental importância na organogênese podem favorecer a hipótese de que este processo esteja também envolvido na tumorigênese dessa neoplasia.

A hipótese desse estudo baseia-se nos achados prévios em outros tumores que evidenciaram a associação tanto entre a hipermetilação da região promotora de certos genes e a gênese da doença, quanto ao seu prognóstico. Além disso, alguns autores sugerem que a metilação do DNA pode estar envolvida também na origem e progressão do hepatoblastoma (LI et al. 1998; SUGAWARA et al. 2006)

Reforça essa hipótese o fato de que um dos únicos estudos com tecnologia em larga escala relacionados com expressão gênica em hepatoblastoma demonstrou que a maioria dos genes diferencialmente expressos no tumor estavam hipoexpressos, ao contrário do que se poderia, teoricamente, imaginar, uma vez que a maior parte das alterações citogenéticas associadas são, de fato, ampliações. Esperar-se-ia, assim, uma maior frequência de genes hiperexpressos. É possível, portanto, que a metilação seja um mecanismo atuante na gênese dessa hipoexpressão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo visou avaliar a hipermetilação das regiões promotoras de uma painel de 25 genes em amostras tumorais de hepatoblastoma, incluídas em parafina, colhidas de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico pelo Departamento de Pediatria do Hospital do Câncer A.C. Camargo, com objetivo de verificar a utilidade da determinação do perfil de metilação destes genes como marcadores moleculares para este tipo tumoral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a frequência de hipermetilação da região promotora dos genes *AIM1*, *APC*, *CALCA*, *CCNA1*, *CCND2*, *CDH1*, *COX2 (PTGS2)*, *DAPK*, *ESR1*, *GSTP1*, *MGMT*, *MINT31*, *MLH1*, *P14 ARF*, *CDKN2B*, *CDKN2A*, *RARB*, *RASSF1A*, *RB1*, *SOCS1*, *THBS1*, *TIMP3*, *MT1G*, *SFRP1*, *HIN1(SCGB3A1)* em amostras tumorais de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico de hepatoblastoma e em amostras de tecido hepático normal.

2. Correlacionar a presença de hipermetilação com características clínicas e patológicas dos pacientes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foi feito levantamento de todos os pacientes com diagnóstico de hepatoblastoma atendidos no Hospital do Câncer A. C. Camargo do período de 1984-2005. A partir desse levantamento foram selecionadas amostras de tecido tumoral parafinado do arquivo de anatomia patológica do hospital, respeitando-se os seguintes critérios:

- a) diagnóstico revisado e confirmado de hepatoblastoma por patologista da instituição;
- b) disponibilidade de tecido tumoral viável no bloco de parafina;
- c) tratamento realizado na instituição;
- d) disponibilidade de dados clínicos em prontuário.

Os dados clínicos dos pacientes foram extraídos dos prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico (SAME) do hospital e anotados em ficha anátomo-clínica, que abordava aspectos epidemiológicos, clínico-semiológicos, propedêuticos e patológicos assim definidos:

1. Epidemiológicos: idade, gênero e raça;
2. Clínico-semiológicos: sintomas ao diagnóstico, tempo de início dos sintomas, síndrome hereditárias associadas, história de

prematuridade, história de baixo peso ao nascimento, estadiamento SIOPEL, presença e sítios de metástases ao diagnóstico, medidas tumorais iniciais e pós-quimioterapia estimados por tomografia computadorizada, nível de alfa-fetoproteína ao diagnóstico e após quimioterapia, presença e sítio de recaída, status atual do paciente e data do último seguimento;

3. Propedêuticos: tempo de tratamento, tratamento inicial proposto, quimioterápicos utilizados no tratamento, tipo de cirurgia realizada, grau de ressecabilidade, necessidade de transplante hepático, abordagem cirúrgica de metástases;
4. Patológicos: tipo histológico, comprometimento linfonodal ou de margens cirúrgicas.

Através de uma colaboração com a Santa Casa de Misericórdia de São Paulo também foram incluídas no estudo 5 amostras parafinadas de fígado fetal normal provenientes de produtos de abortamentos.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em 06/02/2006 e está cadastrada no Sistema Nacional de Informações Sobre Ética em Pesquisa (SISNEP) sob o número 1344.0.022.000-06.

3.2 DISSECÇÃO MANUAL

Após a confirmação do diagnóstico de hepatoblastoma por patologista da instituição, uma lâmina corada com hematoxilina e eosina (HE) foi

demarcada para delineamento das áreas que apresentavam maior representatividade tumoral.

Os cortes do bloco de parafina correspondentes a cada lâmina de HE foram confeccionados com auxílio de micrótomo e dispostos em lâmina de vidro para microscopia. Cada corte possuía espessura de 10 μ m.

As lâminas coradas com HE foram sobrepostas às lâminas que continham o fragmento de parafina não corado, permitindo a visualização da área tumoral e, conseqüentemente, a sua dissecção. Foram raspadas áreas correspondentes ao tumor de 10 cortes de cada caso incluído no estudo.

Os tecidos hepáticos normais foram dissecados da mesma forma.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Para extração do DNA dos tecidos dissecados foi utilizado kit de extração QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN) conforme instruções do fabricante.

Basicamente, o material raspado foi desparafinado com xileno 100% por 30 minutos a 42°C e lavado com etanol 100% duas vezes. Após retirada do etanol 100% a amostra foi incubada a 50°C com proteinase K e tampão ATL (fornecidos no kit) até completa digestão do tecido (12-24h). Após incubação em tampão AL, a solução digerida foi transferida para coluna de purificação (QIAGEN) e submetida a duas lavagens seqüenciais com soluções AW1 e AW2. O DNA purificado foi então eluído da coluna em 50 μ L de água.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DO DNA E CONTROLE DE QUALIDADE

Um microlitro de solução de DNA extraído foi utilizado para quantificação por espectrofotometria (Nanodrop® ND-1000) com leitura de absorbância a 260nm.

A quantidade estimada de 30ng foi utilizada para realização de PCR convencional com primers para a amplificação de um fragmento de 133 pares de base (bp) do gene *ACTB* (Tabela 1).

Tabela 1 - Seqüência dos primers forward e reverse para amplificação do fragmento de 133bp do gene *ACTB*.

Primer	Seqüência
Forward	5' – TGGTGATGGAGGAGGCTCAGCAAGT – 3'
Reverse	5' - AGCCAATGGGACCTGCTCCTCCCTTGA – 3'

As condições utilizadas nesta reação de PCR foram: 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 0,4µM de cada primer, 1X tampão de PCR, 1U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e 30ng de DNA em um volume final de reação de 25µL. O programa de PCR utilizado foi: 95°C por 2 minutos; 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 66°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos; por último um passo de 72°C por 7 minutos. Para visualização dos produtos amplificados, as amostras foram resolvidas em gel de poliacrilamida 8% e coradas com nitrato de prata (SANGUINETTI et al. 1994).

3.5 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

O tratamento com bissulfito de sódio foi baseado no método descrito por EADS e LAIRD (2002), porém foi adaptado com o intuito de diminuir a degradação do DNA durante a exposição ao bissulfito de sódio.

Essencialmente, a técnica consiste em uma etapa inicial de desnaturação em que 2µg de DNA são incubados a 50°C por 30 minutos em uma solução contendo NaOH 0,3M e *Hering DNA* (250mg/ml). Em seguida o DNA desnaturado é submetido a um processo de sulfonação reversível e deaminação através da incubação a 70°C por 3 horas em uma solução de bissulfito de sódio contendo metabissulfito de sódio 2,7M (Sigma-Aldrich), hidroquinona 135mM (Sigma-Aldrich) e NaOH 378mM (pH final=5,0), protegido da luz.

Posteriormente, o DNA foi purificado com sistema *Wizard DNA Clean-Up* (Promega), conforme instrução do fabricante, e eluído em 45µL de água. O material, então, foi dessulfonado, através da incubação em solução contendo NaOH 0,3M por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, o DNA foi precipitado com etanol 100% e acetato de amônia 5M e incubação a -20°C durante a noite, seguido de centrifugação a 14000rpm por 30 minutos e lavagem com etanol 70%. No final, o DNA foi ressuspendido em 110µL de água e estocado a -70°C até o uso.

3.6 VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DO DNA APÓS O TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

Para verificar a eficiência do tratamento com bissulfito de sódio, 1µL de DNA tratado foi utilizado em uma reação de PCR com primers complementares a um segmento de 133bp do gene da *ACTB* após a conversão pelo bissulfito (Tabela 2). O segmento de DNA ao qual esse par de primers é complementar não contém dinucleotídeos CGs e, portanto, permite a amplificação de todo DNA modificado pelo bissulfito de sódio, independente do estado de metilação.

Tabela 2 – Seqüência dos primers forward e reverse para amplificação do fragmento de 133bp do gene *ACTB* após tratamento do DNA com bisulfito de sódio.

Primer	Seqüência
Forward	5' – TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT – 3'
Reverse	5' - AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA – 3'

As condições utilizadas nesta reação de PCR foram: 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 0,4µM de cada primer, 1X tampão de PCR, 1U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e 30ng de DNA em um volume final de reação de 25µL. O programa de PCR utilizado foi: 95°C por 2 minutos; 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos; e um passo final de 72°C por 7 minutos. Para visualização dos produtos amplificados, as amostras foram resolvidas em gel de

poliacrilamida 8% e coradas com nitrato de prata (SANGUINETTI et al. 1994).

3.7 METHYLATION-SPECIFIC PCR QUANTITATIVA (MSP-Q)

As reações de MSP quantitativa (MSP-Q - *Quantitative Methylation Specific PCR*) foram realizadas conforme descrição de EADS et al. (2000).

As concentrações finais dos reagentes utilizados nas reações de MSP-Q foram: 1X tampão de reação (16,6mM de sulfato de amônio, 67mM de Tris-HCl pH 8,0, 6,7mM de MgCl₂, 10mM de Mercaptoetanol, 0,1% de DMSO), 0,2mM de dNTP (Invitrogen), 1,2µM de cada primer (direto e reverso), 1X *Rox dye* (Invitrogen), 0,2µM de sonda TaqMan, 0,6U DNA polimerase Taq Platinum (Invitrogen) e 3µL de DNA tratado com bissulfito, em volume final de reação de 20µL. Para o gene *CDKN2A* a concentração final de MgCl₂ utilizada no tampão de reação foi de 2,5mM. As condições de reação foram: 95°C por 10 minutos, seguidos por 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Todas as reações foram feitas em triplicatas e em placas de 96-wells, utilizando-se o aparelho SDS 7500 (Applied Biosystems).

As amostras foram consideradas metiladas quando houve amplificação de pelo menos duas amostras das triplicatas. A ausência de amplificação ou amplificação de apenas uma das triplicatas indicava amostras não metiladas. O Quadro 3 mostra as seqüências de primers e sondas utilizados no estudo.

Para que seja determinada a quantidade de DNA metilado em uma dada amostra é necessária a construção de uma curva padrão construída a partir de diluições seriadas de um DNA sabidamente metilado para o gene em questão. Essa curva foi confeccionada a partir de DNA de linfócito humano de indivíduos sadios metilado *in vitro* pela ação da enzima *SssI/CpG-Metilase* (New England Biolabs) conforme instruções do fabricante e, posteriormente, tratado com bissulfito de sódio. Espera-se, portanto, que para todos os genes estudados estejam 100% metilados neste DNA metilado *in vitro*. Seis diluições seriadas (1 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) foram feitas, partindo-se de uma concentração inicial estimada por espectrofotometria de $30\text{ng}/\mu\text{L}$, sendo que, para cada gene estudado foi utilizada uma curva de diluição na mesma placa de reação.

A eficiência das reações foi calculada a partir do valor da medida de inclinação da reta obtida pela regressão linear descrita acima (slope) através da fórmula:

$$\text{Eficiência} = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$$

Uma vez que as quantidades de DNA, que são inicialmente adicionadas em cada tubo de reação, não são iguais é necessária a normalização das mesmas para que as quantificações sejam comparáveis entre si. Assim, a quantificação do gene alvo foi dividida pela quantificação do gene *ACTB*, cujos primers e sonda foram desenhados para cobrir uma região com ausência de CGs. Uma vez que a amplificação deste fragmento

independe do estado de metilação das citosinas, sua quantificação refletirá a quantidade total de DNA tratado presente na reação. Desta forma, obtém-se uma razão entre o número de cópias metiladas do gene alvo na amostra pelo número máximo de cópias presentes na reação (número de cópias do gene *ACTB*).

Sabe-se, entretanto, que existem variações de eficiência de reação tanto quando comparados dois conjuntos de primers e sondas para genes diferentes, quanto entre reações realizadas em momentos e placas diferentes. Assim, para minimizar esse tipo de viés, a razão anterior foi dividida pela razão entre o número de cópias metiladas do gene alvo em uma amostra referência e o número de cópias do gene *ACTB* na mesma amostra referência, conforme a fórmula a seguir, cujo resultado foi denominado *PMR (Percentual of Methylated Reference)*:

$$PMR = \frac{\frac{\text{Quantificação do gene metilado na amostra}}{\text{Quantificação da beta-actina na amostra}}}{\frac{\text{Quantificação do gene metilado na referência}}{\text{Quantificação da beta-actina na referência}}}$$

A amostra referência utilizada foi o mesmo DNA tratado com *SssI/CpG-metilase* e bissulfito de sódio utilizada para confecção da curva de diluição e estava presente em todas as placas analisadas.

3.8 METILAÇÃO IN VITRO DE DNA DE LINFÓCITOS

Dez mililitros de sangue periférico de indivíduos saudáveis foram submetidos a centrifugação por 10 minutos a 1.500 RPM para separação do soro e da porção celular. À porção celular foram adicionados 10mL de TE (10mM Tris-HCl pH8,0 e 1mM EDTA pH 8,0) para lise das hemácias. Após centrifugação a 1.500 RPM por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e a amostra foi submetida à nova lavagem com 10mL de TE. Novamente o sobrenadante foi descartado e o pellet de linfócitos foi ressuspensão em 1mL de TE. Os linfócitos foram transferidos para tubo de 1,5mL e submetidos à centrifugação por 1 minuto a 13.000 RPM. O sobrenadante foi descartado e o pellet de linfócitos armazenado a -70°C até o uso.

Para a obtenção do DNA foi utilizado o protocolo de digestão com Proteinase K e extração do DNA com fenol-clorofórmio.

A metilação *in vitro* do DNA de linfócitos foi realizada através da ação da enzima *SssI CpG Methylase* (New England Biolabs), segundo instruções do fabricante. Resumidamente, 20µg de DNA de linfócitos foram misturados a 0,032mM de SAM (S-adenosilmetionina) e 25 unidades da enzima *SssI*, em um volume final de reação de 250µL. A reação foi incubada por 4 horas a 37°C. Em seguida, foi adicionado mais 0,064mM de SAM e 12,5 unidades da *SssI*. Após nova incubação de 4 horas a 37°C, as amostras foram submetidas a extração com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol. O pellet de DNA metilado *in vitro* foi ressuspensão em 15µL de água e estocado a -20°C.

Vinte microgramas do DNA metilado *in vitro* (10 alíquotas de 2µg) foram submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio conforme descrito anteriormente. No final todas as alíquotas foram ressuspensas em um volume final de 50µL de água, quantificadas em espectrofotômetro e diluídas para uma concentração de 30ng/µL.

O DNA de linfócitos metilado *in vitro* e tratado com bissulfito de sódio foi empregado como controle positivo e na construção das curvas padrão nas reações de MSP-Q.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As medidas de dispersão e de tendência central foram avaliadas com o auxílio do programa SPSS 10.0. A significância estatística das diferenças entre as variáveis categóricas foi avaliada através do teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Comparação das variáveis contínuas entre os grupos estudados foi realizada através do teste T-student. A sobrevida global foi estimada a partir do primeiro dia de tratamento até a data da morte ou do último seguimento. As sobrevidas globais dos grupos de pacientes estudados, bem como a estimativa da influência do estado de metilação (variável categórica) nas mesmas, foram avaliadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas através do teste de log-rank. A influência do nível de metilação (variável contínua) na sobrevida global dos pacientes foi avaliada através do modelo de regressão de Cox. Para todos os testes estatísticos foi considerada significância estatística quando $p < 0,05$.

Quadro 3 – Sequência de primers e sondas dos genes avaliados no estudo.

Gene	Forward 5'-3'	Probe 6FAM 5'-3' TAMRA	Reverse 5'-3'	Genbank #	Referência
ACTB	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT	ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA	AACCAATAAAAACCTACTCCTCCCTTAA	NM_001101	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-8
AIM1	CGCGGGTATTGGATGTTAGT	GGGAGCGTTGCGGATTATTCGTAG	CCGACCCACCTATACGAAAA	NM_001624	The Johns Hopkins University (Lab. Dr. Sidransky)
APC	GAACCAAAACGCTCCCCAT	CCCCTCGAAAAACCGCCGATTA	TTATATGTCGGTTACGTGCGTTTATAT	NM_000038	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-8
CALCA	GTTTTGAAGTATGAGGGTGACG	ATTCCGCCAATACACAACAACCAATAACG	TTCCCGCCGCTATAAATCG	NM_001741.1	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-8
CCNA1 (CYCLIN A1)	TCGCGGCGAGTTTATTCG	CGTTATGGCGATGCGGTTTCGG	CCGACCGCGACAAACG	NM_003914	The Johns Hopkins University (Lab. Dr. Sidransky)
CCND2 (CYCLIN D2)	TTTGATTTAAGGATGCGTTAGAGTACG	AATCCGCCAACACGATCGACCCTA	ACTTTCTCCCTAAAAACCGACTACG	NM_001759	Lehmann et al. (2002) Am J Pathol 160:605-612
CDH1	AATTTTAGGTTAGAGGGTATCGCGT	CGCCACCCGACCTCGCAT	TCCCCAAAACGAAACTAACGAC	NM_004360	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-9
COX2 (PTGS2)	CGGAAGCGTTCGGGTAAG	TTTCCGCCAAATATCTTTTCTTCTCGCA	AATCCACCGCCCCAAC	NM_000963	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-8
DAPK	GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC	TTCGGTAATTCGTAGCGGTAGGTTTGG	CCCTCCAAACGCCGA	NM_004938	Harden et al. (2003) Clinical Cancer Res 9:1370-1375
ESR1	GGCGTTGCTTTTGGGATTG	CGATAAAACCGAACACCCGACGA	GCCGACACCGGAAGCTCTAA	NM_000125	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-8
GSTP1	AGTTGCGCGCGGATTTTC	CGGTGACGTTCCGGGTGTAGCG	GCCCCAATACTAAATCAGCAGC	NM_000852	Jeronimo et al. (2001) J Nat Cancer Inst 93:1747-1752
MGMT	CGAATATACTAAACAACCCGCG	AATCTCGCGATACGACCCGTTTACG	GTATTTTTTCCGGGAGCGAGGC	NM_002412	Harden et al. (2003) Clinical Cancer Res 9:1370-1375
MINT31	GAGTGATTTATTAGGTTTCGTC	ACGCCGAAAAACACTTCCCAAC	CGAAAACGAAACGCCGCGA		The Johns Hopkins University (Lab. Dr. Sidransky)
MLH1	CGTTATATATCGTTGCTAGTATTCGTGTTT	CGCGACGTCAAACGCCACTACG	CTATCGCCGCCTCATCGT	NM_000249	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-8
P14 (ARF)	ACGGGCGTTTTCGGTAGTT	CGACTCTAAACCCTACGCACGCGAAA	CCGAACCTCCAAAATCTCGA	NM_000077	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-8
P15/CDKN2B	AGGAAGGAGAGAGTGCGTCG	TTAACGACACTTCCCTTCTTCCACG	CGAATAATCCACCGTTAACC	NM_004936	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-8
P16/CDKN2A	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	AGTAGTATGGAGTCGGCGCGGG	GACCCCGAACCGGACCGTAA	NM_000077	Harden et al. (2003) Clinical Cancer Res 9:1370-1375
RARB	GGGATTAGAATTTTTATGCGAGTTGT	TGTCGAGAACGCGAGCGATTCCG	TACCCCGACGATACCCAAAC	NM_000965	Hoque et al. (2005) J Clin Endocrinol Metab 90:4011-18
RASSF1A	GCGTTGAAGTCGGGGTTC	ACAAACGCGAACCGAACGAAACCA	CCCGTACTTCGCTAACTTTAAACG	NM_007182	Lehmann et al. (2002) Am J Pathol 160:605-612
RB1	TTAGTTCGCGTATCGATTAGCG	TCACGTCCGCGAAACTCCCGA	ACTAAACGCCGCTCCAA	NM_000321	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-8
SOCS-1	GCGTCGAGTTCGTGGGTATTT	ACAATTCGCTAACGACTATCGCGCA	CCGAAACCATCTTACGCTAA	NM_003745	Müller et al. (2003) Cancer Res 63:7641-7645
THBS1	CGACGCACCAACCTACCG	ACGCCGCGCTCACCTCCCT	GTTTTGAGTTGGTTTTACGTTTCGT	NM_003246	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-8
TIMP3	GCGTCGGAGGTTAAGGTTGTT	AACTCGCTCGCCGCCGAA	CTCTCCAAAATTACCGTACGCG	NM_000362	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-8
MT1G	CGTTTAAGGATTTTGTATTTGGTTTAT	CGCGATCCCGACCTAACTATACGCA	CCGCTAAATCCGCACCG	NM_005950	Weisenberger et al. (2006) Nature Genet 38(7):787-93
SFRP1	GAATTCGTTGCGGAGGGA	CCGTCACCGACGCGAAACCAAT	AAACGAACCGCACTCGTTACC	NM_003012	Weisenberger et al. (2006) Nature Genet 38(7):787-94
HIN1 (SCGB3A1)	TAGGAAGGGGTACGGGTTT	ACTTCTACTACGACCGACGAACC	CGCTCAGACCGTACCCTAA	NM_052863	Fackler et al. (2004) Cancer Res. 64(13):4442-52

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DA POPULAÇÃO

Foram inicialmente identificados 35 casos com diagnóstico confirmado de hepatoblastoma no arquivo médico do Hospital do Câncer A. C. Camargo no período de 1984-2005. Entretanto, de 5 destes não havia bloco de parafina disponível para estudo (apenas lâmina para diagnóstico) e em outros 6 casos o material emblocado era constituído apenas por tecido necrosado. Portanto, os 24 casos que apresentavam tecido tumoral viável no bloco de parafina foram incluídos no estudo, os dados de prontuário foram coletados para análise clínica e foi realizada revisão anátomo-patológica dos blocos.

Embora de todas os casos tenha sido obtido DNA de boa qualidade, de 4 amostras não foi possível amplificação de DNA após o tratamento com bissulfito de sódio. Portanto, 20 casos prosseguiram no estudo, sendo obtidos tanto os dados clínicos quanto moleculares destes pacientes. Para se detectar eventuais viéses de seleção da amostra, a população total de 35 pacientes com diagnóstico de hepatoblastoma confirmado à revisão anátomo-patológica foi comparada com a população selecionada de 20 pacientes efetivamente analisados no estudo. Esta análise demonstrou que, a população selecionada não parece diferir estatisticamente da população total quando consideradas as variáveis categóricas (gênero, raça,

estadiamento SIOPEL e presença de metástases ao diagnóstico) (Tabela 3) e não-catóricas (idade, nível de alfa-fetoproteína ao diagnóstico e tempo de seguimento) (Tabela 4). A sobrevivida global em 5 anos nos dois grupos não foi estatisticamente diferente (74,67% e 77,01%, respectivamente) (Figura 8). Dessa forma, a amostra selecionada de pacientes foi considerada representativa do total de pacientes tratados no hospital.

Tabela 3 - Comparação das variáveis catóricas pesquisadas entre a amostra total de 35 pacientes e a amostra selecionada de 20 pacientes.

Característica	População Total		População Selecionada		p-valor*
	No.	%	No.	%	
Total de pacientes	35		20		
Gênero					
Masculino	24	68,6	13	65	0,507
Feminino	11	31,4	7	35	
Raça					
Branca	25	71,4	16	80	0,628
Parda	7	20	2	10	
Negra	3	8,6	2	10	
PRETEXT SIOPEL					
I e II	7	20	3	15	0,470
III e IV	28	80	17	85	
Metástase ao diagnóstico					
Não	28	80	14	70	0,301
Sim	7	20	6	30	
Histologia					
Fetal	28	90,3	17	85	0,438
Não-fetal	3	9,7	3	15	

* Utilizado teste do qui-quadrado

Tabela 4 - Comparação das variáveis contínuas pesquisadas entre a amostra total de 35 pacientes e a amostra selecionada de 20 pacientes.

Característica	População Total (n=35)		População Selecionada (n=20)		p-valor*
	Média	DP	Média	DP	
Idade (meses)	21,85	21,17	23,88	21,17	0,732
Alfa-fetoproteína ao diagnóstico	529.566	2.016.396	823.056	678.189	0,568
Tempo de seguimento (meses)	80,67	65,78	65,30	52,50	0,375

* Utilizado teste t-student para comparação entre médias

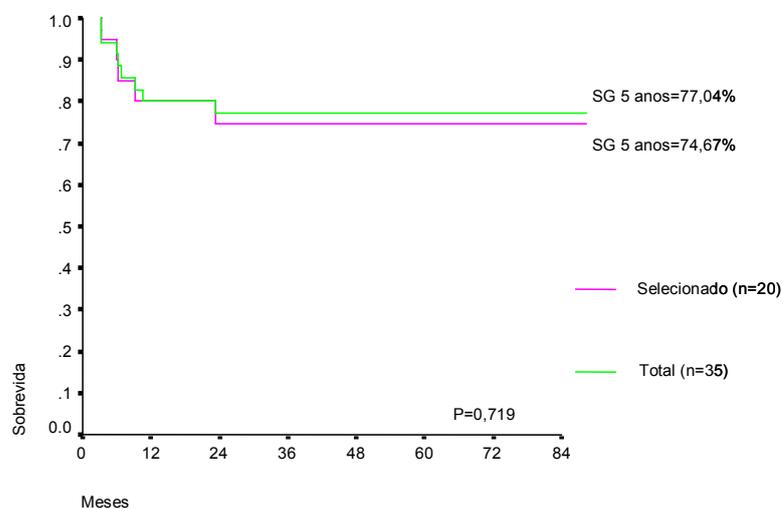


Figura 8 – Gráfico de comparação entre as sobrevidas globais em 5 anos no total de pacientes com hepatoblastoma (n=35) e a população selecionada para o estudo molecular (n=20).

A idade dos pacientes ao diagnóstico variou de 0,36 a 83,68 meses, com média de 23,89 meses. Crianças do gênero masculino (65%) e brancas (80%) foram mais acometidas. O sintoma mais frequentemente relatado foi tumor palpável em abdome (50%), seguido de aumento do volume abdominal em 30% (dados não mostrados). O tempo de início dos sintomas variou 0-12 meses com média de 3 meses. Dos 20 pacientes, 2 (10%)

apresentavam síndromes genéticas (1 neurofibromatose e 1 hemi-hipertrofia isolada), nenhum tinha antecedente de prematuridade e apenas 1 nasceu com baixo peso (dados não mostrados). PRETEXT SIOPEL classificados como III e IV ocorreram em 85% dos casos estudados. Foram detectadas metástases ao diagnóstico em 6 dos 20 pacientes (30%) e o pulmão foi o sítio acometido em todos os casos. Em 3 dos pacientes metastáticos foi realizada abordagem cirúrgica dos nódulos e em 2 deles havia evidência de neoplasia viável. Obteve-se o nível de alfa-fetoproteína ao diagnóstico em 16 dos 20 pacientes estudados, sendo que 2 apresentavam níveis menores que 100ng/mL e vieram a falecer devido a doença. Em 19 dos 20 pacientes (95%) o esquema de tratamento proposto foi quimioterapia neoadjuvante, seguido de ressecção do tumor primário e quimioterapia adjuvante. Apenas um paciente não foi tratado com neoadjuvância, entretanto o mesmo faleceu por complicação decorrente da quimioterapia (cardiotoxicidade). O esquema quimioterápico com cisplatina, carboplatina e doxorrubicina foi utilizado em 50% dos casos, enquanto cisplatina associada a doxorrubicina em 45%. Uso isolado de cisplatina foi feito em apenas 1 paciente da amostra (dados não mostrados). A mediana do tempo de tratamento foi de 6,6 meses. Os procedimentos cirúrgicos realizados foram assim distribuídos: 2 (10%) segmentectomias, 4 (20%) hemi-hepatectomias esquerdas, 11 (55%) hemi-hepatectomias direitas e 3 (15%) hepatectomias totais seguidas de transplante hepático (dados não mostrados). O tipo histológico misto (presença de mesênquima) foi observado em 65% dos casos. O componente fetal estava presente em 85% dos casos. O subtipo anaplásico

foi detectado em apenas 1 paciente. Morte pela doença ocorreu em 5 pacientes (25%), dos quais 3 recaíram após término do tratamento e 2 apresentaram refratariedade ao mesmo. Um paciente faleceu por cardiotoxicidade à doxorubicina. O tempo de seguimento para os pacientes vivos sem evidência de doença variou de 23,06-184,90 meses, com mediana de 54,72 meses (Tabela 5).

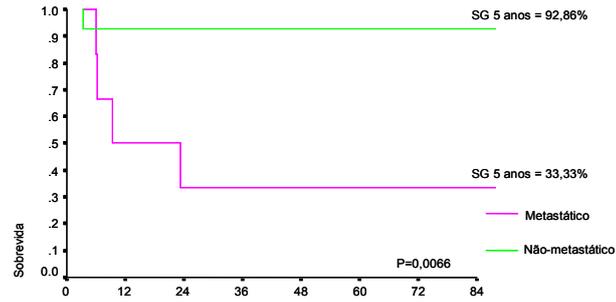
A análise das sobrevidas dos 20 pacientes mostrou que a ausência ou presença de metástases ao diagnóstico influenciou a taxa de sobrevida global em 5 anos (92,85% x 33,33%, respectivamente; $p=0.0066$) (Figura 9-A). Apesar dos pacientes com PRETEXT SIOPEL mais avançados terem apresentado taxas de sobrevida global em 5 anos menores (100%, 77,78% e 62,5%, para PRETEXT II, III e IV, respectivamente), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, provavelmente devido ao pequeno número de pacientes com PRETEXT II (Figura 9-B). No entanto, quando feita estratificação de risco conforme critérios do SIOPEL, observou-se diferença estatisticamente significativa nas taxas de sobrevida livre de doença em 5 anos quando considerados os grupos de Alto Risco e Risco Básico (55,5% X 100%, respectivamente; $p=0.0217$) (Figura 9-C). Foi observada maior taxa de sobrevida global em pacientes que apresentavam algum componente fetal ao exame histopatológico (81,33% fetal X 33,33% não-fetal), entretanto a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0.0745$) (Figura 9-D). Não houve diferença entre as taxas de sobrevida daqueles que apresentavam componente mesenquimal quando comparados

àqueles com subtipo histológico puro (76,92% misto X 71,43% puro; $p=0,8151$) (Figura 9-E).

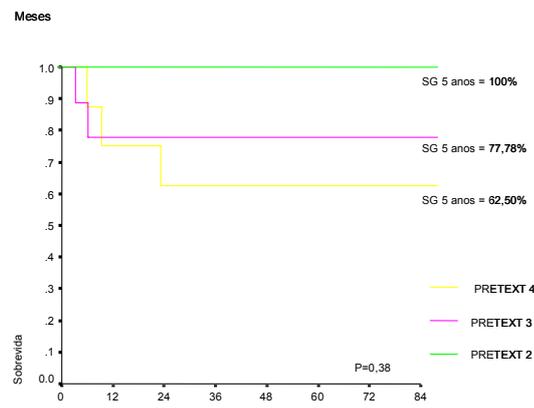
Pacientes com idade inferior a 2 anos parecem ter evoluído com pior taxa de sobrevida quando comparados àqueles maiores de 2 anos, entretanto a diferença não foi estatisticamente significativa (61,64% X 100%, respectivamente; $p=0.0516$) (Figura 9-F).

Tabela 5 - Características clínicas dos 20 pacientes com hepatoblastoma submetidos ao estudo molecular.

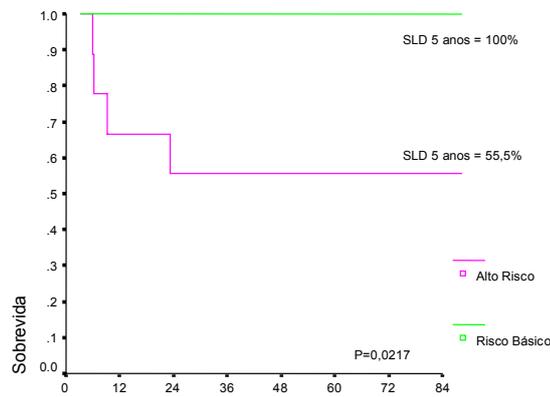
Paciente	Ano do Diagn.	Idade ao Diagnóstico (meses) / Gênero	Raça	Tempo de início dos sintomas (meses)	Histologia	PRETEXT SIOPEL	Metástase ao Diagnóstico	Alfa-fetoproteína ao diagnóstico	Tempo de Seguimento (meses)	Status atual	Observação
1	1993	9.74 / F	Parda	2	Puro com componente fetal e embrionário	III	Não	ignorado	142.17	Vivo sem doença	
2	1996	29.44 / M	Branca	0	Puro com componente fetal e embrionário	II	Não	6637	126.38	Vivo sem doença	
3	1997	15.43 / M	Branca	3	Misto com componente embrionário	III	Sim	400000	6.25	Morte pela doença	Refratariedade ao tratamento
4	1998	7.63 / M	Branca	0.1	Anaplásico	IV	Sim	3.2	9.24	Morte pela doença	Recaída após 6 meses
5	1999	11.58 / F	Branca	1	Misto com componente fetal	III	Não	ignorado	3.26	Morte por complicação do tratamento	Cardiotoxicidade
6	2002	83.68 / F	Branca	0.1	Puro com componente fetal e embrionário	II	Não	18652	51.84	Vivo sem doença	
7	2003	10.63 / M	Branca	1	Misto com componente fetal	IV	Não	824.2	54.08	Vivo sem doença	
8	2003	19.18 / F	Branca	12	Misto com componente fetal e embrionário	IV	Sim	200000	23.22	Morte pela doença	Recaída após 3 meses
9	2003	25.76 / F	Branca	7	Puro com componente fetal e embrionário	III	Não	130000	23.06	Vivo sem doença	
10	2005	20.86 / M	Branca	1	Misto com componente fetal	IV	Não	30000	43.29	Vivo sem doença	
11	1995	73.26 / M	Branca	6	Puro fetal	II	Não	17600	134.14	Vivo sem doença	
12	1997	34.24 / M	Branca	8	Misto com componente fetal e embrionário	IV	Sim	221500	102.8	Vivo sem doença	
14	1998	42.43 / M	Branca	3	Misto com componente fetal	III	Sim	533000	69.11	Vivo sem doença	
15	1998	9.05 / M	Branca	1	Misto com componente fetal	III	Não	ignorado	55.36	Vivo sem doença	
16	2002	22.5 / M	Negra	3	Misto com componente fetal e embrionário	IV	Não	10976000	46.38	Vivo sem doença	
17	2002	27.7 / F	Negra	3	Misto com componente embrionário	IV	Não	ignorado	50.3	Vivo sem doença	
18	2003	0.36 / M	Branca	0	Misto com componente fetal	III	Não	387040	53.32	Vivo sem doença	
20	2005	9.74 / M	Parda	4	Puro fetal	IV	Sim	223400	5.99	Morte pela doença	Hemihipertrofia Refratariedade ao tratamento
22	1987	15 / M	Branca	5	Misto com componente fetal e embrionário	III	Não	24190	184.9	Vivo sem doença	
23	2005	9.67 / F	Branca	0.5	Misto com componente fetal	III	Não	63	120.89	Morte pela doença	Neurofibromatose Recaídas múltiplas



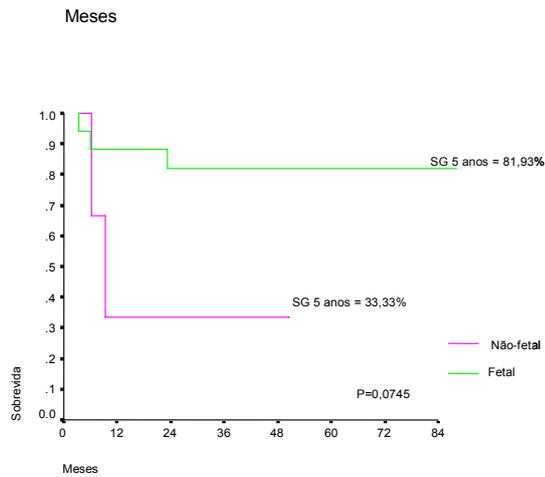
A



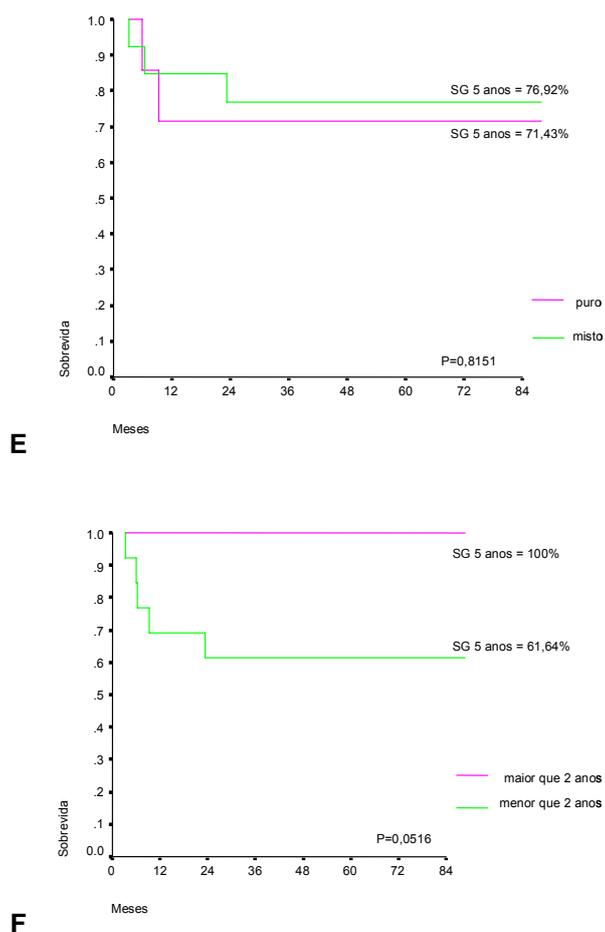
B



C



D



Legenda: A) presença de metástase ao diagnóstico; B) estadiamento PRETEXT SIOPEL; C) Estratificação por grupo de risco SIOPEL D) subtipo histológico (fetal ou não-fetal); E) tipo histológico (puro ou misto) e F) idade ao diagnóstico (maior ou menor de 2 anos).

Figura 9 - Gráficos de comparações entre as taxas de sobrevida conforme características clínicas.

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA E TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

Obteve-se para as amostras tumorais entre 0,11 μ g e 103,15 μ g de DNA com o método de extração utilizado (Quadro 4). Dos tecidos hepáticos normais foram obtidas quantificações entre 5,78 μ g e 20,30 μ g de DNA (Quadro 5). O grau de contaminação do material com proteína ou RNA foi avaliado através da relação das absorvâncias a 260nm e 280nm e, como

pode ser observado no Quadro 4, a grande maioria das amostras apresentou valores ao redor de 1,8, o que atesta a boa qualidade do DNA obtido.

Cerca de 2 μ g de DNA foram tratados com bissulfito de sódio. Caso a amostra não apresentasse amplificação para o gene *ACTB* pós-conversão pelo bissulfito, repetia-se o tratamento com 8 μ g de DNA.

Algumas amostras tumorais (13T, 19T, 21T e 24T) foram eliminadas do estudo ou porque não havia DNA suficiente para um novo tratamento (13T – quantidade total de 0,32 μ g e 19T – quantidade total de 0,11 μ g) ou porque mesmo após aumento da quantidade de DNA tratado não houve amplificação do DNA (21T e 24T).

Quadro 4 - Concentração de DNA nas amostras tumorais e margens estimada por espectrofotometria e resultado da PCR para ACTB após tratamento com bissulfito.

Amostra	Tipo	Concent. (μg)	260nm	260/280	Amplificação do gene ACTB após bissulfito
1T	Tumor	103.15	1.179	1.80	Sim
2T	Tumor	81.65	0.933	1.69	Sim
3T	Tumor	43.95	0.502	1.86	Sim
4T	Tumor	43.05	0.492	1.85	Sim
5T	Tumor	42.35	0.484	1.84	Sim
6T	Tumor	43.60	0.498	1.88	Sim
7T	Tumor	11.80	0.135	1.70	Sim
8T	Tumor	31.35	0.358	1.87	Sim
9T	Tumor	25.05	0.286	1.85	Sim
10T	Tumor	4.65	0.053	1.82	Sim
11T	Tumor	25.47	10.191	1.93	Sim
12T	Tumor	4.00	1.6	1.92	Sim
13T	Tumor	0.32	0.128	1.82	Não
14T	Tumor	0.58	0.236	2.13	Sim
15T	Tumor	1.77	0.712	1.87	Sim
16T 1	Tumor1	2.06	0.827	1.94	Sim
16T 2	Tumor2	1.39	0.557	1.87	Sim
17T	Tumor	6.01	2.406	1.97	Sim
18T	Tumor	1.63	0.653	1.99	Sim
19T	Tumor	0.11	0.047		Não
20T	Tumor	10.07	4.031	1.6	Sim
21T	Tumor	34.05	13.623	1.81	Não
22T	Tumor	12.02	4.811	1.83	Sim
23T	Tumor	17.96	7.188	1.84	Sim
24T	Tumor	1.36	0.544	1.97	Não

Legenda: Espectrofotometria com leitura de absorbância a 260 e 280nm.

Quadro 5 - Concentração de DNA nas amostras de tecido hepático normal fetal (NF) e adulto e resultado da PCR para ACTB após tratamento com bissulfito.

Amostra	Tipo	Concent. (μg)	260nm	260/280	Amplificação do gene ACTB após bissulfito
1NF	Fetal	20.30	8,117	1,84	Sim
2NF	Fetal	8.74	3,496	1,87	Sim
3NF	Fetal	7.92	3,168	1,9	Sim
4NF	Fetal	12.16	4,867	1,85	Sim
5NF	Fetal	5.78	2,312	1,81	Sim

Legenda: Espectrofotometria com leitura de absorbância a 260 e 280nm.

4.3 RESULTADOS DA MSP-Q

4.3.1 Estudo Piloto

Devido a pouca quantidade de DNA obtida de algumas amostras, não seria possível a realização da pesquisa de hipermetilação dos 25 genes (*AIM1*, *APC*, *CALCA*, *CCNA1*, *CCND2*, *CDH1*, *COX2 (PTGS2)*, *DAPK*, *ESR1*, *GSTP1*, *MGMT*, *MINT31*, *MLH1*, *P14 ARF*, *CDKN2B*, *CDKN2A*, *RARB*, *RASSF1A*, *RB1*, *SOCS1*, *THBS1*, *TIMP3*, *MT1G*, *SFRP1*, *HIN1(SCGB3A1)*) para todas as amostras do estudo. Para contornar este problema, foi realizado um estudo piloto em que o perfil de metilação destes 25 genes foi avaliado primeiramente em 10 amostras tumorais. Nesta análise não foi encontrada metilação detectável para os genes *THBS1*, *RB1*, *CDKN2A*, *P14 ARF*, *MLH1*, *MINT31*, *MGMT*, *DAPK*, *CCNA1* e *AIM1* nas amostras avaliadas, enquanto que 7 genes (*CALCA*, *ESR1*, *GSTP1*, *CDKN2B*, *RARB*, *TIMP3*, *SFRP1*), apresentaram um nível baixo de metilação (10-30%). Foram escolhidos para prosseguir no estudo aqueles genes que tivessem algum nível de metilação detectável em pelo menos 40% das amostras avaliadas, sendo selecionados 8 genes (*APC*, *CCND2*, *CDH1*, *COX2*, *HIN1*, *MT1G*, *RASSF1A* e *SOCS1*) para a pesquisa nos demais indivíduos (Figura 10).

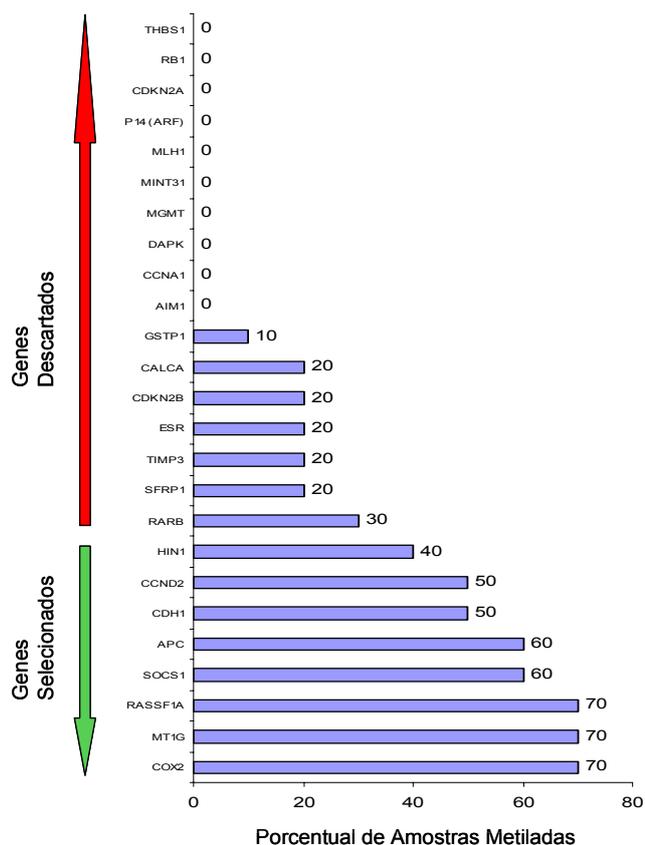


Figura 10 - Gráfico de percentual de amostras metiladas para cada um dos 25 genes avaliados no estudo-piloto.

4.3.2 Comparação entre o nível de metilação nos tecidos estudados

O perfil de metilação dos 8 genes selecionados no estudo piloto foi avaliado no restante das amostras tumorais (10) e nas amostras de tecido hepático normal fetal (5).

Os resultados desta análise juntamente com o estudo piloto demonstraram que *RASSF1A* (80%), *COX2* (55%), *MT1G* (55%) e *SOCS1* (40%) são os genes mais frequentemente metilados nos hepatoblastomas, enquanto que *APC* (30%), *CCND2* (30%), *CDH1* (30%) e *HIN1* (25%) encontram-se moderadamente metilados nestes tumores (Quadro 6).

Também pode ser observado que 95% das amostras tumorais avaliadas apresentaram pelo menos um destes oito genes metilados (Quadro 6).

A análise das amostras normais revelou que *COX2* (100%), *CCND2* (80%) e *HIN1* (80%) também estão frequentemente metilados em tecido hepático fetal, enquanto que *CDH1* (20%) e *MT1G* (20%) apresentam uma discreta metilação nestes tecidos. Por outro lado, não foi detectada metilação dos genes *APC*, *RASSF1A* e *SOCS1* nas amostras normais avaliadas (Quadro 7).

Quadro 6 - Valores de PMR para as 20 amostras tumorais.

Amostra / Genes	APC	CCND2	CDH1	COX2	HIN1	MT1G	RASSF1A	SOCS	% Genes Metilados na Amostra
1T	0.00%	2.50%	15.50%	100.80%	13.60%	0.00%	29.80%	1.80%	75.00%
2T	3.90%	56.30%	10.50%	48.40%	0.00%	24.50%	0.00%	39.50%	75.00%
3T	0.00%	0.00%	0.00%	4.60%	4.90%	4.30%	91.50%	0.00%	50.00%
4T	28.60%	3.70%	3.80%	38.50%	8.20%	5.60%	0.40%	12.90%	100.00%
5T	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	8.00%	0.00%	0.00%	12.5%
6T	0.00%	1.09%	4.69%	67.43%	0.00%	14.12%	101.63%	59.53%	25.00%
7T	0.00%	0.00%	2.50%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	56.40%	25.00%
8T	34.60%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	89.90%	0.00%	25.00%
9T	22.20%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.90%	0.50%	5.00%	50.00%
10T	0.00%	0.00%	0.00%	7.00%	0.00%	0.00%	6.60%	0.00%	25.00%
11T	0.00%	0.00%	0.00%	6.40%	0.00%	0.00%	102.00%	61.00%	37.50%
12T	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	30.80%	0.00%	12.50%
14T	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
15T	54.30%	0.00%	2.50%	33.90%	1.40%	0.00%	94.00%	74.20%	87.50%
16T	0.40%	1.00%	0.00%	22.30%	27.80%	1.80%	3.70%	0.00%	75.00%
17T	0.00%	0.80%	0.00%	5.30%	0.00%	2.40%	30.70%	0.00%	50.00%
18T	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	61.40%	0.00%	12.50%
20T	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	140.00%	38.10%	0.00%	25.00%
22T	0.00%	0.00%	0.00%	8.40%	0.00%	0.00%	79.20%	0.00%	25.00%
23T	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	18.80%	39.00%	0.00%	25.00%
% de amostras metiladas	30%	30%	30%	55%	25%	55%	80%	40%	

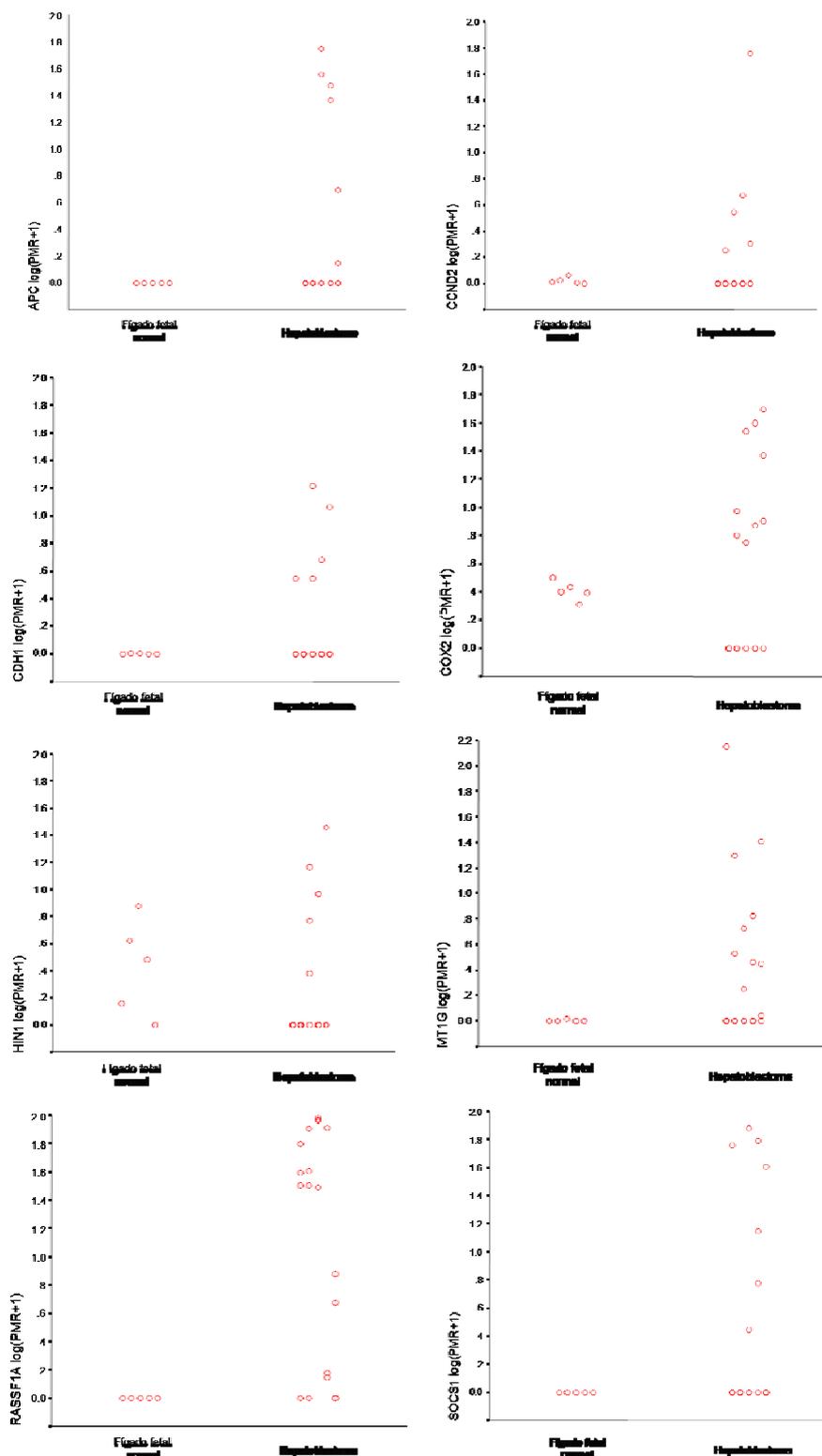
* Sombreados aqueles genes que apresentaram algum nível de metilação na amostra

Quadro 7 - Valores de PMR para as amostras de fígado normal fetal.

Amostra / Gene	APC	CCND2	CDH1	COX2	HIN1	MT1G	RASSF1A	SOC3	% Genes Metilados na Amostra
1NF	0.00%	0.02%	0.00%	2.17%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	25%
2NF	0.00%	0.05%	0.00%	1.51%	3.21%	0.00%	0.00%	0.00%	38%
3NF	0.00%	0.15%	0.01%	1.71%	6.53%	0.04%	0.00%	0.00%	63%
4NF	0.00%	0.01%	0.00%	1.04%	0.43%	0.00%	0.00%	0.00%	38%
5NF	0.00%	0.00%	0.00%	1.47%	2.05%	0.00%	0.00%	0.00%	25%
% de Amostras Metiladas	0%	80%	20%	100%	80%	20%	0%	0%	

* Sombreados aqueles genes que apresentaram algum nível de metilação na amostra

Embora tenham sido considerados positivos, o nível de metilação dos genes *CDH1* e *MT1G* detectado em algumas das amostras de fígado normal foi extremamente baixo (<0,05%) e, devido a alta sensibilidade do método de quantificação utilizado, estes valores podem representar apenas leituras de fundo (background), por isso, há estudos que defendem o estabelecimento de linhas de corte como forma de descartar estes níveis muito baixos de metilação, pois eles podem não representar efeitos biológicos. Por outro lado, os genes *CCND2*, *COX2* e *HIN1* apresentaram níveis indiscutíveis de metilação nas amostras normais (Figura 11)



Legenda: Gráficos (escala logarítmica), ilustrando a diferença entre os níveis de metilação no fígado fetal normal e nos hepatoblastomas para os 8 genes estudados (APC, CCND2, CDH1, COX2, HIN1, MT1G, RASSF1A e SOCS1).

Figura 11 - Gráficos de dispersão com valores de PMR.

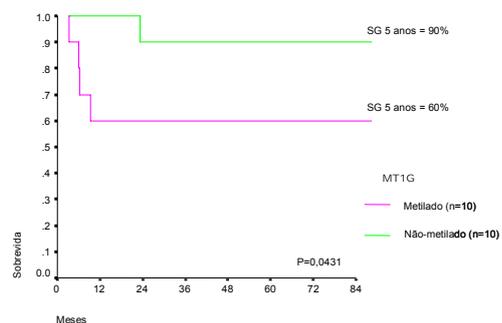
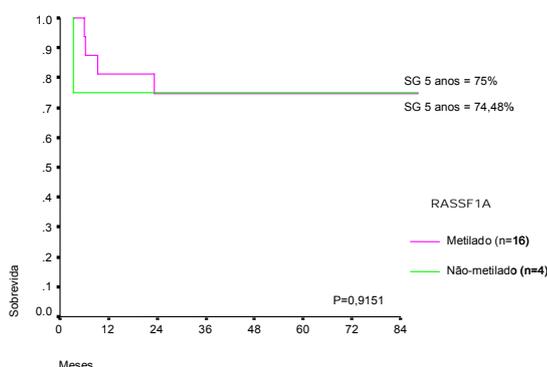
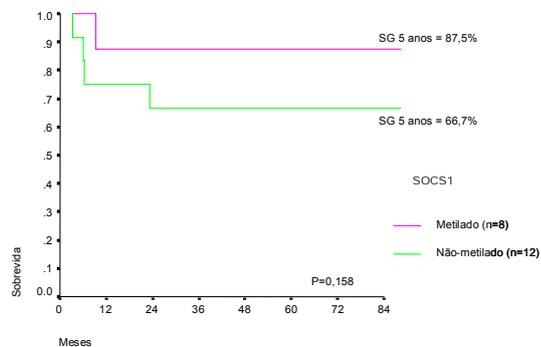
4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E HIPERMETILAÇÃO

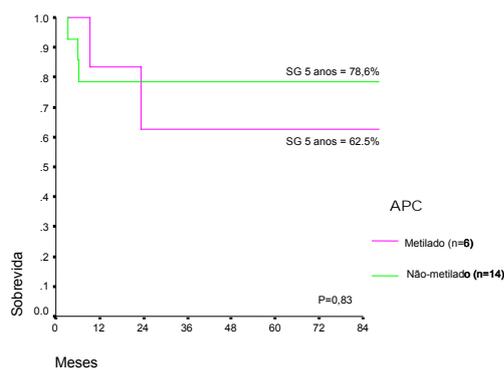
O passo seguinte foi verificar se existia correlação entre o perfil de metilação aberrante e características clínico-patológicas dos pacientes. Nesta análise foram incluídos os genes que apresentaram hipermetilação específica para as amostras tumorais, ou seja, nenhuma metilação nas amostras normais (*APC*, *RASSF1A* e *SOCS1*). O gene *MT1G* também prosseguiu no estudo porque, apesar de estar metilado em uma baixa porcentagem de amostras normais (20%), apresentou uma elevada frequência de metilação nas amostras tumorais (55%) e, além disso, a única amostra normal positiva apresentou baixíssimo nível de metilação (0,04%). Os genes *CCND2*, *COX2* e *HIN1* não foram submetidos à essa análise porque apresentaram alta frequência de metilação nas amostras de fígado fetal normal. O gene *CDH1* foi eliminado desta análise porque apresentou um nível de metilação baixo e semelhante tanto nas amostras de hepatoblastoma (30%) quanto nas amostras normais (20%)

A comparação pelo teste de log-rank das sobrevidas globais mostrou que aqueles pacientes que apresentam metilação no tumor (independente do valor de PMR) para o gene *MT1G* apresentaram pior sobrevida quando comparados aos que não tinham a alteração (SG 5 anos = 60% X 90%, respectivamente; $p=0,0431$) (Figura 12-A). De forma mais contundente, a análise univariada de sobrevida pelo modelo de regressão de Cox (Tabela 6)

mostrou que quanto maior o valor de PMR (variável contínua) para o gene *MT1G*, menor a sobrevida global dos pacientes ($p=0,033$).

Para os genes *RASSF1A*, *SOCS1* e *APC* não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as sobrevidas (Figuras 12-B-D, respectivamente).

**A****B****C**



D

Legenda: Comparação entre aqueles pacientes que apresentam metilação detectável para os genes *MT1G*, *RASSF1A*, *SOCS1* e *APC* e pacientes que não apresentam metilação.

Figura 12 – Gráfico de sobrevividas globais nos grupos de pacientes que apresentam metilação detectável.

Tabela 6 - Comparação entre nível de metilação nos genes estudados e sobrevivida global pelo modelo de Cox.

Gene	β	Significância (p-valor)*
APC	1,654	0,476
MT1G	2,196	0,033
RASSF1A	0,007	0,995
SOCS1	-5,222	0,271

*Análise univariada pelo modelo de regressão de Cox

Não foi possível detectar associação significativa entre o estado de hipermetilação dos quatro genes-alvos avaliados e características clínicas como: idade, presença de metástases ao diagnóstico, estadiamento SIOPEL ou subtipo histológico (Tabelas 7, 8, 9 e 10).

Tabela 7 - Associação entre o estado de metilação do gene MT1G e variáveis clínicas estudadas.

Característica	MT1G		Significância (p-valor)*
	Não-metilado	Metilado	
Idade			
Menor que 2 anos	7 (53,8%)	6 (46,2%)	0,5
Maior ou igual a 2 anos	3 (42,9%)	4 (57,1%)	
Metástase ao diagnóstico			
Não	7 (50,0%)	7 (50,0%)	0,68
Sim	3 (50,0%)	3 (50,0%)	
PRETEXT SIOPEL			
I e II	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0,5
III e IV	9 (52,9%)	8 (47,1%)	
Presença de Mesênquima			
Sim (Misto)	8 (61,5%)	5 (38,5%)	0,175
Não (Puro)	2 (28,6%)	5 (71,4%)	

* Calculado pelo teste exato de Fisher

Tabela 8 - Associação entre o estado de metilação do gene RASSF1A e variáveis clínicas estudadas.

Característica	RASSF1A		Significância (p-valor)*
	Não-metilado	Metilado	
Idade			
Menor que 2 anos	2 (15,4%)	11 (84,6%)	0,439
Maior ou igual a 2 anos	2 (28,6%)	5 (71,4%)	
Metástase ao diagnóstico			
Não	3 (21,4%)	11 (78,6%)	0,657
Sim	1 (16,7%)	5 (83,3%)	
PRETEXT SIOPEL			
I e II	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0,509
III e IV	3 (17,6%)	14 (82,4%)	
Presença de Mesênquima			
Sim (Misto)	3 (23,1%)	10 (76,9%)	0,561
Não (Puro)	1 (14,3%)	6 (85,7%)	

* Calculado pelo teste exato de Fisher

Tabela 9 – Associação entre o estado de metilação do gene SOCS1 e variáveis clínicas estudadas.

Característica	SOCS1		Significância (p-valor)*
	Não-metilado	Metilado	
Idade			
Menor que 2 anos	9 (69,2%)	4 (30,8%)	0,251
Maior ou igual a 2 anos	3 (42,9%)	4 (57,1%)	
Metástase ao diagnóstico			
Não	7 (50%)	7 (50%)	0,187
Sim	5 (83,3%)	1 (16,7%)	
PRETEXT SIOPEL			
I e II	0	3 (100%)	**
III e IV	12 (70,6%)	5 (23,4%)	
Presença de Mesênquima			
Sim (Misto)	11 (84,6%)	2 (15,4%)	0,004
Não (Puro)	1 (14,3%)	6 (85,7%)	

* Calculado pelo teste exato de Fisher

** Incalculável

Tabela 10 - Associação entre o estado de metilação do gene APC e variáveis clínicas estudadas.

Característica	APC		Significância (p-valor)*
	Não-metilado	Metilado	
Idade			
Menor que 2 anos	9 (69,2%)	4 (30,8%)	0,664
Maior ou igual a 2 anos	5 (71,4%)	2 (28,6%)	
Metástase ao diagnóstico			
Não	10 (71,4%)	4 (28,6%)	0,613
Sim	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
PRETEXT SIOPEL			
I e II	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0,681
III e IV	12 (70,6%)	5 (29,4%)	
Presença de Mesênquima			
Sim (Misto)	10 (76,9%)	3 (23,1%)	0,336
Não (Puro)	4 (57,1%)	3 (42,9%)	

* Calculado pelo teste exato de Fisher

5 DISCUSSÃO

Uma das grandes dificuldades de se realizar estudos envolvendo hepatoblastoma consiste na raridade desse tumor. No estudo clínico multicêntrico e internacional SIOPEL 2 que contou com a contribuição de 72 centros de 19 países conseguiram-se agrupar apenas 150 pacientes portadores da doença no período de 3 anos (PERILONGO et al. 2004), número irrisório se comparado aos 2.169 pacientes alocados em 5 anos no estudo BFM 95 de leucemia linfóide aguda, a neoplasia mais freqüente em crianças (SCHRAPPE et al. 2000). Mesmo diante da baixa freqüência global, a casuística de pacientes portadores de hepatoblastoma incluída neste estudo (casos confirmados e tratados no Hospital do Câncer A. C. Camargo em um período de cerca de 20 anos) foi de 35 indivíduos, o que certamente constitui um número expressivo, tendo em vista se tratar de uma única instituição.

Para o principal objetivo do estudo, entretanto, não bastava apenas a obtenção dos dados clínicos desses pacientes, mas essencialmente a existência de peças cirúrgicas com tecido tumoral passível de extração de DNA em quantidade e qualidade suficientes para a análise de presença de hipermetilação. Assim, o número de pacientes analisados passou de 35 para 20, pois 5 casos não possuíam material parafinado para pesquisa, em 6 casos todo o conteúdo armazenado era constituído apenas por necrose e de 4 casos não foi possível obter DNA com boa qualidade após o tratamento

com bisulfito de sódio. Os casos completamente necrosados poderiam representar o subgrupo com melhor resposta à quimioterapia e a sua não inclusão no estudo poderia levar a um viés na correlação entre os dados clínicos e moleculares. Entretanto, as análises realizadas demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa entre o grupo total de casos (35) e os submetidos a análise molecular (20) quanto às características clínicas analisadas ou quanto ao prognóstico. Também cabe ressaltar que devido a raridade desta neoplasia uma casuística de 20 casos é um grupo de tamanho expressivo o que justificou a realização do estudo.

Por se tratar de um estudo retrospectivo, era essencial que os prontuários possuíssem a maior quantidade de dados relevantes para melhor caracterização clínica dos pacientes. Observou-se, no entanto, que muitos dados, principalmente aqueles referentes às medidas tumorais por exames de imagem, só passaram a ser descritos sistematicamente em prontuário mais recentemente. Além disso, quando descritas as medidas, notou-se que a obtenção das mesmas não era feita da mesma forma, o que, portanto, poderia prejudicar a comparação entre os indivíduos. Optou-se, portanto, por desconsiderar este dado. Por outro lado, a descrição dos segmentos hepáticos acometidos foi obtida em todos os pacientes.

Notou-se também que o formato dos laudos anátomo-patológicos foi muito modificado com o passar do tempo, com isso prejudicando a obtenção dos dados sobre comprometimento linfonodal e de margens cirúrgicas microscópicas.

Uma forma indireta de verificar se nossa pequena amostra (20 casos) não era enviesada o suficiente para não permitir a detecção de diferenças estatísticas confiáveis foi verificar se as características clínico-epidemiológicas de nossa população se assemelhavam àquelas descritas por outros grupos de pesquisa. Além disto, verificamos se os fatores prognósticos clássicos da doença se mantinham estatisticamente relevantes em nossa população estudada.

No estudo cooperativo alemão de tumores hepáticos HB-94, que reuniu 69 crianças com hepatoblastoma em um período de 5 anos, a mediana de idade ao diagnóstico foi de 16 meses e relação masculino:feminino foi de 2,5:1,0. A distribuição dos estádios de acordo com o sistema de estadiamento pós-cirúrgico foi: 39% estágio I, 5% estágio II, 36% estágio III e 29% estágio IV. Nesse estudo, os fatores que estatisticamente foram associados a um pior prognóstico foram: volume tumoral maior que 1000cm^3 , multifocalidade do tumor, invasão de grandes vasos pelo tumor, presença de metástases à distância e níveis de alfa-fetoproteína menores que 100ng/mL ao diagnóstico. A sobrevida livre de doença conforme os estádios ficou assim distribuída: 96% estágio I, 100% estágio II, 76% estágio III e 36% estágio IV (FUCHS et al. 2002). Em nosso estudo, também encontramos uma frequência maior de acometimento do gênero masculino (relação masc : fem = 1,85:1,0). Apesar de não termos obtido dados precisos sobre volume tumoral e invasão vascular tumoral, observamos que a presença de metástases à distância foi um forte preditor de pior prognóstico em nossos pacientes. Além disso, os únicos dois

pacientes que apresentavam níveis menores que 100ng/mL de alfa-fetoproteína ao diagnóstico faleceram devido à doença. Evidentemente, diferenças de sobrevividas entre pacientes com níveis baixos e altos de alfa-fetoproteína não poderiam ser detectadas estatisticamente devido ao reduzido número de indivíduos no primeiro grupo.

PERILONGO et al. (2000b) relataram no estudo SIOPEL1 a presença de metástases pulmonares ao diagnóstico em 20% dos pacientes. Nestes, a SLE em 5 anos foi de 28%, sendo significativamente pior do que a SLE dos hepatoblastomas localizados (77% em 5 anos).

Em nossa casuística, 30% das crianças apresentavam metástases à distância e, além disso, foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as sobrevividas globais dos pacientes metastáticos quando comparados àqueles com doença localizada (33,3% X 92,86%, respectivamente).

O estudo SIOPEL 2, que estratificou os pacientes com hepatoblastoma em risco básico (tumor confinado ao fígado com até 3 setores hepáticos acometidos) e alto risco (tumor acometendo os 4 setores hepáticos e/ou metástases ou disseminação abdominal extra-hepática), obteve uma SLD em 3 anos de 89% e 47% para os dois grupos, respectivamente. Quando considerado apenas o estadiamento pré-cirúrgico PRETEXT as taxas de sobrevivida global em 3 anos para pacientes I, II, III e IV foram, respectivamente, 100%, 95%, 84% e 61% (SCHRAPPE et al. 2000). Apesar de não ter sido encontrada diferença estatisticamente significativa entre as sobrevividas globais dos nossos pacientes quando considerado apenas o PRETEXT, verificamos que as mesmas se

assemelham àquelas obtidas pelo SIOPEL (100%, 77,8%, 62,5% para PRETEXT II, III e IV, respectivamente). Além disso, quando estratificados por risco, conforme critérios do SIOPEL, os pacientes classificados como alto risco apresentaram menor sobrevida livre de doença em 5 anos se comparados ao risco básico (55,5% X 100%, respectivamente; $p=0.0217$).

A ausência de pacientes PRETEXT I em nossa amostra de 20 indivíduos segue, em parte, a distribuição observada no SIOPEL 2, no qual apenas 6 crianças de 135 (4,4%) foram classificadas nesse estágio (PERILONGO et al. 2004). De fato, a detecção do hepatoblastoma em fase inicial é um fato raro, mesmo em países ricos.

Tendo em vista a similaridade de nossos dados com as características clínico-epidemiológicas de outros estudos publicados em literatura, bem como a observação de que alguns dos fatores prognósticos clássicos também se evidenciaram em nossa população, consideramos possível que eventuais achados estatisticamente significativos identificados pudessem ser confiáveis, apesar do pequeno tamanho da casuística analisada.

Além da pequena casuística das pesquisas moleculares que envolvem hepatoblastoma, observamos que os estudos descritos na literatura referentes a análise de hipermetilação se limitam a examinar poucos genes. Em nosso estudo, foi avaliado o perfil de hipermetilação do DNA de 25 genes, o que constitui o maior número de genes pesquisados em hepatoblastoma até o presente momento.

Além disto, os outros estudos que analisaram o perfil de metilação dos hepatoblastoma utilizaram a técnica de MSP convencional. O nosso estudo, pela primeira vez, utiliza um método quantitativo (MSP-Q) na análise de metilação em hepatoblastoma, sendo este método capaz de detectar uma cópia do gene metilado em meio a 10.000 cópias não-metiladas. A técnica fornece, ainda, dados quantitativos à respeito do percentual de metilação presente em cada amostra, além de ser bastante automatizado, permitindo a análise de várias amostras ao mesmo tempo, com pouca manipulação do material após amplificação, o que reduz a possibilidade de erros. Além disso, observa-se uma redução da subjetividade na análise dos resultados da MSP-Q quando comparada a MSP convencional, uma vez que apenas aquelas curvas de amplificação que cruzam o *threshold* são consideradas positivas (EADS et al. 2000; TRINH et al. 2001; OGINO et al. 2006).

Uma vez que os tumores disponíveis para esta pesquisa eram provenientes de tecidos fixados em formaldeído e parafinados, foi necessária uma adequação de todo o método de análise para obtenção de resultados satisfatórios. Sabe-se que, devido ao processo de fixação com formaldeído, ocorrem ligações cruzadas entre as bases nitrogenadas dos ácidos nucléicos, o que ocasiona fragmentação dos mesmos (WU et al. 2002). LEHMANN e KREIPE (2001) observaram que, utilizando fixação do tecido com formaldeído tamponado com fosfato, o comprimento dos fragmentos de DNA recuperados após extração variava entre 300-400bp. Soma-se a isso a considerável degradação do DNA que ocorre durante a exposição ao bissulfito de sódio, pois RAIZIS et al. (1995) demonstraram

que essa fragmentação ocorre em consequência da depurinação do DNA durante o tratamento com bissulfito e que a mesma era dependente do tempo de exposição e da concentração de bissulfito de sódio utilizada. Tendo em vista que os fragmentos de DNA a serem amplificados durante a reação de MSP-Q são pequenos (80-200bp), consegue-se contornar, em parte, o problema da degradação do DNA proveniente de tecido parafinado. Entretanto, em nossa investigação, é provável que a degradação do DNA decorrente do processo de fixação e da exposição ao bissulfito de sódio tenha sido o motivo pelo qual não se conseguiu amplificação (após tratamento com bissulfito) de 4 amostras (16,6%) dos 24 pacientes portadores de hepatoblastoma que tinham material disponível no arquivo do Departamento de Patologia do Hospital A. C. Camargo.

Além disso, a fixação com formaldeído também parece induzir a formação de ligações cruzadas entre a porção N-terminal das bases nitrogenadas e as histonas, tornando a nucleoproteína resultante resistente à digestão pela proteinase K (WU et al. 2002). A manutenção de estruturas secundárias e terciárias do DNA durante o tratamento com bissulfito de sódio pode dificultar a conversão das citosinas não metiladas em uracilas, uma vez que apenas o DNA desnaturado está sujeito à sulfonação (KITAZAWA et al. 2000; TRINH et al. 2001). Alguns métodos para contornar este problema são descritos na literatura, tais como: utilização de gel desnaturante de agarose durante o tratamento, uso de uréia como agente desnaturante, aquecimento do DNA acima de 95°C antes da exposição ao bissulfito e aumento do tempo de incubação da reação de desnaturação do

DNA (OAKELEY 1999; TAN e DOBROVIC 2001). Os dois últimos foram empregados no nosso estudo, sendo que o aumento do tempo de incubação mostrou resultados mais satisfatórios.

KOSHIBA et al. (1993) demonstraram que existe maior degradação do DNA quando o processo de fixação da peça cirúrgica era realizado em pH baixo e temperatura ambiente. Ao contrário, quando a fixação era realizada com formaldeído tamponado e à temperatura de 4°C, observava-se maior preservação de DNA. A partir de 1997, o Hospital A. C. Camargo passou a utilizar formaldeído tamponado com fosfato no emblocamento das amostras tumorais. Este fato se reflete no percentual de amostras descartadas devido a baixa qualidade do DNA, sendo 40% (2 de 5) das amostras coletadas antes de 1997 não puderam ser utilizadas. Por outro lado, apenas 10% (2 de 19) das amostras oriundas de período posterior a 1997 foram rejeitadas.

Tendo em vista que cerca de 60% dos genes conhecidos possuem ilhas de CpG em suas regiões promotoras (ANTEQUERA e BIRD 1993) e, portanto, estão teoricamente sujeitos a hipermetilação em estados patológicos, foram elaborados alguns critérios de seleção para os genes a serem estudados.

Assim, genes que já tiveram seu perfil de metilação avaliado em hepatoblastoma e já mostraram possuir alta frequência de metilação (*RASSF1A*, *CDKN2A* e *SOCS1*), serviram como uma espécie de “controle positivo” do nosso estudo, uma vez que esperávamos encontrar pelo menos algumas amostras com metilação aberrante para esses genes.

Também foram pesquisados genes já avaliados em hepatoblastoma e que demonstraram baixa frequência de metilação (*RARB*, *GSTP1*, *MGMT*, *APC*, *DAPK*, *CDH1*), que serviriam de parâmetro “negativo” para nosso estudo.

Genes descritos como frequentemente metilados em outros tumores, mas que ainda não haviam sido avaliados em hepatoblastoma (*AIM1*, *CALCA*, *CCNA1*, *CCND2*, *COX2 (PTGS2)*, *ESR1*, *MINT31*, *MLH1*, *P14 ARF*, *CDKN2B*, *RB1*, *THBS1*, *TIMP3*, *MT1G*, *SFRP1*, *HIN1*) também foram incluídos no estudo, partindo-se do pressuposto que a metilação aberrante pode estar envolvida na carcinogênese.

Por último, procurou-se determinar, através de estudos de expressão em larga escala publicados na literatura, genes que se mostraram hipoexpressos em hepatoblastomas, que possuíam ilhas de CpG em sua região promotora e que nunca tiveram sua frequência de metilação estudada neste tumor. Neste caso, apenas *MT1G* preencheu esses critérios.

Uma vez que o hepatoblastoma consiste em um tumor embrionário, achamos mais conveniente que o seu perfil de metilação fosse comparado àquele presente em um fígado fetal, que ainda deve manter parte das características embrionárias, e que foi pouco exposto aos efeitos de potenciais carcinógenos. LEHMANN et al. (2005) compararam o perfil de metilação de 9 genes-alvos (*RASSF1A*, *CCND2*, *INK4A*, *DAPK*, *APC*, *RIZ-1*, *HIN-1*, *GSTP-1* e *SOCS-1*) entre carcinomas hepatocelulares, margens normais, lesões hepáticas benignas e fígado normal maduro. Esse estudo revelou a presença de metilação detectável em 57% dos fígados adultos não

neoplásicos pesquisados. Ao contrário, os autores não observaram metilação detectável nos 9 genes estudados em 3 amostras de fígado normal não neoplásico de crianças menores de 4 anos. Em parte esse dado é concordante com os nossos, uma vez que não detectamos metilação nos fígados fetais normais para os genes *APC*, *CDH1*, *MT1G*, *RASSF1A* e *SOCS1*. Os genes *HIN1* e *CCND2*, no entanto, mostraram-se metilados em 4 de 5 amostras de fígado fetal normal investigadas em nosso estudo. Assim, concluímos que a comparação que melhor deve refletir o perfil de metilação patológico deva ser feita entre hepatoblastoma e fígado fetal e não amostras de fígado de adultos.

A presença de hipermetilação em 7 (*RASSF1A*, *SOCS1*, *CDKN2A*, *RARB*, *APC*, *CDH1* e *GSTP1*) dos 25 genes estudados já havia sido avaliada em hepatoblastomas (HARADA et al. 2002; SUGAWARA et al. 2007). HARADA et al. (2002), estudaram o perfil de metilação da região promotora de 9 genes (*RASSF1A*, *RARB*, *GSTP1*, *p16INK4A*, *MGMT*, *APC*, *DAPK*, *CDH1* e *CDH13*) em 175 tumores pediátricos dos quais 27 eram hepatoblastoma, através de MSP convencional. Nesse estudo os autores encontraram uma frequência de hipermetilação de 19% para *RASSF1A*, de, 4% para *RARB* e 4% para *GSTP1*. Os autores não identificaram hipermetilação para os outros 6 genes estudados. Estes números são diferentes do encontrado em nosso estudo (80 % *RASSF1A*, 30% *RARB*, 30% *APC* e 10% *GSTP1*). O artigo publicado, entretanto, não descreve quais dinucleotídeos CG supostamente metilados foram analisados e, portanto, não podemos afirmar, com certeza, se o estudo pode ser

comparado ao nosso. Outro motivo pelo qual a frequência de hipermetilação encontrada em nosso trabalho foi maior que a do estudo em questão é o fato de termos utilizado MSP-Q, que é uma técnica mais sensível do que a MSP convencional, método utilizado pelo primeiro autor.

O gene mais frequentemente hipermetilado em nossas análises foi o *RASSF1A*, localizado no locus 3p21.3, que codifica uma proteína semelhante a uma proteína efetora de RAS em camundongos (Nore1). O produto deste gene parece interagir com a proteína de reparo XPA e também inibir o acúmulo de ciclina D1, induzindo, dessa forma, a parada do ciclo celular. Existem evidências de que a perda ou expressão alterada desse gene esteja associada à patogênese do câncer de pulmão e mama (SHIVAKUMAR et al. 2002; WONG et al. 2004; TOMMASI et al. 2005).

SUGAWARA et al. (2007), utilizando MSP convencional e sequenciamento de DNA tratado com bissulfito, verificaram a presença de hipermetilação na região promotora de *RASSF1A* em 38,5% dos 39 casos de hepatoblastoma avaliados. Essa frequência é, evidentemente, menor que a encontrada em nossa pesquisa (80%), porém pode resultar tanto da maior sensibilidade do método aplicado em nosso estudo, quanto apenas de diferenças populacionais ou amostrais. No entanto, uma diferença relevante entre as duas amostras é que o estudo de SUGAWARA et al. (2007) utilizou apenas amostras pré-quimioterapia, enquanto as nossas foram todas coletadas após neoadjuvância. Assim, pode-se questionar se a exposição ao quimioterápico não teria alguma relação com essa diferença. De fato, estudo de KOUL et al. (2004), revelou uma frequência aumentada de hipermetilação

de *RASSF1A* em tumores de células germinativas resistentes à cisplatina quando comparados aos sensíveis (KOUL et al. 2004). É possível, portanto, que em nossas amostras tenha ocorrido uma forma de seleção natural durante a exposição à cisplatina, gerando uma maior representatividade de clones resistentes à quimioterapia e, na hipótese de esta associação realmente existir, uma maior frequência de hipermetilação em *RASSF1A*. Neste caso a hipermetilação de *RASSF1A* poderia ser útil como um marcador de resistência ao tratamento com cisplatina.

A responsividade a drogas derivadas de platina incentivou a utilização de esquemas de tratamento contendo quimioterapia neoadjuvante para todos os casos de hepatoblastoma, independente da condição de ressecabilidade tumoral no momento do diagnóstico. Uma das grandes críticas a essa conduta é a possibilidade de se retardar o tratamento definitivo curativo de um hepatoblastoma inicialmente ressecável com a utilização de quimioterápicos para um tumor que pode ser quimiorresistente (MUELLER et al. 2006). A identificação de genes relacionados à resistência quimioterápica pode propiciar a descoberta de novas drogas antineoplásicas, seguindo o princípio da terapia-alvo.

A aplicação dos conhecimentos relativos à metilação, neste sentido, pode ser verificada nos estudos recentes de eficácia de inibidores da DNA metiltransferase em uma série de neoplasias como revisados por LYKO e BROWN (2005). De fato, desde a década de 90 se utilizava o agente 5-azadesoxicidina, em altas doses, como agente citotóxico para o tratamento de neoplasias. A partir de 2000, com o conhecimento de sua ação desmetilante,

o agente passou a ser utilizado em baixas doses no tratamento de neoplasias hematológicas, com resultados promissores (MIYAMOTO E USHIJIMA 2005). Assim, uma eventual relação causal entre metilação do DNA e carcinogênese do hepatoblastoma poderia justificar a utilização de tais agentes inibidores também nesse tipo de tumor.

Além disso, SUGAWARA et al. (2007) observaram também que os pacientes que apresentavam *RASSF1A* metilado evoluíam com piores taxas de sobrevida global em 6 anos quando comparados aos não-metilados (SG 6 anos = 40% X 95,8%, respectivamente; $p < 0,001$). Em nosso estudo não observamos diferença entre as taxas de sobrevida globais dos pacientes quando comparados os estados de metilação de *RASSF1A* (SG 5 anos 75% metilado X 74,45% não metilado; $p = 0,915$). No entanto, como apenas 4 pacientes não apresentavam hipermetilação para este gene, a ausência de diferença pode ter sido devido apenas à escassez de indivíduos neste grupo.

O gene *APC* constitui um supressor de tumor, localizado no cromossomo 5q21 e codifica a proteína *apc*, envolvida na degradação de *CTNNB1* (que codifica a beta-catenina), participando da via de sinalização Wnt. Defeitos deste gene estão relacionados com a gênese da Polipose Adenomatosa Familiar (FAP), síndrome de Gardner e síndrome de Turcot (FOULKES 1995). Na maioria das vezes as mutações do gene *APC* levam à produção de uma proteína truncada não funcional. Além disso, a inativação de ambos os alelos deste gene parece ser necessária para o desenvolvimento de adenomas e carcinomas na FAP (GALIATSATOS e FOULKES 2006). Como mencionado anteriormente, pacientes portadores de

FAP possuem risco elevado de desenvolvimento de hepatoblastoma nos primeiros 4 anos de vida (HERZOG et al. 2000). Além disso, em tumores esporádicos, como o carcinoma hepatocelular, já foi demonstrada hipermetilação da região promotora deste gene, bem como o seu silenciamento (CSEPREGI et al. 2008). Dessa forma, é plausível imaginar que a inativação de *APC* através da hipermetilação de sua região promotora possa ser um mecanismo relacionado também à gênese do hepatoblastoma. De fato, em nosso estudo encontramos 30% de metilação aberrante em *APC*, sendo que nenhuma das amostras de fígado normal apresentou alteração detectável.

O gene *SOCS1*, localizado no locus 16p13.13, codifica uma proteína ligante de JAK que faz parte de um sistema de *feedback* negativo e tem como função regular a transdução de sinal dependente de citocinas na via JAK/STAT3. A ausência de *SOCS1*, portanto, poderia deixar livre a atividade cinase de JAK, induzindo, em última instância, ao crescimento e proliferação celular (NAGAI et al. 2003; WU et al. 2006). A associação entre hipermetilação e silenciamento transcricional do gene *SOCS1* já havia sido descrita em hepatoblastomas por NAGAI et al. (2003). Nesse estudo, os autores encontraram hipermetilação na região promotora de *SOCS1* em 7 de 15 hepatoblastomas avaliados (46,6%). No entanto, este grupo avaliou a presença de metilação em uma região diferente da avaliada em nosso estudo, por isso as frequências obtidas não podem ser comparadas. Além disso, os autores não correlacionaram o achado de metilação deste gene com características clínicas dos pacientes. Em nossa investigação

verificamos não haver associação entre a presença de metilação em *SOCS1* e características prognósticas clássicas para o hepatoblastoma, entretanto parece haver menor frequência dessa alteração epigenética nos tumores que apresentam componente mesenquimal (hepatoblastoma misto) quando comparados aos subtipos puros. Apesar de não ser consensualmente aceita, a presença de componente mesenquimal em hepatoblastomas após quimioterapia neoadjuvante tem sido relacionada com maior resposta à quimioterapia (SAXENA et al. 1993). Não existem relatos na literatura, até o momento, de associações entre características clínicas de pacientes com hepatoblastoma e presença de metilação em *SOCS1*. Entretanto, o fato de esta alteração molecular estar presente em 40% dos tumores investigados e em nenhuma amostra de fígado normal fetal, constitui indício de uma possível associação entre este achado e o processo de carcinogênese do hepatoblastoma. WU et al. (2006) investigaram a presença de metilação de *SOCS1* em pacientes com síndrome mielodisplásica, uma condição pré-leucêmica. Foi verificado que a presença de metilação nesse gene estava positivamente relacionada com mutações no gene *NRAS* e inversamente associada com características cariotípicas de bom prognóstico. Além disso, pacientes com metilação em *SOCS1* possuíam um risco cumulativo maior de transformação leucêmica, quando comparados aos seus pares.

Observamos em nosso estudo que não apenas a presença de hipermetilação no gene *MT1G* estava relacionada a um pior prognóstico, como também o nível dessa hipermetilação, ou seja, quanto maior o nível de metilação pior o prognóstico. Este gene, localizado no locus 16q13, codifica

a proteína Metalotioneína 1G, que contém grande quantidade de resíduos cisteína, e se liga a vários metais pesados. Aparentemente sua função biológica está relacionada com a homeostase do zinco e cobre e com a proteção contra toxicidade ao cádmio. JAHROUDI et al. (1990) demonstraram que a atividade transcricional do gene aumenta com a exposição a metais pesados e dexametasona. Nesse mesmo estudo os autores demonstraram que a metilação do DNA se relaciona com o silenciamento transcricional de *MT1G* em células de rim embrionário (JAHROUDI et al. 1990). Além disso, HUANG et al. (2003) observaram reexpressão de *MT1G* em linhagem celular K2 após tratamento com o agente desmetilante 5-Aza e o inibidor de histona deacetilase Tricostatina (HUANG et al. 2003). Mais recentemente, NAGATA et al. (2003) compararam o padrão de expressão de hepatoblastomas com tecido hepático normal não-tumoral através de experimentos de array de oligonucleotídeos e, entre os genes que se mostraram hipoexpressos em hepatoblastomas, encontrava-se o *MT1G*. HENRIQUE et al. (2005) demonstraram que a hipermetilação de *MT1G* estava associada com estádios mais avançados de câncer de próstata. Além disso, a metilação para esse gene não foi encontrada em nenhuma das 13 amostras de próstata normais investigadas, o que indica que essa alteração molecular pode estar associada a estados patológicos.

Os nossos achados mostram que *MT1G* apresenta uma discreta metilação em fígado fetal normal e que a taxa de sobrevivência dos pacientes com hepatoblastoma parece se correlacionar negativamente com os níveis

de hipermetilação deste gene. Estes fatos sugerem que este pode ser um bom marcador tumoral de prognóstico em casos de hepatoblastoma. Entretanto, a avaliação de um número maior de casos é necessária para uma conclusão definitiva a respeito desta afirmativa.

7 CONCLUSÕES

1. Conseguimos avaliar o perfil de metilação de porcentual significativo dos casos que tinham material disponível no arquivo do Departamento de Patologia do Hospital A. C. Camargo (apenas 4 de 24 amostras não amplificaram após tratamento com bissulfito).
2. Através da técnica de MSP-Q foi determinada a frequência de hipermetilação da região promotora de 25 genes (*AIM1*, *APC*, *CALCA*, *CCNA1*, *CCND2*, *CDH1*, *COX2 (PTGS2)*, *DAPK*, *ESR1*, *GSTP1*, *MGMT*, *MINT31*, *MLH1*, *ARF*, *CDKN2B*, *CDKN2A*, *RARB*, *RASSF1A*, *RB1*, *SOCS1*, *THBS1*, *TIMP3*, *MT1G*, *SFRP1*, *HIN1(SCGB3A1)*) em 20 amostras de hepatoblastoma e em 5 amostras de fígado normal fetal
3. Os genes mais frequentemente metilados nos tumores e com baixa metilação nos tecidos normais foram *RASSF1A* (80%), o *MT1G* (55%), o *SOCS1* (40%) e o *APC* (30%).
4. Observamos associação estatisticamente significativa entre pior sobrevida global e a presença de metilação no gene *MT1G*. Além disso, através de análise por regressão de Cox, observamos que não apenas a presença de metilação parece influenciar a sobrevida desses pacientes, mas também que o nível de metilação de *MT1G* pode ser importante, uma vez que quanto maior o nível de metilação, menor a sobrevida estimada.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anna CH, Sills RC, Foley JF, Stockton PS, Ton TV, Devereux TR. Beta-catenin mutations and protein accumulation in all hepatoblastomas examined from B6C3F1 mice treated with anthraquinone or oxazepam. **Cancer Res** 2000; 60:2864-8.

Aronson DC, Schnater JM, Staalman CR, 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; 23:1245-52.

Antequera F, Bird A. CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins. **Curr Biol** 1999; 9:R661-7.

Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cell Mol Life Sci** 2002; 59:241-57.

Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. **Hum Mol Genet** 2000; 9:2395-402.

Csepregi A, Röcken C, Hoffmann J, et al. APC promoter methylation and protein expression in hepatocellular carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol** 2008; 134:579-89.

Czauderna P, Otte JB, Aronson DC, et al. Guidelines for surgical treatment of hepatoblastoma in the modern era--recommendations from the Childhood Liver Tumour Strategy Group of the International Society of Paediatric Oncology (SIOPEL). **Eur J Cancer** 2005; 41:1031-6.

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.

Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. **Nucleic Acids Res** 2000; 28:E32.

Eads CA, Laird PW. Combined bisulfite restriction analysis (COBRA). **Methods Mol Biol** 2002; 200:71-85.

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature** 2004; 429:457-63.

Esteller M. Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. **J Pathol** 2005; 205:172-80.

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. Chemotherapy for suspected hepatoblastoma without efforts at surgical resection is a bad practice. **Med Pediatr Oncol** 2002; 39:484-6.

Foulkes WD. A tale of four syndromes: familial adenomatous polyposis, Gardner syndrome, attenuated APC and Turcot syndrome. **QJM** 1995; 88:853-63.

Fuchs J, Rydzynski J, Von Schweinitz D, et al. Pretreatment prognostic factors and treatment results in children with hepatoblastoma: a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB 94. **Cancer**. 2002; 95:172-82.

Fukuzawa R, Umezawa A, Ochi K, Urano F, Ikeda H, Hata J. High frequency of inactivation of the imprinted H19 gene in "sporadic" hepatoblastoma. **Int J Cancer** 1999; 82:490-7.

Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. **Am J Gastroenterol** 2006; 101:385-98.

Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. **J Mol Biol** 1987; 196:261-82.

Giardiello FM, Offerhaus GJ, Krush AJ, et al. Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis. **J Pediatr** 1991; 119:766-8.

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

Habrand JL, Pritchard J. Role of radiotherapy in hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma in children and adolescents: results of a survey conducted by the SIOP Liver Tumour Study Group. **Med Pediatr Oncol** 1991; 19:208.

Habrand JL, Nehme D, Kalifa C, et al. Is there a place for radiation therapy in the management of hepatoblastomas and hepatocellular carcinomas in children? **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1992; 23:525-31.

Harada K, Toyooka S, Maitra A, et al. Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines. **Oncogene** 2002; 21:4345-9.

Henrique R, Jerónimo C, Hoque MO, et al. MT1G hypermethylation is associated with higher tumor stage in prostate cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2005; 14:1274-8.

Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. **N Engl J Med** 2003; 349:2042-54.

Herzog CE, Andrassy RJ, Eftekhari F. Childhood cancers: hepatoblastoma. **Oncologist** 2000; 5:445-53.

Huang Y, de la Chapelle A, Pellegata NS. Hypermethylation, but not LOH, is associated with the low expression of MT1G and CRABP1 in papillary thyroid carcinoma. **Int J Cancer** 2003; 104:735-44.

Jahroudi N, Foster R, Price-Haughey J, Beitel G, Gedamu L. Cell-type specific and differential regulation of the human metallothionein genes. Correlation with DNA methylation and chromatin structure. **J Biol Chem** 1990; 265:11:6506-11.

Jung SE, Kim KH, Kim MY, et al. Clinical characteristics and prognosis of patients with hepatoblastoma. **World J Surg** 2001; 25:126-30.

Kitazawa S, Kitazawa R, Maeda S. Identification of methylated cytosine from archival formalin-fixed paraffin-embedded specimens. **Lab Invest** 2000; 80:275-6.

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.

Koshihara M, Ogawa K, Hamazaki S, Sugiyama T, Ogawa O, Kitajima T. The effect of formalin fixation on DNA and the extraction of high-molecular-weight DNA from fixed and embedded tissues. **Pathol Res Pract** 1993; 189:66-72.

Koul S, McKiernan JM, Narayan G, et al. Role of promoter hypermethylation in Cisplatin treatment response of male germ cell tumors. **Mol Cancer** 2004; 3:16.

Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:253-66.

Lehmann U, Kreipe H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. **Methods** 2001; 25:409-18.

Lehmann U, Berg-Ribbe I, Wingen LU, et al. Distinct methylation patterns of benign and malignant liver tumors revealed by quantitative methylation profiling. **Clin Cancer Res** 2005; 11:3654-60.

Li X, Kogner P, Sandstedt B, et al. Promoter-specific methylation and expression alterations of igf2 and h19 are involved in human hepatoblastoma. *Int J Cancer*, 75: 176-180, 1998.

Lyko F, Brown R. DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. **J Natl Cancer Inst** 2005; 97:1498-506.

Miyamoto K, Ushijima T. Diagnostic and therapeutic applications of epigenetics. **Jpn J Clin Oncol** 2005; 35:293-301.

Mueller BU, Lopez-Terrada D, Finegold MJ. Tumors of the liver. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. **Principles of practice of pediatric oncology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins; 2006. p.887-904.

Nagai H, Naka T, Terada Y, et al. Hypermethylation associated with inactivation of the SOCS-1 gene, a JAK/STAT inhibitor, in human hepatoblastomas. **J Hum Genet** 2003; 48:65-9.

Nagata T, Takahashi Y, Ishii Y, et al. Transcriptional profiling in hepatoblastomas using high-density oligonucleotide DNA array. **Cancer Genet Cytogenet** 2003; 145:152-60.

Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. **Gene** 2001; 278:25-31.

Oakeley EJ. DNA methylation analysis: a review of current methodologies. **Pharmacol Ther** 1999; 84:389-400.

Oda H, Imai Y, Nakatsuru Y, Hata J, Ishikawa T. Somatic mutations of the APC gene in sporadic hepatoblastomas. **Cancer Res** 1996; 56:3320-3.

Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, et al. Precision and performance characteristics of bisulfite conversion and real-time PCR (MethyLight) for quantitative DNA methylation analysis. **J Mol Diagn** 2006; 8:209-17.

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, 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.

Park WS, Oh RR, Park JY, et al. Nuclear localization of beta-catenin is an important prognostic factor in hepatoblastoma. **J Pathol** 2001; 193:483-90.

Perilongo G, Shafford E, Plaschkes J; Liver Tumour Study Group of the International Society of Paediatric Oncology. SIOPEL trials using preoperative chemotherapy in hepatoblastoma. **Lancet Oncol** 2000a; 1:94-100.

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** 2000b; 89:1845-53.

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 Paediatric Oncology--SIOPEL 2. **Eur J Cancer** 2004; 40:411-21.

Raizis AM, Schmitt F, Jost JP. A bisulfite method of 5-methylcytosine mapping that minimizes template degradation. **Anal Biochem** 1995; 226:161-6.

Roebuck DJ, Aronson D, Clapuyt P, et al. PRETEXT: a revised staging system for primary malignant liver tumours of childhood developed by the SIOPEL group. **Pediatr Radiol** 2007; 37:123-32.

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques** 1994; 17:914-21.

Saxena R, Leake JL, Shafford EA, et al. Chemotherapy effects on hepatoblastoma. A histological study. **Am J Surg Pathol** 1993; 17:1266-71.

Schnater JM, Köhler SE, Lamers WH, von Schweinitz D, Aronson DC. Where do we stand with hepatoblastoma? A review. **Cancer** 2003; 98:668-78.

Schrapppe M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, et al. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Münster. **Leukemia** 2000; 14:2205-22.

Shim YH, Park HJ, Choi MS, et al. Hypermethylation of the p16 gene and lack of p16 expression in hepatoblastoma. **Mod Pathol** 2003; 16:430-6.

Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, White MA. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. **Mol Cell Biol** 2002; 22:4309-18.

Singal R, Ginder GD. DNA methylation. **Blood** 1999; 93:4059-70.

Sugawara W, Haruta M, Sasaki F, Watanabe N, Tsunematsu Y, Kikuta A, Kaneko Y. Promoter hypermethylation of the RASSF1A gene predicts the poor outcome of patients with hepatoblastoma. **Pediatr Blood Cancer** 2007; 49:240-9.

Tan LW, Dobrovic A. Methylation analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded sections using a nontoxic DNA extraction protocol. **Biotechniques** 2001; 31:1354, 56-7.

Tanimura M, Matsui I, Abe J, et al. Increased risk of hepatoblastoma among immature children with a lower birthweight. **Cancer Res** 1998; 58:3032-5.

Tomlinson GE, Finegold MJ. Tumors of the liver. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors, **Principles of practice of pediatric oncology** 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins; 2002. p.847-64.

Tommasi S, Dammann R, Zhang Z, et al. Tumor susceptibility of Rassf1a knockout mice. **Cancer Res** 2005; 65:92-8.

Trinh BN, Long TI, Laird PW. DNA methylation analysis by MethyLight technology. **Methods** 2001; 25:456-62.

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.

Wong IH, Chan J, Wong J, Tam PK. Ubiquitous aberrant RASSF1A promoter methylation in childhood neoplasia. **Clin Cancer Res** 2004; 10:994-1002.

Wu L, Patten N, Yamashiro CT, Chui B. Extraction and amplification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2002; 10:269-74.

Wu SJ, Yao M, Chou WC, et al. Clinical implications of SOCS1 methylation in myelodysplastic syndrome. **Br J Haematol** 2006; 135:317-23.

Yamada S, Ohira M, Horie H, et al. Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: identification of high expression of the PLK1 oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas. **Oncogene** 2004; 23:5901-11.